

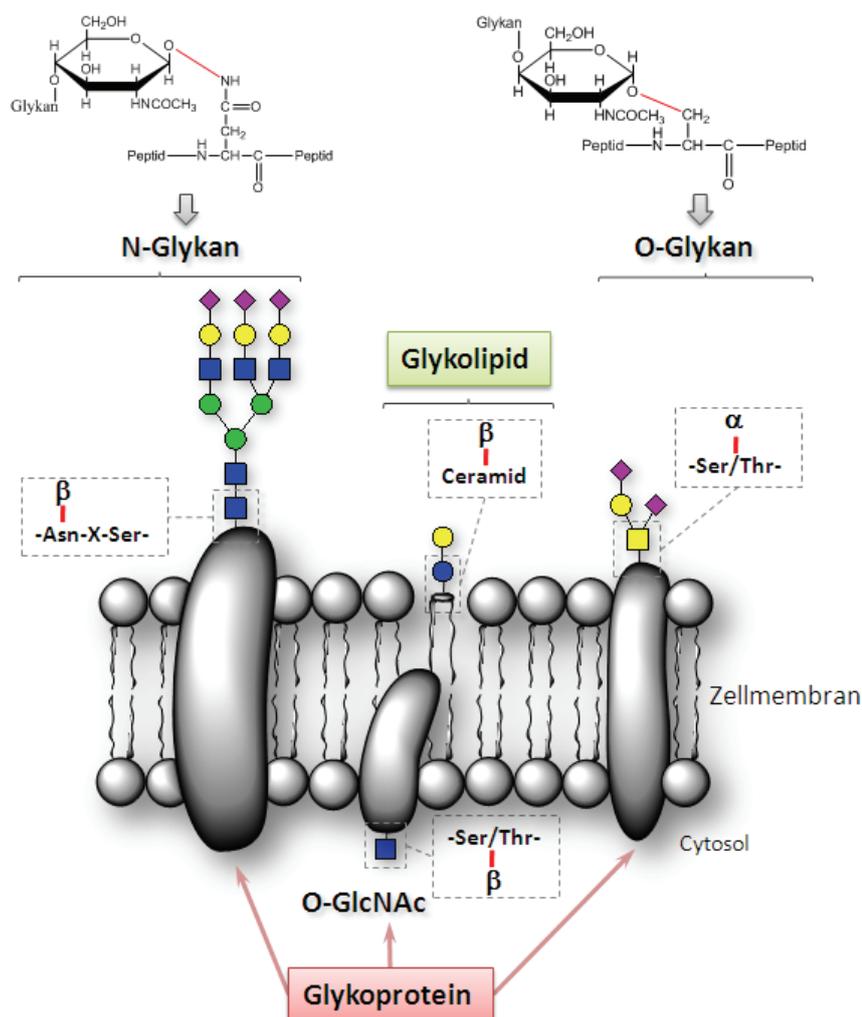
# **1. EINLEITUNG**

Die Identifizierung der DNA (Watson & Crick, 1953) war der Beginn der Aufklärung der molekularbiologischen Abläufe in Organismen. Die später folgenden vollständigen Sequenzierungen der chromosomalen Strukturen einzelner Spezies (Sanger *et al.*, 1977) erlaubten die Darstellung deren „Bauplanes“. Dieser lässt jedoch direkt keine Beurteilung von biochemischen Prozessen zu, sondern muss erst in die Aminosäure-Sequenz übersetzt werden (Tyers & Mann, 2003). In der Proteomik werden die Proteine eines Genoms und deren Änderungen erfasst, so dass die Translationsprodukte definiert werden können (Kellner, 2000; Zhu *et al.*, 2003). Diese Proteine sind die Grundlage für sämtliche Reaktionen zur Strukturhaltung, zur Synthese bzw. zum Abbau von Molekülen, zur Aufrechterhaltung der Energiebereitstellung u.a.. Dieser allgemein beschriebene Weg des Informationsflusses von DNA über RNA zur Aminosäure-Sequenz des Proteins stellt die Basis für die Abläufe in den Organismen dar, beinhaltet jedoch nicht alle Möglichkeiten der Regulation von biologischen Vorgängen.

Für die Anpassung an veränderte exogene und endogene Parameter müssen Zellen nicht unbedingt neue bzw. mutierte Gene aufweisen, sondern können Veränderungen an z.B. Enzymen auch während oder nach deren Translation vornehmen (Stryer *et al.*, 2003). Zusätzlich zu den allgemein bekannten 20 proteinogenen Aminosäuren (Taylor, 1986) existieren zwei weitere: Selenocystein (Böck *et al.*, 1991) und Pyrrolysin (Srinivasan *et al.*, 2002), die durch eine Recodierung des genetischen Materials eingebaut werden (Parker, 1989; Fenske & Hinrichs, 2003). Die 21. Aminosäure Selenocystein wird durch ein Stop-Codon definiert, welches in Verbindung mit einem speziellen Elongationsfaktor und einer Sekundärstruktur der mRNA, nicht zum Abbruch der Translation, sondern zur Bindung einer Selenocysteyl-tRNA führt (Stadtman, 1996; Gröbe, 2001; Gursinsky *et al.*, 2008).

Zu den posttranslationalen Modifikationen zählen z.B. Phosphorylierung (Burnett & Kennedy, 1954), Sulfatierung (Hemmerich *et al.*, 2004) und Ubiquitinylierung (Wiborg *et al.*, 1985). Die in der Forschung und pharmazeutischen Anwendung an Bedeutung gewinnende Glykosylierung (Rademacher *et al.*, 1988; Tuomanen, 1996; Varki *et al.*, 1998; Bertozzi & Kiessling, 2001; Schäffer *et al.*, 2001; Benz & Schmidt, 2002) zählt ebenfalls zu den posttranslationalen Modifikationen und ist das Thema dieser Arbeit. Bei dieser werden Kohlenhydratstrukturen (Mono- bis Polymere) enzymatisch gekoppelt und können dadurch die Eigenschaften des Trägermoleküls verändern. Die ebenfalls existierende Glykierung erfolgt ohne Enzyme (Vlassara, 2005; Zhang *et al.*, 2008) und ist durch eine direkte Interaktion von vorwiegend Glucose, Fructose oder Galactose mit Aminosäuren gekennzeichnet. Es kommen, neben der in den anschließenden

Kapiteln erläuterten Modifikation von Proteinen, weitere Arten von Glykosylierungen vor (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung von Glykosylierungs-Varianten an Proteinen und Lipiden** Die glykosidischen Bindungen und das Anomer des beteiligten Kohlenhydrates sind gekennzeichnet; Symbole S. 6

Bei den Glykophospholipiden ist der variable Kohlenhydratanteil mit einem Ceramid verknüpft, welches in Membranen verankert ist. Ein anderer Vertreter sind die Glykosylphosphatidylinositole (GPI-Anker) die der Verankerung von Proteinen an Membranen dienen (Lauc & Heffer-Lauc, 2006; Li *et al.*, 2007). Das Phosphatidylinositol trägt zwei lipophile Ceramid- oder Fettsäurereste und ist über einen Oligosaccharid-Anteil mit dem Peptid verknüpft. Das hier vorhandene Glucosamin (GlcNH<sub>2</sub>) kommt in anderen Glykokonjugaten nur in acetylierter Form vor (GlcNAc). Glykosaminoglykane und Proteoglykane sind Bestandteile von extrazellulären Matrices und Zelloberflächen (Keiser, 1982; Conrad, 2001). Ein geringer Proteinanteil besitzt eine oder mehrere Polysaccharidketten, die als Grundbaustein Disaccharide aufweisen. Der Nachweis des O-glykosidisch verknüpften N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) an bestimmten Proteinen (Comer & Hart, 2000; Vosseller *et al.*, 2001; Wells & Hart, 2003) verwarf

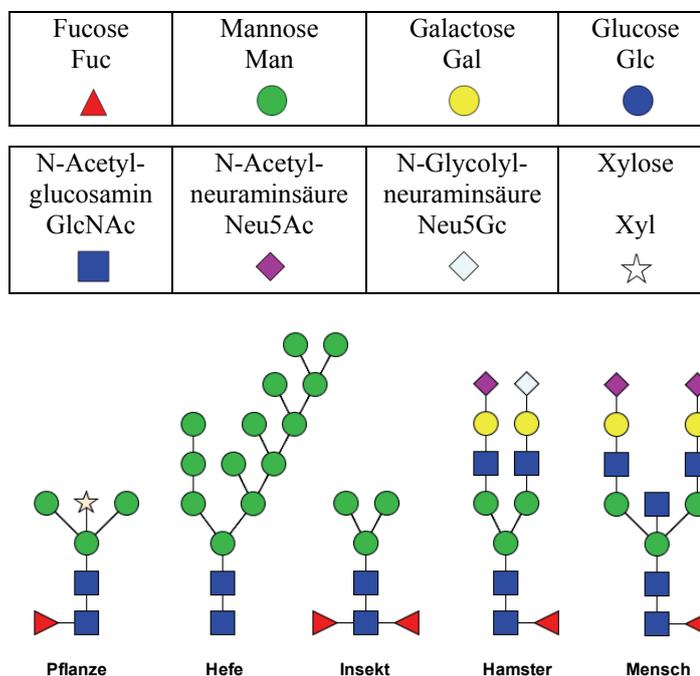
erst Mitte der Achtziger Jahre die Auffassung, dass Proteine im Cytosol und Zellkern nicht glykosyliert vorliegen können. Die noch wenig untersuchte O-Mannosylierung (Endo, 2004; Endo & Manya, 2006; Manya *et al.*, 2007) wurde nur in bestimmten Geweben nachgewiesen.

## 1.1. Glykosylierung von Proteinen

Die in dieser Arbeit untersuchten Glykokonjugate waren Antikörper oder Glykoproteine aus Seren, Mucinen, bzw. Membran-Isolierungen. Der Aufbau, die Funktionen und Charakterisierungen der dort vorkommenden N- und O-Glykane sind Inhalt der folgenden Kapitel.

### 1.1.1. Aufbau der Glykane

Die Grundbausteine der Glykane, die Monosaccharide, können vom einzelnen Monomer (Wells *et al.*, 2001) bis zum Polymer mit über 100 Einheiten (Finne *et al.*, 1983) verknüpft sein. Von den in der Natur vorkommenden Kohlenhydraten ist nur ein Bruchteil in den proteingebundenen Oligosacchariden zu finden. Die häufigsten sind mit Strukturbeispielen von verschiedenen Organismen in der (Abbildung 2) dargestellt.



**Abbildung 2: Häufige Monosaccharide in Glykanen und Spezies-abhängige Beispiele**

Die Monosaccharide können in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden: geladen und ungeladen. Zu letzteren gehören z.B. Fuc, Gal, Glc, GalNAc, GlcNAc und Man, welche die Basis eines vollständigen Glykans bilden oder den größten Anteil darstellen (Staudacher *et al.*, 1999; Becker

& Lowe, 2003; Ma *et al.*, 2006). Zusätzlich können geladene Kohlenhydrate anwesend sein, zu denen die Sialinsäuren (Schauer, 1982) gehören (s. 1.1.2).

Die Variabilität innerhalb eines Glykans wird durch die unterschiedlichen Monosaccharide geprägt. Diese können in verschiedenen Konformationen vorliegen und zusätzlich verschiedene Bindungen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) aufweisen. Die Aminosäure-Sequenz des Proteins bildet die Grundlage für putative Glykosylierungsstellen. Deren Anzahl- oder Positionsvarianten an gebundenen Oligosacchariden bilden die Makroheterogenität, die Summe der vorkommenden Glykane an einer Position die Mikroheterogenität des Glykoms. Diese drei Variablen führen zu einer Vervielfachung der Strukturmöglichkeiten des Proteoms, welches somit spezifischer auf exogene bzw. endogene Signale reagieren kann.

Die Biosynthese der Glykane findet primär im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat statt (1.1.3 und 1.1.4) und benötigt eine Vielzahl an Enzymen (Kinasen, Glykosyltransferasen, Transporter, Glykosidasen, usw.), deren codierende Sequenzen ca. 1% des Genoms beanspruchen (Feizi & Mulloy, 2003).

### 1.1.2. Sialinsäuren

Sialinsäuren sind saure Aminosucker mit einem Grundgerüst aus 9 Kohlenstoffatomen mit einer Carboxylgruppe am C-2-Atom und einer Aminogruppe am C-5-Atom (Blix *et al.*, 1957). Durch verschiedene Substituenten ergeben sich ca. 50 Strukturen, von denen die Neu5Ac (Abbildung 3) die häufigste ist und gleichzeitig den Vorläufer für die meisten anderen darstellt (Varki, 1992; Reuter & Gabius, 1996; Traving & Schauer, 1998; Angata & Varki, 2002).

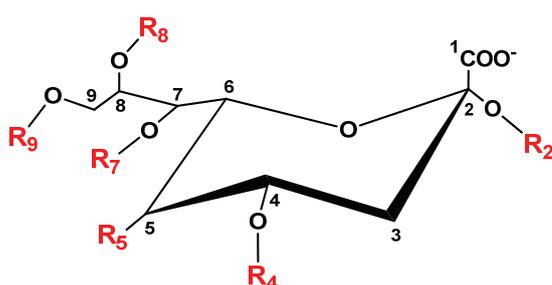
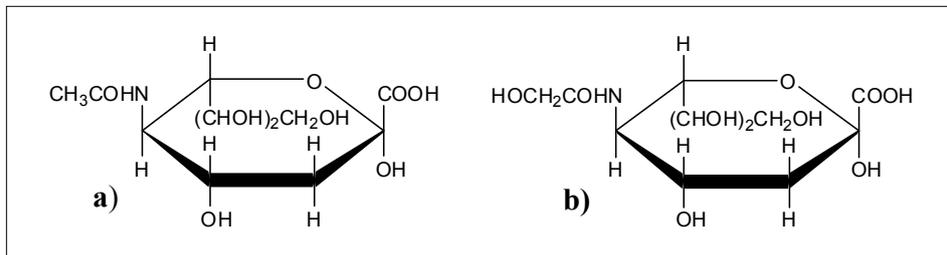


Abbildung 3: Grundstruktur der Sialinsäuren mit den möglichen Substituenten (s. Tabelle)

R	Substituenten
2	H bei freier Sialinsäure, $\alpha$ -Bindung zu Gal (3/4/6), GalNAc (6), GlcNAc (4/6), Sialinsäure (8/9)
4	H, O-acetyl
5	Amino, N-Acetyl, N-Glycolyl, Hydroxyl
7	H, O-Acetyl
8	H, O-Acetyl, O-Methyl, O-Sulfat, oder Sialinsäure
9	Hydroxyl, O-Acetyl, O-Lactyl, O-Phosphat, O-Sulfat, Sialinsäure

Die unsubstituierte Form, die Neuraminsäure, wurde bisher nur sehr selten nachgewiesen (Manzi *et al.*, 1990). In allen untersuchten Säugetier-Arten existiert das Gen für CMP-Sialinsäure-Hydroxylase, welches die Biosynthese der Neu5Gc aus der Neu5Ac ermöglicht. In Menschen fehlt dieses Gen (Irie *et al.*, 1998; Varki, 2001), so dass diese Sialinsäure nicht in humanen Glykanen vorkommt. Diese codierende DNA-Sequenz ist der bisher einzige nachgewiesene

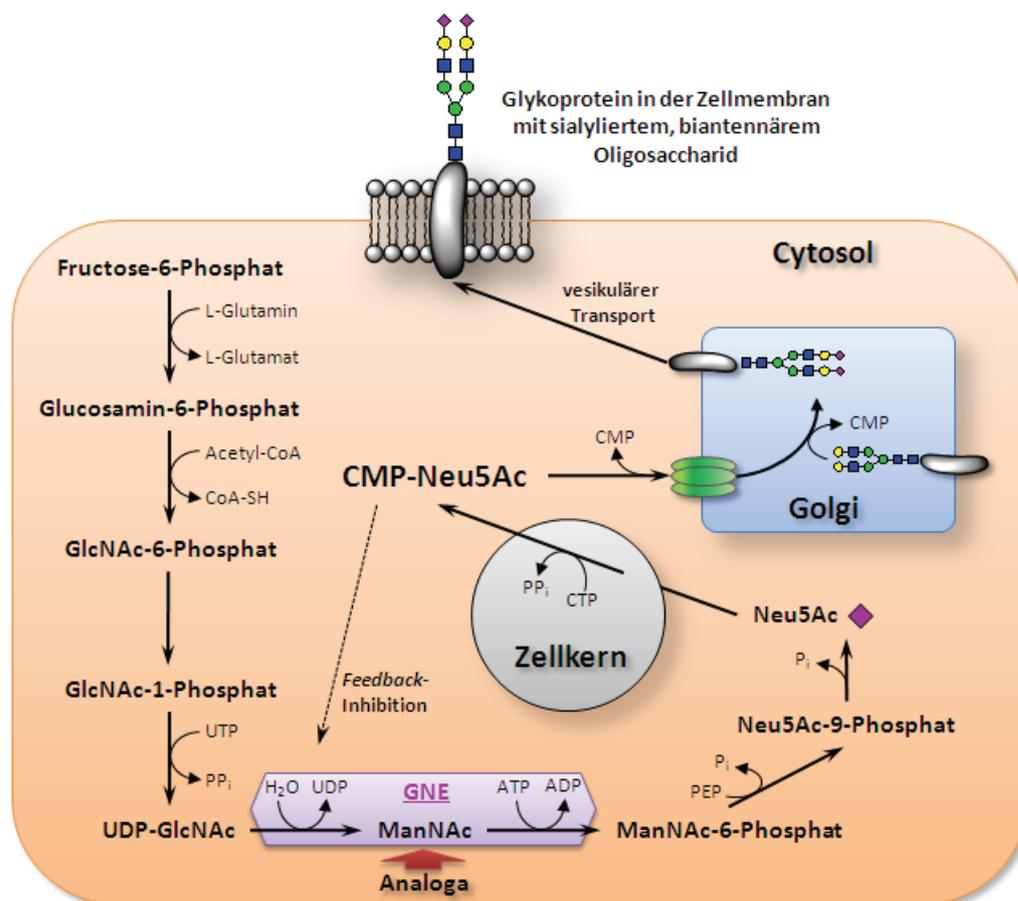
definierte Unterschied zwischen Schimpansen und Menschen, deren Genome nur zu ca. 1% voneinander abweichen (Gibbons, 1998; Alper, 2001; Gagneux *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2005).



**Abbildung 4: Strukturen der Sialinsäuren Neu5Ac (a) und Neu5Gc (b)**

Die Sialinsäuren können in Glykan-Strukturen als Monomer vorliegen (Brinkman-van der Linden *et al.*, 1998; Ohmori *et al.*, 2000; Magnani, 2004), sind jedoch auch in der Lage durch Verknüpfungen Oligo- bzw. Polymere auszubilden (Troy, 1992; von Der Ohe *et al.*, 2002).

Die Biosynthese der Sialinsäuren (Abbildung 5) ist in zwei Hauptschritte geteilt (Traving & Schauer, 1998; Varki *et al.*, 1998). Die Bereitstellung des UDP-GlcNAc, welches einen Teil des Aminozucker-Stoffwechsels darstellt, ist Voraussetzung für die irreversible Synthese der CMP-Neu5Ac (Abbildung 5). Ausgehend vom Fructose-6-phosphat erfolgt deren Aminierung durch die Glutamin-Fructose-6-phosphat-Aminotransferase, welche durch die komplexe Regulation ihrer Aktivität die zentrale Schlüsselrolle im Aminozucker-Stoffwechsel einnimmt (Kornfeld *et al.*, 1964). Gleichzeitig ist dieser Schritt auch das Bindeglied zur Glykolyse. Das im weiteren Verlauf entstehende UDP-GlcNAc wird durch die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (GNE) zu ManNAc epimerisiert und anschließend an der Position 6 phosphoryliert (Hinderlich *et al.*, 1997; Stäsche *et al.*, 1997; Ghaderi *et al.*, 2007). Nach dem Schritt der Neu5Ac-Bildung muss diese durch die CMP-Neu5Ac-Synthetase aktiviert werden, was, im Unterschied zu allen anderen Monosacchariden, im Nukleus stattfindet (Kean, 1970). Im Anschluss gelangt die CMP-Neu5Ac vermutlich durch Diffusion in das Cytosol und einen spezifischen Transporter in den Golgi-Apparat (Eckhardt *et al.*, 1996). Die spezifischen Sialyltransferasen übertragen dort die Neu5Ac unter CMP-Abspaltung auf die Oligosaccharidketten von Glykokonjugaten (Harduin-Lepers *et al.*, 1995; Harduin-Lepers *et al.*, 2005). Erst jetzt werden die Sialinsäuren durch verschiedene Transferasen mit Substituenten modifiziert (Reuter & Gabius, 1996; Schauer, 2000). Die Hydroxylierung von Neu5Ac zu Neu5Gc bildet dabei eine Ausnahme, da das aktivierte Nukleotid direkt als Substrat verwendet wird (Kawano *et al.*, 1995). Die resultierenden Glykokonjugate gelangen dann durch vesikulären Transport an die Bestimmungsorte. In hyposialylierenden Zellen konnte auch die Aufnahme von Sialinsäuren aus dem Medium nachgewiesen werden (Oetke *et al.*, 2001), so dass ein alternativer Weg genutzt werden kann.



**Abbildung 5: Biosynthese der N-Acetylneuraminsäure und deren Exposition auf einem Glykoprotein**  
 GNE=UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase; der rote Pfeil markiert den Schritt zur Zugabe von Neu5Ac-Analoga für die Glykan-Modifikation (s. 1.3)

Die Aktivität des bifunktionalen Enzyms GNE (Hinderlich *et al.*, 1997; Stäsche *et al.*, 1997; Reinke & Hinderlich, 2007) wird durch das Endprodukt der Neu5Ac-Biosynthese CMP-Neu5Ac reguliert (Kornfeld *et al.*, 1964) und stellt somit eine zentrale Position innerhalb dieses Biosyntheseweges dar.

### 1.1.3. N-Glykane

Diese Oligosaccharide sind an Proteinen durch eine N-glykosidische Bindung zwischen der Aminosäure Asparagin und einem GlcNAc gekennzeichnet (Abbildung 1). Alle N-Glykane besitzen eine gemeinsame Grundstruktur (Core) aus zwei GlcNAc (Chitobiose) und drei Mannosen, welche in den Beispielen der Abbildung 6 markiert wurden. Die O-Glykane (1.1.4) hingegen weisen keinen einheitlichen Core auf.

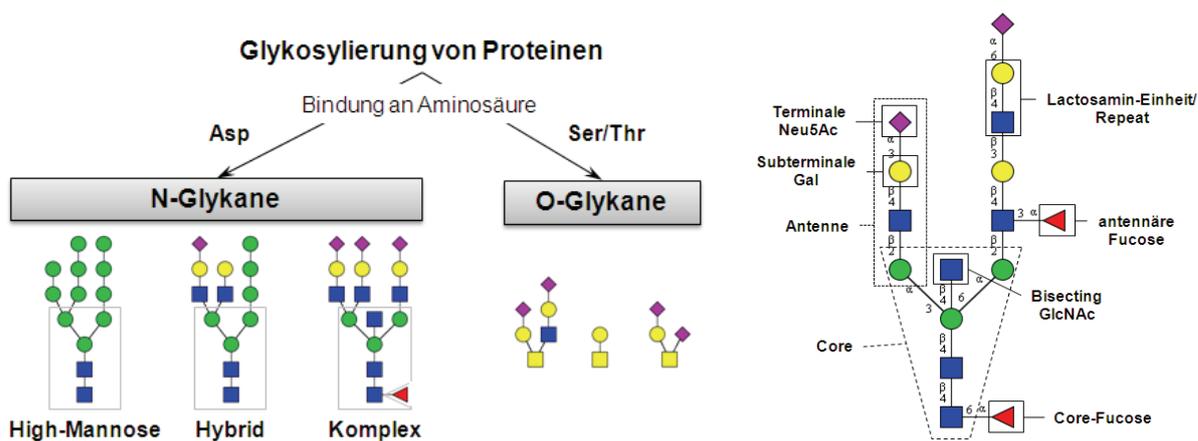


Abbildung 6: Strukturbeispiele für N- bzw. O-Glykane von Proteinen

Aufgrund der unterschiedlichen Monosaccharid-Zusammensetzungen werden drei Haupttypen von N-Glykanen unterschieden (Abbildung 6). Die Core-Struktur mit weiteren Mannosen wird als Mannose-reich und mit Antennen aus GalNAc-Gal-Einheiten (bzw. zusätzlichen Monosacchariden) als komplex bezeichnet. Die auftretenden Oligosaccharide mit Eigenschaften beider Varianten sind Hybride.

Die Biosynthese der N-Glykane verläuft über mehrere Schritte (Rademacher *et al.*, 1988; Dwek *et al.*, 1993; Butters, 2002) und ist im Vergleich zu den O-Glykanen sehr komplex aufgebaut. Das Oligosaccharid entsteht nicht von Beginn an am Peptid, sondern zuerst an einem Dolicholosphat-Molekül (Dol-P) (Abbildung 7).

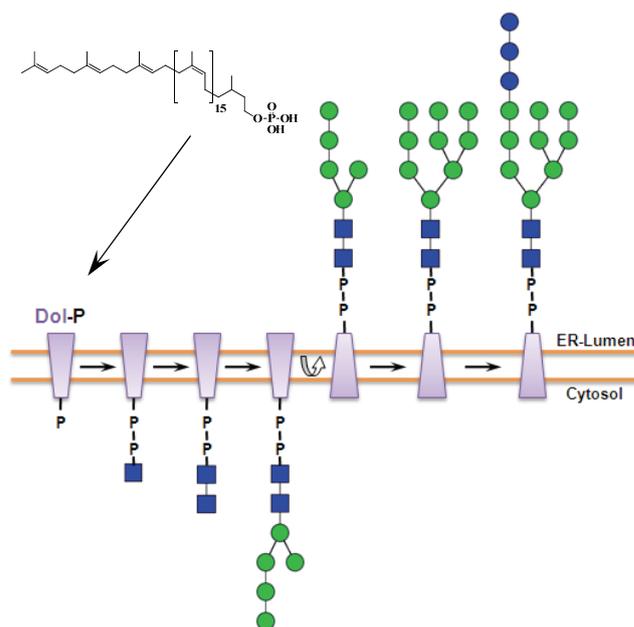
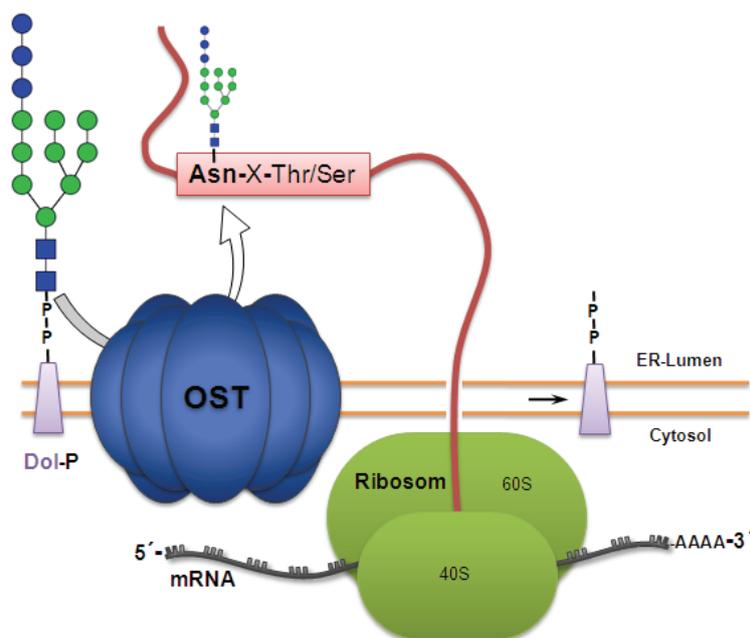


Abbildung 7: Biosynthese des N-Glykan-Vorläufers

Der Komplex aus Dol-P und dem Oligosaccharid wandert während des Prozesses vom Cytosol in das ER-Lumen

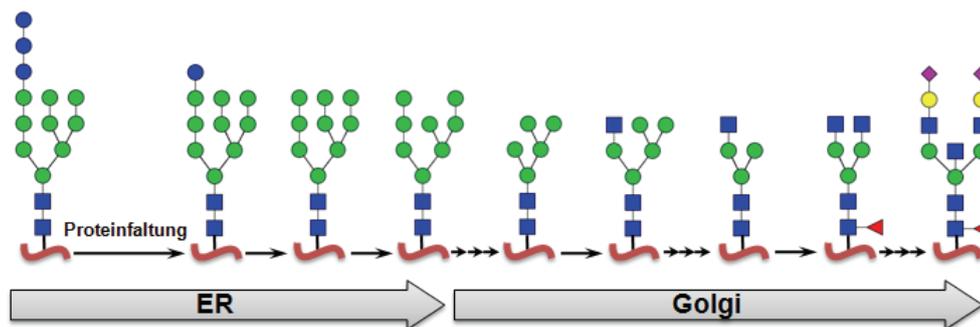
Dieses ist aufgrund der 20 Isopren-Einheiten in der Membran des endoplasmatischen Reticulums (ER) verankert und trägt am terminalen Ende eine Phosphat. An dieses überträgt die GlcNAc-1-Phosphotransferase das erste und die GlcNAc-Transferase das zweite GlcNAc-Molekül des Core (Ruddock & Molinari, 2006). Nach dem Hinzufügen von weiteren fünf Mannosen wandert die gesamte Struktur von der cytosolischen Seite des ER zu dessen Lumen. Dieser „Flip-Flop“-Mechanismus ist bisher nicht geklärt. Es leitet die Aktivität weiterer Glykosyltransferasen ein (Clausen *et al.*, 1992; Lairson *et al.*, 2008). Die Synthese des Glykan-Vorläufers am Dol-P ist nach der Übertragung von vier Mannosen und drei Glucosen abgeschlossen.

Die Aminosäure-Sequenz Asn-X-Thr/Ser stellt die Konsensussequenz zur Bindung eines N-Glykans dar (Carr *et al.*, 1990; Mellquist *et al.*, 1998), jedoch werden nur ca. 30% wirklich dafür genutzt (Varki *et al.*, 1998; Nilsson & von Heijne, 2000). Der Transfer des Oligosaccharides auf das in das ER translatierte Protein erfolgt durch die Oligosaccharyltransferase (OST, Abbildung 8), welche einen Komplex aus mehreren verschiedenen Untereinheiten bildet (Silberstein & Gilmore, 1996; Knauer & Lehle, 1999; Shibatani *et al.*, 2005; Igura *et al.*, 2008).



**Abbildung 8:** Übertragung des unreifen N-Glykans durch die Oligosaccharyltransferase vom Dol-P auf das Asparagin des Proteins

Nach der Abspaltung einer Glucose durch die Glukosidase I und einer weiteren durch die Glucosidase II (Abbildung 9) binden Calnexin und Calreticulin unter Erkennung der Kohlenhydrat-Strukturen an das Protein und vermitteln dessen Faltung.



**Abbildung 9: Prozessierung des N-Glykan im ER und im Golgi zur Synthese einer komplexen biantennären Struktur mit Core-Fucose, Bisecting GlcNAc und Neu5Ac-Sialylierung an jeder Antenne**

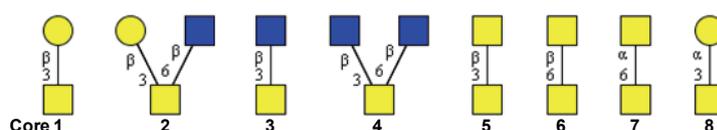
Nach der Abspaltung der dritten Glucose durch die Glucosidase II kann dieser Prozess beendet werden. Wird durch einen bisher unbekannt Sensor eine unvollständige oder nicht korrekte Faltung festgestellt, erfolgt wieder der Transfer einer Glucose auf das Oligosaccharid durch eine Glykosyltransferase. Dies ist die Voraussetzung zur wiederholten Bindung von Calnexin/Calreticulin zur Reorganisation der Aminosäurenkette (Parodi, 2000; Shental-Bechor & Levy, 2008). Als Resultat liegt ein korrekt gefaltetes Glykoprotein vor. Ist dieses nicht der Fall, wird es der deglykosyliert und abgebaut.

Das „Trimming“ der Mannosen, welches im ER und dann im Golgi stattfindet, führt zu einer Core-ähnlichen Struktur, die die Grundlage für Mannose-reiche, Hybrid- und komplexe Strukturen ist. Die endgültige Prozessierung hängt von den vorhandenen Glykosyltransferasen, dem Typ und Konzentration an aktivierten Monosacchariden und dem zeitlichen Verlauf ab (Kobata, 1992; Frigerio & Lord, 2000; Frenkel *et al.*, 2003; Ruddock & Molinari, 2006).

#### 1.1.4. O-Glykane

Im Vergleich zur N-Glykosylierung erfolgt der Strukturaufbau direkt am Protein (van den Steen *et al.*, 1998; Novak *et al.*, 2000). Bislang ist keine Konsensussequenz für die O-glykosidisch gebundenen Kohlenhydrate bekannt. In CHO-Zellen konnte jedoch eine Erhöhung der O-Glykosylierung mit dem Aminosäure-Motiv AATPAP nachgewiesen werden (Asada *et al.*, 1999).

Durch den Vergleich der bisher charakterisierten O-Glykane ließen sich die 8 verschiedenen Grundstrukturen der Abbildung 10 formulieren.



**Abbildung 10: Die Core-Strukturen von O-Glykanen**

Deren Synthese wird durch die Aktivität einer Polypeptid-GalNAc-Transferase initiiert. Die weiteren Modifikationen werden jedoch durch Core-spezifische Enzyme vorgenommen (van den Steen *et al.*, 2000; Peter-Katalinic, 2005).

## 1.2. Biologische Funktionen von Glykanen und Sialinsäuren

Die biologische Relevanz des Glykoms ist Bestandteil der aktuellen Forschung (Nagai, 2002; Weiss & Iyer, 2007). Dabei werden die Glykosylierungen strukturell charakterisiert und in ihrem funktionellen Umfang erfasst (Kobata, 2000; Schäffer *et al.*, 2001; Dell, 2002). Bei folgenden Prozessen spielen Glykane bzw. der Zuckeranteil von Glykokonjugaten eine entscheidende Rolle: die Vermittlung von Zellkontakten (Marshall & Haskard, 2002), Prozesse des Immunsystems zur Identifizierung endogener und exogener Faktoren (Rudd *et al.*, 2001), die korrekte Faltung von Proteinen (Parodi, 2000), sowie deren Stabilität (Shental-Bechor & Levy, 2008) und entwicklungsbiologische Funktionen (Haltiwanger & Lowe, 2004). Das Vorkommen auf Viren (Suzuki *et al.*, 2000), Bakterien (Tuomanen, 1996), Pflanzen (Ahn *et al.*, 2008), eukaryotischen Einzellern (Hamilton *et al.*, 2006) bis zu den Vertebraten (Wuhrer *et al.*, 2007) und damit nachgewiesenen Variationen deuten auch auf eine Beteiligung an evolutionären Entwicklungen (Silberstein & Gilmore, 1996; Alper, 2001; Angata & Varki, 2002; Harduin-Lepers *et al.*, 2005; Varki, 2006).

Aufgrund der terminalen Position der Sialinsäure ist dieses Monosaccharid an jeder Interaktion des Glykans direkt beteiligt und spielt somit eine zentrale Rolle für viele biologische Abläufe an Zelloberflächen. Die negative Ladung führt zu Abstoßungen zwischen Zellen oder von der extrazellulären Matrix (Shimamura *et al.*, 1994) und die hohe Vielfalt der Sialinsäuren ermöglicht vielfältige Interaktionen mit Bindungspartnern (Lasky, 1995; Vestweber & Blanks, 1999; McEver, 2002).

Die Zelladhäsion ist ein essentieller Prozess bei der Gewebedifferenzierung, bei Entzündungsreaktionen und Metastasierungen. Diese werden durch Selektine (Rainer, 2002; Ley, 2003; Zollner & Asadullah, 2003; Alon & Rosen, 2007) vermittelt, die auf Leukocyten, Endothelzellen und Thrombocyten exprimiert werden und an spezifische sialylierte Strukturen (Sialyl-Lewis<sup>x,a</sup>) binden (Varki, 2007). Die Einwanderung von Leukocyten bei Entzündungsreaktionen beginnt mit dem Anheften an das Gefäßendothel und dem anschließenden „Rolling“ bis die Zelle in das Gewebe einwandert (Sperandio *et al.*, 2003; Hordijk, 2006; Alon & Rosen, 2007). Die Veränderung der Glykosylierung von Zellen ändert sich in Abhängigkeit vom Alter der Zelle und ist somit eine wichtige Grundlage für die Ontogenese und weitere

Differenzierungen innerhalb von Organismen (Schwarzkopf *et al.*, 2002; Kobata, 2003; Haltiwanger & Lowe, 2004).

Die exprimierten Glykane stellen jedoch auch gleichzeitig Zielstrukturen für Pathogene dar (Varki, 1997; Weiss & Iyer, 2007). Beispielsweise besitzen Influenza-Viren ein Sialinsäure-bindendes Lektin, das Hämagglutinin, welches spezifisch Neu5Ac-Gal-Strukturen erkennt und den Eintritt in die Zelle vermittelt (Suzuki *et al.*, 2000; Chandrasekaran *et al.*, 2008). Die metabolische Modifikation der N-Acetyl- zu einer N-Propionyl-Gruppe der Sialinsäuren (s. auch 1.3) führte zu einer starken Reduktion der Affinität zwischen Virus und Zielzelle (Herrmann *et al.*, 1997; Keppler *et al.*, 1998). Die verschiedenen Influenza-Stämme unterscheiden sich durch die Bindungsspezifitäten der Hämagglutinine, wodurch der Sialylierungstyp eines Organismus über die Pathogenität des Virus entscheidet. Eine fehlende Neu5Ac-Expression auf der Geweboberfläche führt zu einer Resistenz. Der Mensch weist in den oberen Bereichen der Luftwege nur eine  $\alpha$ 2-6-Sialylierung auf, so dass H5N1-Viren der Vogelgrippe ( $\alpha$ 2-3-spezifisch) nicht binden können. Die unteren Lungenregionen zeigen eine  $\alpha$ 2-3-Verknüpfung der Neu5Ac (Varki & Varki, 2007; Weiss & Iyer, 2007). Eine Infektion ist hier aber durch die Länge der respiratorischen Wege erst durch hohe Dosen viraler Partikel möglich, wodurch Infektionen nur bei Personen mit längerem und direktem Kontakt mit infizierten Vögeln auftraten. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch wurde nicht beobachtet, da die Virusmenge zu gering war, um in die entsprechenden Bereiche der Lunge vorzudringen. Eine größere Gefahr durch dieses Virus wäre nach einer spontanen Mutation oder einem horizontalen Gentransfer zu befürchten, welche(r) eine  $\alpha$ 2-6-Spezifität induziert. Diese war vermutlich auch die Ursache der Influenza-Pandemie im Jahr 1918, bei welcher der Virus vermutlich beide Verknüpfungstypen erkannte (Russell & Webster, 2005). Auch einzellige Parasiten wie *Shigella dysenteriae* (Tripper) oder *Plasmodium falciparum* (Malaria) binden an die Wirtszellen mittels sialylierter Glykan-Strukturen. Dies trifft auch auf die Wirkung einiger Toxine zu, wie z.B. für das Botulinum-, Tetanus-, das Shigella- und das Cholera-Toxin (Weiss & Iyer, 2007).

*Trypanosoma cruzi*, der Erreger der Chagaskrankheit, nutzt die Sialinsäuren des Wirtsorganismus für die Maskierung der eigenen antigenen Strukturen. Diese können dann aufgrund der Aktivität der Sialyltransferase nicht mehr vom Immunsystem erkannt werden und der Einzeller bewegt sich innerhalb des Organismus (Colli, 1993; Schenkman *et al.*, 1994). Die Methode der Antigen-Maskierung wird auch im Falle der Embryonalentwicklung im Interesse des Organismus verwendet. Die *Zona pellucida* der Blastocyste (Schauer, 1985) ist stark sialyliert und entzieht sich somit dem mütterlichen Immunsystem.

Ein weiteres Beispiel für die Funktion der Sialinsäure ist die Verhinderung des Abbaus von Serum-Glykoproteinen und Antikörper-Komplexen (Morell *et al.*, 1971; Steer & Ashwell, 1980). Diese werden nach dem Verlust der terminalen Sialinsäuren vom Asialoglykoproteinrezeptor

(ASGPR, Ashwell-Rezeptor) gebunden, endocytiiert und abgebaut (Ashwell & Harford, 1982; Weiss & Ashwell, 1989; Stockert, 1995). ASGPR ist neben anderen Kohlenhydrat-Rezeptoren (Kawasaki & Ashwell, 1977; Steer & Ashwell, 1986; Weis *et al.*, 1992; Ng *et al.*, 1996) in der Leber lokalisiert und regelt die Menge der im Serum vorhandenen nicht sialylierten Glykokonjugate (Stockert *et al.*, 1991; Treichel *et al.*, 1995; Keck *et al.*, 2008). Für eine längere Verweildauer eines Glykoproteins muss dieses hochsialyliert sein und/oder einer schnellen Desialylierung durch Sialidasen entgehen. Dieser Sachverhalt war Grundlage für die durchgeführten Versuche dieser Arbeit.

Aufgrund der fortschreitenden Forschung in der Glykobiologie wurde deren Relevanz in biochemischen Prozessen und somit für medizinische Anwendungen deutlich (Ramberg, 2000; Alper, 2001; Freeze, 2002; Werz & Seeberger, 2005; Borman, 2007; Kilcoyne & Joshi, 2007). Zur Entwicklung von Pharmazeutika ergaben sich verschiedene Zielstrukturen (Raju *et al.*, 2001; Shriver *et al.*, 2004; Bosques *et al.*, 2006; Kaneider *et al.*, 2006; Opendakker *et al.*, 2006) z.B. für die Behandlung von Tumoren (Dennis & Laferte, 1985; Kageshita *et al.*, 1995; Ohyama *et al.*, 1999; Magnani, 2004; Kobata & Amano, 2005) oder Behandlung bzw. Vorbeugung von pathogenen Infektionen (Colli, 1993; Ming *et al.*, 1993; Keppler *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2000; Russell & Webster, 2005; Chandrasekaran *et al.*, 2008; Kamena *et al.*, 2008; Packer *et al.*, 2008). Außerdem wurden als Ursache für einige Krankheiten eine veränderte oder fehlende Glykosylierung festgestellt (Weiss *et al.*, 1989; Kobata, 1998; Freeze, 2001; Mahdavi *et al.*, 2002; Ley, 2003; Vlassara, 2005; Vakhrushev *et al.*, 2006; Varki & Varki, 2007).

### 1.3. Modifikation von Glykan-Strukturen

Für die Untersuchung der Funktion von Glykanen, die Isolierung definierter Strukturen und pharmazeutische Anwendungen ist die gezielte Veränderung der Oligosaccharide essentiell. Dabei werden verschiedene Methoden angewandt, die entweder durch die Beeinflussung der Biosynthesewege von Glykanen oder der Modifikation bereits exponierter Oligosaccharide Anwendung finden. Eine weitere Möglichkeit ist die chemische Synthese von Oligosacchariden, die eine vollständige Kontrolle zulässt, jedoch auch zeitaufwendiger ist (Seeberger *et al.*, 1996; Plante *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2006; Kamena *et al.*, 2008; Seeberger, 2008). Die Kohlenhydrate können von isolierten Glykoproteinen mit spezifischen Enzymen, wie z. B. Galactosyl- und Sialyltransferasen, behandelt werden, um den Anteil an Sialinsäuren zu erhöhen (Raju *et al.*, 2001). Außerdem wurde die chemische Modifikation von Glykanen an der Oberfläche von Zellen mit Erfolg durchgeführt (Tolvanen & Gahmberg, 1986; Bork *et al.*, 2007).

Der Großteil der Methoden richtet sich auf die Beeinflussung der Biosynthese, die durch Veränderungen innerhalb der Glykom-relevanten Enzyme (Brooks, 2004) oder durch

Substratanaloga erreicht wird (Kayser *et al.*, 1992). Die Expression von Glykoproteinen ist in vielen Organismen möglich: in pflanzlichen Zellen (Schahs *et al.*, 2007; Ahn *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2008; Strasser *et al.*, 2008), in Insekten-Zellen (Altmann *et al.*, 1999; Harrison & Jarvis, 2006), Hefen (Hamilton *et al.*, 2006; Blanchard *et al.*, 2008) und Säugetier-Zellen (Grabenhorst *et al.*, 1999). Da die Anwendung von Glykoproteinen unter medizinischen Aspekten im Vordergrund steht, muss eine Biosynthese von Strukturen mit humanen Eigenschaften angestrebt werden. Um eine antigene Wirkung zu vermeiden, werden im jeweiligen nicht-humanen Expressionssystem vorhandene Gene für Enzyme deletiert, integriert oder verändert. Der schrittweise Aufbau eines Glykosylierungs-Apparates nach humanem Bauplan ist das Ziel dieser Arbeiten (Raju, 2003; Brooks, 2004).

Die auch für diese Arbeit relevante Möglichkeit zur Modifikation von Glykanen ist die Zugabe von Monosaccharid-Analoga. Ein neues Gebiet der Sialinsäureforschung entstand durch die Verwendung von N-Acetylhexosamin-Derivaten. Diese besaßen an der Acetyl-Seitenkette eine zusätzliche Methylengruppe, deren Einfluss auf die Metabolisierung mittels der entsprechenden Biosynthese-Enzyme von Interesse war. N-Propionylglucosamin und besonders N-Propionylmannosamin wurden, wie das normale N-Acetylhexosamin, in die zugehörige Neuraminsäure N-Propionylneuraminsäure überführt (Grünholz *et al.*, 1981; Kayser *et al.*, 1992; Keppler *et al.*, 2001).

Der erfolgreiche Einbau dieser Sialinsäure-Vorläufer erfolgte durch den Nachweis der resultierenden nicht-physiologischen Sialinsäuren (Abbildung 28, S. 75) in isolierten Glykanen sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* (Kayser *et al.*, 1992; Keppler *et al.*, 2001). In Abhängigkeit von der verwendeten Acyl-Gruppe konnte die Bindung zwischen Polyoma-Viren und deren Rezeptoren auf Zellen sowohl inhibiert, als auch gefördert werden, so dass die Affinität durch Modifikation der N-Acyl-Gruppe am C-5-Atom bestimmt wurde (Keppler *et al.*, 1995). Die Veränderung der Halblebenszeit konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Im Falle des CEACAM1 erhöhte sich diese von 24 auf 40 Stunden (Horstkorte *et al.*, 2001). Mit der gleichen Zielstellung wurde das Molekül TNFR-IgG durch die direkte Behandlung mit einer Sialyltransferase behandelt und somit eine erhöhter Sialylierungsgrad erzielt (Raju *et al.*, 2001; Keck *et al.*, 2008).

Die Verwendung der nicht-physiologischen Sialinsäure-Vorläufer zeigte auch eine Limitierung der Seitenketten-Modifikation. Weist diese mehr als fünf C-Atome auf, kommt es zu einem dramatischen Abfall der Einbauraten, welcher auf eine reduzierte ManNAc-6-kinase-Affinität der GNE (Blume *et al.*, 2004; Ghaderi, 2006; Reinke, 2008) zurückzuführen war (Jacobs *et al.*, 2001). Die C-5-ständige N-Acyl-Modifikation der neuartigen Sialinsäuren hat auch einen Einfluss auf weitere Enzyme des Glykosylierungssystems. In eukaryotischen Zellen wurden für verschiedene Sialyltransferasen auch differentielle Substrat-Affinitäten zu den Analoga festgestellt (Horstkorte *et al.*, 2004; Horstkorte *et al.*, 2004; Bork *et al.*, 2007). Der Genotyp der Sialuria, einer Krankheit

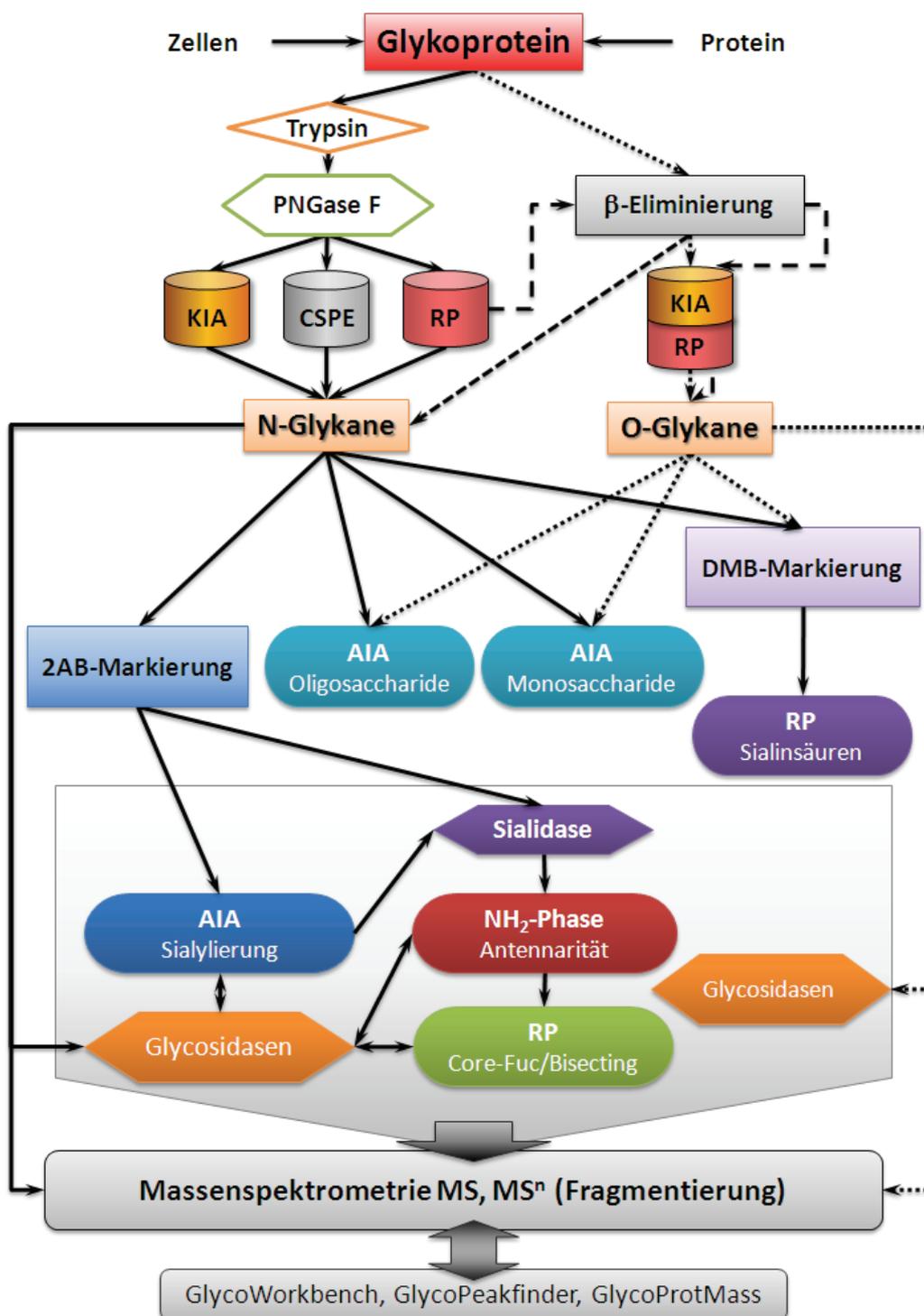
mit einer unkontrollierten Sialinsäure-Synthese, war die Grundlage für die Herstellung einer GNE-Mutante in CHO-Zellen. Diese kann nicht mehr durch CMP-Neu5Ac gehemmt werden (Abbildung 5) und die isolierten Proteine (EPO) wiesen eine nahezu vollständige Sialylierung auf (Bork *et al.*, 2007). Die *in vivo*-Versuche zum Einbau von N-Propanoylmannosamin in Mäusen verliefen positiv und zeigten eine Gewebeabhängigkeit (Gagiannis *et al.*, 2007). Die daraus mögliche Anwendung wäre die Markierung von Tumoren, die oft eine höhere Sialylierung aufweisen. Dieses könnte sowohl der Lokalisierung, als auch der Behandlung der Gewebeveränderung dienen. Ein direkter Einfluss der Sialinsäuren auf die Gen-Expression wurde auch für Analoga nachgewiesen (Kontou *et al.*, 2008). Die verwendeten PC 12-Zellen zeigten durch die Zugabe von N-Acetyl- oder N-Propanoylmannosamin eine gesteigerte neuronale Differenzierung.

Der Einbau des Galactose-Analogons 2-Desoxy-Galactose (2dGal) (Abbildung 29, S. 76) wurde sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* nachgewiesen (Smith & Keppler, 1977; Büchsel *et al.*, 1980; Geilen *et al.*, 1992; Kannicht, 1995; Lorenzini *et al.*, 1997). Die dabei in sehr geringem Maße entstehende 2-Desoxy-Glucose (Schmidt *et al.*, 1974) ist ein wirksamer Glykosylierungs-Inhibitor (Smith & Keppler, 1977). Die Supplementation mit 2dGal führte zu einer erniedrigten 1,2-Fucosylierung (Büchsel *et al.*, 1980; Geilen *et al.*, 1992).

#### **1.4. Analytische Methoden zur Glykan-Charakterisierung**

Für die Charakterisierung von Protein-gebundenen Glykanen mussten diese aus den Glykoproteinen isoliert werden (Kobata, 1992; Dell, 2002; Harvey, 2005). Ein Schema zur Vorgehensweise und der anwendbaren analytischen Methoden zeigt die Abbildung 11. Die Freisetzung der Oligosaccharide erfolgte für die N-Glykane enzymatisch (Tarentino *et al.*, 1985; Nuck *et al.*, 1990) oder wie für die O-Glykane chemisch (Huang *et al.*, 2002; Dell *et al.*, 2003; Peter-Katalinic, 2005). Die Kombination beider Methodenerlaubte die Separation der beiden Glykosylierungs-Varianten. Die anschließenden Aufreinigungen dienten der Entsalzung und dem Entfernen von Proteinen. Der weitere Weg der Analytik wurde in Abhängigkeit von der Fragestellung zur Probe festgelegt (Geyer & Geyer, 2006). Falls nur der Nachweis der Existenz von Glykosylierungen oder deren schnelle Beurteilung notwendig war, konnten die isolierten Oligosaccharide mittels Massenspektrometrie (MS) (Dell & Morris, 2001; Harvey, 2001; Zaia, 2004; Morelle & Michalski, 2007) und Monosaccharid-Analyse (Hermentin *et al.*, 1992; Thayer *et al.*, 1998) charakterisiert werden. Für die Erstellung eines Glykan-Profiles und spezielle Struktur-Differenzierungen mussten die Strukturen erst mit einem fluoreszierenden Molekül markiert werden. Dies war notwendig, da Kohlenhydrate unter nativen Bedingungen keine ausgeprägten Eigenschaften für die Detektion aufweisen. Mit der 1,2-Diamino-4,5-methylen-

dioxybenzen (DMB)-Derivatisierung konnten die Sialinsäuren nachgewiesen und quantifiziert werden (Manzi *et al.*, 1990; Anumula, 1995).



**Abbildung 11: Schematische Übersicht zur Isolierung von Glykanen aus Proteinen und deren Analytik**  
 Die graphischen Formen geben die folgende Methodik wieder: Enzym HPLC-Chromatographie  
 KIA=Kationenaustauscher, AIA=Anionenaustauscher, CSPE=Carbograph-Festphasenextraktion, RP=Umkehrphase, 2AB=2-Aminobenzamid und DMB=1,2-Diamino-4,5-methyldioxybenzen sind fluoreszierende Derivatisierungen

Für die Charakterisierung der Oligosaccharide wird 2-Aminobenzamid (2AB) verwendet (Merry *et al.*, 2002; Nuck, 2002). Die direkte Auftrennung der lichtsensitiven Derivate ermöglicht die Beurteilung der Sialylierung, d.h. es resultierten Chromatogramme mit jeweils einem Signalebereich für Glykane mit einer, zwei, drei oder vier Sialinsäuren. Die dabei nicht erkennbare Antennarität konnte erst nach der Sialidase-Behandlung untersucht werden. Die neutralen markierten Strukturen wurden mit Hilfe einer Amino-Phase separiert und waren zur Analyse der Fucosylierung und/oder des Bisecting GlcNAc auf Grundlage einer Umkehr-Phase zu analysieren. Die resultierenden Oligosaccharide der einzelnen HPLC-Auftrennungen konnten mit spezifischen Enzymen behandelt und somit auf die An- bzw. Abwesenheit bestimmter Monosaccharide untersucht werden. Für jeden Schritt der 2AB-markierten Glykane waren Überprüfungen und Charakterisierungen mittels MS möglich. Die verwendete Massenspektrometrie-Methode richtete sich nach Probenotyp, -menge und Fragestellung (Reinhold *et al.*, 1995; Harvey, 1999; Dell & Morris, 2001; Zhang *et al.*, 2006). Die Geräte-abhängige Fragmentierung (Naven *et al.*, 1997; Mechref & Novotny, 1998; Harvey *et al.*, 2004; Lattova *et al.*, 2004; Morelle *et al.*, 2004; Harvey, 2005) diente der Bindungs- und Positions-Charakterisierung der Glykanbestandteile und ist aufgrund der Komplexität nur mit entsprechenden Anwendungen auszuwerten (von der Lieth *et al.*, 2004; Lütkeke *et al.*, 2006; von der Lieth *et al.*, 2006; Packer *et al.*, 2008). Diese sind aufgrund der sich in der Entwicklung befindenden Thematik noch nicht Bestandteil der Geräte-Software, so dass im Internet verfügbare Programme und Datenbanken aus Forschungs-Projekten verwendet werden. Die Grundlage für die Spektren-Analyse stellten die Anwendungen GlycoWorkbench (Ceroni *et al.*, 2007; Ceroni *et al.*, 2008), der GlycoPeakfinder (Maass *et al.*, 2007) und GlycoProtMass (diese Arbeit) dar.