

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Biochemische *in vivo* - Modulation von Sialoglykokonjugaten
und deren biologische Konsequenzen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Daniel Gagiannis
aus Gera

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W. Reutter
2. Prof. Dr. med. E. Köttgen
3. Prof. Dr. rer. nat. S. Kelm

Datum der Promotion: 19.09.2008

Ich widme diese Arbeit
meinen geliebten Eltern
und der tollsten Ehefrau auf dieser Welt.

Geduld ist für den Geist am schwersten ... alle Natur, alles Wachstum, aller Frieden, alles Gedeihen und Schöne in der Welt beruht auf Geduld, braucht Zeit, braucht Stille, braucht Vertrauen, braucht den Glauben an langfristige Dinge und Prozesse. (*Hermann Hesse*)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	8
1.1 Struktur von Sialinsäuren	8
1.2 Biosynthese von Sialinsäuren	9
1.2.1 Biosynthese von UDP-GlcNAc	9
1.2.2 Biosynthese von CMP-Neu5Ac	11
1.2.3 Biosynthese von sialylierten Oligosaccharidketten	14
1.3 Vorkommen von Sialinsäuren	15
1.4 Biologische Funktionen von Sialinsäuren	18
1.4.1 Adhäsion und Zell-Zell-Interaktion	18
1.4.2 Sialinsäuren als Erkennungsdeterminanten für Pathogene	26
1.4.3 Maskierung antigener Determinanten	27
1.4.4 Einfluss auf die Struktur und Funktion von Glycokonjugaten	28
1.4.5 Die Rolle der Sialinsäuren im Tumorstoffwechsel	29
1.5 Einsatz von Sia-Analoga	30
1.5.1 Grundprinzip des „Biochemical Engineering“	30
1.5.2 Einfluss der Modifikationen auf biologische Prozesse <i>in vitro</i>	31
1.6 Zielsetzung der Arbeit	35
2 Material und Methoden	36
2.1 Material	36
2.1.1 Chemikalien	36
2.1.2 Versuchstiere	36
2.1.3 Zelllinien	36
2.1.4 Antikörper	36
2.1.5 Kits und Marker	37
2.1.6 Nährmedien	37
2.1.7 Puffer und Lösungen	37
2.1.8 Geräte	41
2.1.9 Sonstiges	41
2.2 Methoden	42
2.2.1 Zellbiologische Methoden	42
2.2.2 Allgemeine proteinbiochemische Methoden	42
2.2.3 Spezielle Methoden	50

3 Ergebnisse	55
3.1 Quantitative Bestimmung der Sialinsäuren	55
3.1.1 Verteilung der natürlichen Sialinsäuren <i>in vivo</i>	55
3.1.2 Verteilung von Sialinsäuren in heterozygot GNE-defizienten Mäusen	56
3.1.3 Veränderung des Sialinsäuregehaltes nach Behandlung mit ManNAc	58
3.1.4 Veränderung des Sialinsäuregehaltes unter ManNProp-Behandlung	60
3.1.5 Veränderung des Sialinsäuregehaltes unter ManNPent-Behandlung	64
3.2 Organabhängiger Einbau von NeuNProp in die Membranen	65
3.2.1 Austausch natürlicher Sia in Abhängigkeit von der Behandlungszeit (WT)	65
3.2.2 Epimerase-knock-out-Mäuse nach 4 Tagen ManNProp.....	66
3.3 Untersuchung der Tiere bezüglich beobachteter „Nebenwirkungen“	67
3.3.1 Aktivitätssteigerung nach ManNProp-Behandlung	67
3.3.2 Veränderung der NCAM-Polysialylierung	68
3.3.3 Anstieg der Testosteronkonzentration im Serum behandelter Mäuse.....	71
3.3.4 Weitere Labordiagnostik	76
3.3.5 Histologische und (immun-)histochemische Analysen der Organe.....	76
3.3.6 Verhaltenstests.....	76
3.4 Analyse der Myelin-assoziierten Proteine	81
3.4.1 Veränderung von MBP und MOG <i>in vivo</i>	81
3.4.2 Veränderung des Phosphorylierungszustandes von Proteinen in Oli-neu-Zellen	82
4 Diskussion	84
4.1 Pharmakokinetisches Verhalten von ManNProp	84
4.2 Beobachtungen an heterozygoten GNE-Mangel-Mäusen	86
4.3 Polysialylierung von NCAM	87
4.4 Anstieg von Serum-Testosteronkonzentration und Spermatogenese	88
4.5 Verhaltens- und Hirnleistungsänderungen	91
4.6 Analyse Myelin-assoziiertes Proteine	91
4.7 Phosphorylierungszustand von Proteinen in Oli-neu-Zellen	94
5 Zusammenfassung	95
6 Lebenslauf	97
7 Danksagung	98
8 Literaturverzeichnis	99

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Arp	Actin-Related-Protein
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserum-Albumin
CAM	Cell-Adhesion-Molecule
CD	Cluster-of-Differentiation
CEACAM	Carcinoembryonic-Antigen-Related-Cell-Adhesion-Molecule
CNP	2'3'-zyklische Nukleotid-3'-Phosphodiesterase
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Grundmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GAM	Goat-anti-Mouse
GAR	Goat-anti-Rabbit
GNE	UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
HT	Heterozygot
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IP3	Inositoltrisphosphat
kDa	Kilodalton
kg KG	je Kilogramm Körpergewicht
MALDI-TOF-MS	Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization Time-of-Flight
mRNA	Messenger-RNA
MAG	Myelin-assoziiertes Glycoprotein
ManNProp	N-Propanoylmannosamin

ManNPent	N-Pentanoylmannosamin
MBP	Myelin basisches Protein
mCgb	Choriongonadotropin beta (Maus)
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glycoprotein
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NCAM	neurales Zelladhäsionsmolekül
NGF	Nerve-Growth-Factor (Nerven-Wachstumsfaktor)
OMgp	Oligodendrozyten-Myelin Glycoprotein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween20
PC12-Zellen	Pheochromocytoma-Zellen
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PDGF	Thrombozytenwachstumsfaktor (Platelet derived growth factor)
PLL	Poly-L-Lysin
PLP	Proteolipid Protein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	peripheres Nervensystem
PND	Post-Natal-Day
PSA	Polysialinsäure (Polysialic acid)
PST	Polysialyltransferase
RAM	Rabbit-anti-Mouse
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rounds-per-Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium-Dodecyl-Sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
SHBG	Sexualhormonbindeglobulin
Sia	Sialinsäuren
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TX100	TritonX100
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Struktur von Sialinsäuren

Unter dem Begriff Sialinsäuren fasst man eine große Gruppe saurer Aminozucker zusammen, deren Grundgerüst aus neun Kohlenstoffatomen besteht. Eine entsprechende Carboxylgruppe findet man an Position C-2, die Aminogruppe am C-5 (Abb. 1.1). Bleibt es bei dieser Konstellation, so bezeichnet man die Verbindung als Neuraminsäure. Jene unsubstituierte Form tritt in der Natur allerdings nur äußerst selten auf (Manzi et al. 1990). In den meisten Fällen wird die Aminogruppe acetyliert, so dass *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) entsteht. Diese ist nicht nur die häufigste Form, sondern auch biologischer Vorläufer für nahezu alle der 50 natürlich vorkommenden Sialinsäuren (Angata and Varki 2002). Die bisher bekannten Derivate unterscheiden sich dabei lediglich durch die Art des Aminosubstituenten sowie durch Anzahl, Position und Kombination von Hydroxylsubstituenten am C-4, C-7, C-8 und C-9. So können die Hydroxylgruppen durch Acetyl-, Lactoyl-, Methyl-, Sulfonyl- oder Phosphonylgruppen modifiziert (Schauer et al. 1995) und der Acetylrest der Aminogruppe zum Glycolylrest hydroxyliert werden (Schauer et al. 1968; Varki 1992). Letzteres erfolgt im Cytosol, alle weiteren Modifikationen finden nach der Übertragung der Sialinsäure auf das Oligosaccharid des Glycokonjugates im trans-Golgi-Netzwerk der Zelle statt. Die Nomenklatur zur Beschreibung der verschiedenen Substitutionen und Konformationen ist in Tabelle 1.1 dargestellt. In Lösung bilden Sialinsäuren durch intramolekulare Kondensation spontan einen Pyranosering zwischen C-2 und C-6 aus. Es entsteht ein Halbketal. Dabei liegen die an ein Glycokonjugat gebundenen Sialinsäuren meist in der α -Konformation, die aktivierten Nukleotidzucker der Sialinsäure, CMP-Neu5Ac, hingegen in der β -anomeren Form vor (Kolter and Sandhoff 1997).

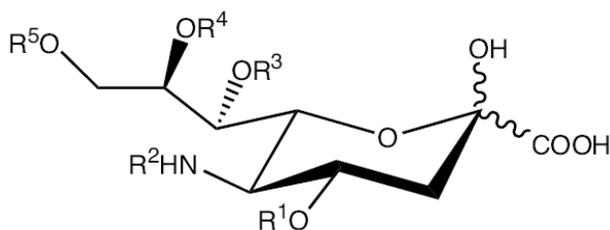


Abbildung 1.1 Struktur von Sialinsäuren

Die Kernstruktur wird als Neuraminsäure bezeichnet. Erfolgt eine *N*-Acetylierung am C-5 (R^2 = Acetylgruppe) nennt man die Verbindung Neu5Ac. Hier liegen alle Hydroxylfunktionen unmodifiziert vor. Sie kann durch verschiedene O-Substituenten (Acetyl-, Lactoyl-, Methyl-, Sulfonyl- und Phosphonylgruppen an R^1 , R^3 , R^4 , R^5) in die anderen Formen überführt werden.

Tabelle 1.1 Nomenklatur der Sialinsäuren:

Abkürzung	Bedeutung
Neu	Kernstruktur Neuraminsäure
Ac	Acetylierte Aminogruppe
Gc	Glycolylierte Aminogruppe
Zahlen	Geben Auskunft über die Lokalisation in Relation zur 9-Kohlenstoff Position, z.B. Neu5Ac
X	Steht an der Stelle einer Zahl, wenn eine Substitution zwar vorhanden, der Typ allerdings unbekannt ist, z.B. SiaX
Sia	Allgemeine Abkürzung für Sialinsäuren, wenn der genaue Typ nicht bekannt ist

1.2 Biosynthese von Sialinsäuren

Der größte Teil der Zucker, die für die Synthese von Glycokonjugaten benötigt werden, stammt aus dem Aminozuckerstoffwechsel der Zellen. Von zentraler Bedeutung ist hierbei das UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc). Es ist nicht nur wichtig für die Synthese der Oligosaccharidketten von N-Glycanen, O-Glycanen und Glycolipiden, sondern auch für die Herstellung von Proteoglycanen und Glycosylphosphatidylinositolen. In den letzten Jahren erlangte auch die Modifikation von cytosolischen Proteinen und Kernproteinen mit O-GlcNAc immer mehr Bedeutung. Diese regulatorische Modifikation ähnelt der Phosphorylierung, wobei UDP-GlcNAc als Donor verwendet wird. O-GlcNAc wurde erstmals 1984 beschrieben und reguliert eine große Anzahl von Proteinen in Zellkern und Zytoplasma (Hart et al. 1989; Wells et al. 2003). Aus UDP-GlcNAc wird zudem UDP-GalNAc gebildet, ein weiterer Nukleotidzucker für die Synthese von Glycokonjugaten. Schließlich ist UDP-GlcNAc in Zellen essentielles Ausgangssubstrat für die Biosynthese von Sialinsäuren.

1.2.1 Biosynthese von UDP-GlcNAc

1.2.1.1 *De novo*-Biosynthese aus Fructose-6-Phosphat

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. Das Schlüsselenzym der UDP-GlcNAc-Biosynthese ist die Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Aminotransferase (GFAT; EC 2.6.1.16). Es handelt sich hierbei um ein tetrameres, komplex reguliertes Enzym, das durch UDP-GlcNAc, Glucose-6-Phosphat und Glucosamin-6-Phosphat inhibiert wird (Tourian et al. 1983; Broschat et al. 2002). Wie der Name bereits suggeriert, katalysiert es die Aminierung von Fructose-6-Phosphat am C-2 und leitet damit die die Abzweigung von der Glycolyse ein. Der zweite Schritt 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. Im nächsten Schritt wird, durch Kondensation von GlcNAc-1-Phosphat und UTP unter Abspaltung von Pyrophosphat, UDP-GlcNAc bereitgestellt (Strominger and Smith 1959). Diese Reaktion wird mittels 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.

1.2.1.2 Salvage-Pathway und Aufnahme über die Nahrung

N-Acetylhexosamine werden auch aus dem intrazellulären Abbau von Oligosacchariden („Salvage-Pathway“) oder aus der Verdauung von Oligosacchariden, die über die Nahrung aufgenommen wurden, gewonnen. Entsprechende Kinasen führen diese Substanzen in den Aminozuckerstoffwechsel zurück. GlcNAc wird durch die GlcNAc-Kinase in 6-Position phosphoryliert (Datta 1971). 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 dieses 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).

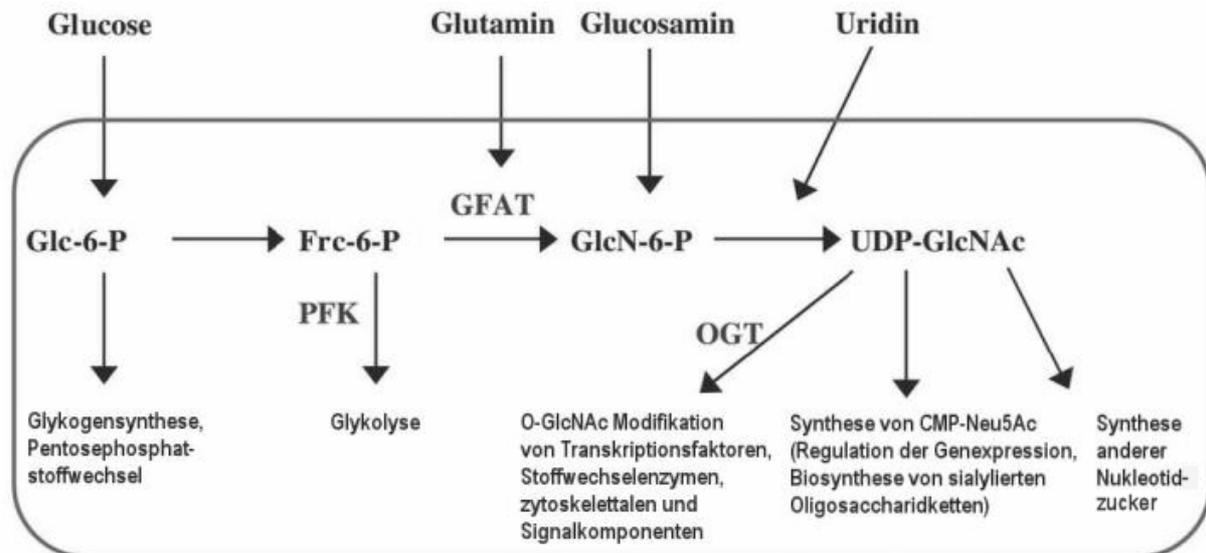


Abbildung 1.2 Stellung des UDP-GlcNAc im Glucosestoffwechsel von peripheren Geweben.

1.2.2 Biosynthese von CMP-Neu5Ac

1.2.2.1 *De novo*-Biosynthese aus UDP-GlcNAc

CMP-Neu5Ac ist das Vorläufermolekül für die Biosynthese aller Sialinsäuren. Es wird in fünf enzymatischen Schritten aus UDP-GlcNAc gebildet. 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 Nucleotidzucker 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 and Felsenfeld 1961) und in humanen Erythrozyten (Jourdian 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 (E.C. 2.7.7.43) katalysiert den letzten Schritt der Sialinsäurebiosynthese, die Aktivierung der Neu5Ac durch CTP als Coenzym unter Abspaltung von Pyrophosphat, wobei CMP-Neu5Ac gebildet wird. Obwohl Sialinsäuren in Glykokonjugaten immer α -verknüpft sind, besitzt die Bindung in CMP-Neu5Ac β -Konformation (Haverkamp et al. 1979; Kolter and Sandhoff 1997). 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, ist über die Funktion von CMP-Neu5Ac im Kern nichts bekannt. In jüngster Zeit mehren sich jedoch die Befunde, dass CMP-Neu5Ac in dieser für Nukleotidzucker ungewöhnlichen Lokalisation mit der Regulation der Genexpression in Zusammenhang steht (Büttner et al. 2002)).

1.2.2.2 Umsetzung exogen aufgenommener Neu5Ac

Aus dem Abbau von Oligosacchariden gewonnene Neu5Ac gelangt 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 and Walker 1980).

1.2.2.3 UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase – Das Schlüsselenzym

Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase wurde bereits 1957 entdeckt (Cardini and Leloir 1957) und die von ihr katalysierte Reaktion 1958 beschrieben (Comb and Roseman 1958). 1961 wurde die ManNAc-Kinase nachgewiesen (Ghosh and Roseman 1961; Warren and Felsenfeld 1961). Später konnte gezeigt werden, dass sowohl die subzelluläre Lokalisation als auch die Gewebeverteilung der beiden Enzyme identisch ist (Van Rinsum et al. 1983). 14 Jahre danach erfolgte der Nachweis, dass beide Enzymaktivitäten auf einem Polypeptid als bifunktionelles Enzym exprimiert werden (Hinderlich et al. 1997; Stäsche et al. 1997). Trotz ihrer Bedeutung für den Stoffwechsel der Sialinsäure konnte die UDP-GlcNAc-2-Epimerase (Sommar and Ellis 1972; Kikuchi and Tsuiki 1973) bzw. die ManNAc-Kinase (Kundig et al. 1966) lange Zeit aus

verschiedenen Quellen nur partiell angereichert werden. 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 Tetramer als auch ein Dimer aus 75 kDa-Untereinheiten (Ghaderi et al. 2007). Das Tetramer 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 und Kollegen zeigten, dass das Enzym außerdem einer strengen Feedback-Inhibierung durch CMP-Neu5Ac unterliegt (Kornfeld et al. 1964). Zudem wird die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase 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 fetale 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 an, 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 (Keppler 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 biologische Bedeutung der Zusammenschluss von UDP-GlcNAc-2-Epimerase und ManNAc-Kinase zu einem bifunktionellen Enzym hat, ist bis heute nicht bekannt.

1.2.3 Biosynthese von sialylierten Oligosaccharidketten

Die Aktivierung der Neu5Ac zu CMP-Neu5Ac 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 Eckhardt et al. kloniert und molekular charakterisiert werden (Eckhardt et al. 1996). 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.

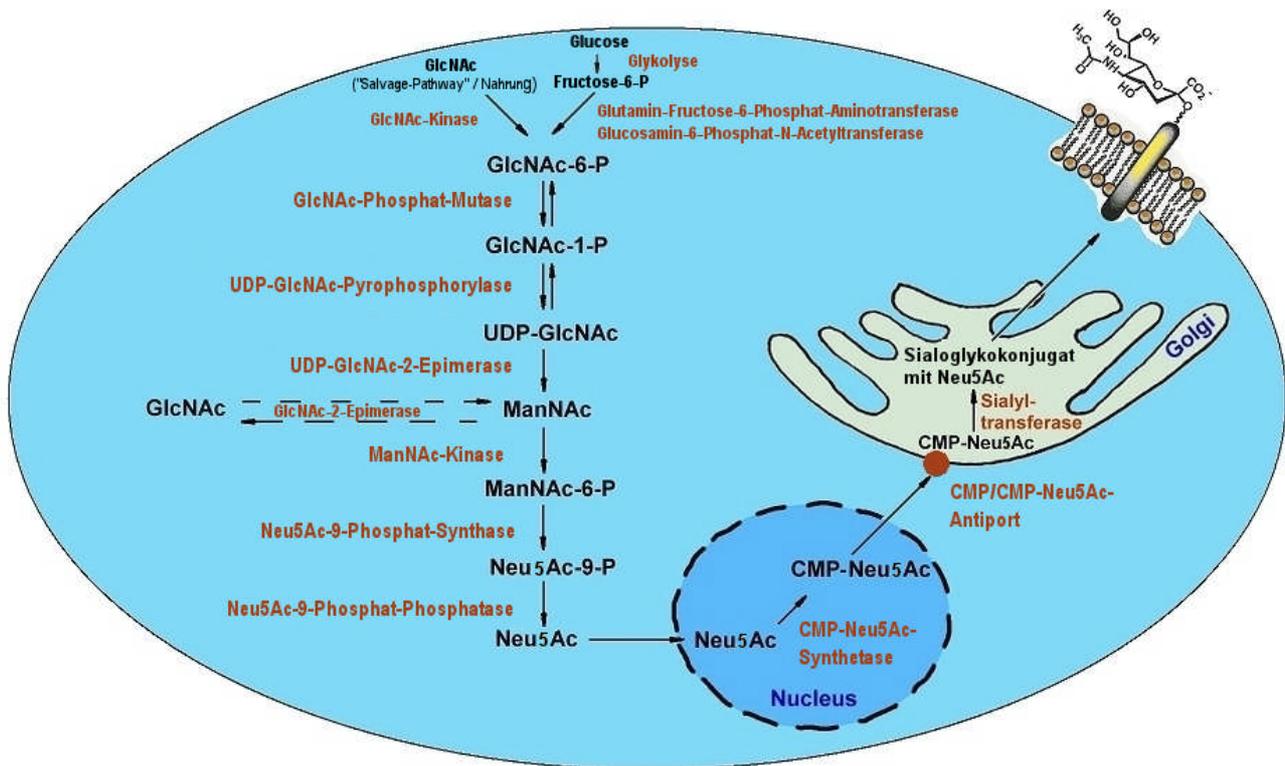


Abbildung 1.3 Sialinsäurebiosynthese in Säugerzellen.

1.3 Vorkommen von Sialinsäuren

Sialinsäuren sind essentielle Bestandteile von Glykokonjugaten und konnten bereits in allen Deuterostomia - zu deutsch: Neumündern -, also auch dem Menschen nachgewiesen werden (Corfield and Schauer 1982). Bei anderen Lebensformen bilden sie dagegen eher die Ausnahme. In der Deuterostomia-Linie (Chordatiere, Stachelhäuter, Kiemenlochtere) kommen alle Varianten der O-Modifikation vor (Angata and Varki 2002). Wirbeltiere besitzen indessen 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-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) kommt im Menschen nur in fetalem Gewebe und in einigen Tumoren vor, im adulten humanen Organismus wirkt sie dagegen antigen (Kawai et al. 1991; Kean 1991). Im Gegensatz dazu findet man Neu5Gc in unserem entwicklungs geschichtlich nächsten Verwandten, dem Affen, sehr wohl. Varki et al. wies erst kürzlich darauf hin, dass dies ein entscheidender Unterschied zwischen Mensch und Affe sei und eventuell sogar die Grundlage für unsere kognitive Überlegenheit darstellen könnte (Varki and Altheide 2005; Varki 2006). Das Vorkommen der einzelnen Sialinsäuren wird von den Aktivitäten zahlreicher spezifischer

Sialyltransferasen bestimmt (Paulson et al. 1989). Die Verteilung der Sialinsäuren ist dabei spezies-, organ-, und ontogenesespezifisch (Varki 1993). Protostomen (Urmünder) besitzen in der Regel keine Sialinsäuren. Trotzdem konnten Sialinsäuren in einigen Prokaryoten und niederen Eukaryoten gefunden werden (Angata and 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 Hefen konnten bisher keine Sialinsäuren nachgewiesen werden. In Vertebraten kommen Sialinsäuren auf N-Glycanen und O-Glycanen zahlreicher Glycoproteine und in den Oligosaccharidketten von Gangliosiden 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. 1.4). 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*-Acetylglucosamineinheiten, Galactosen, Fucose und Sialinsäure. Der hybride Typ stellt eine Mischform aus High-Mannose- und komplexem Typ dar. Die Sialinsäuren sind an das nicht-reduzierende Ende der Galactose von Oligosacchariden 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. PSA besteht aus einer linearen Kette von bis zu 200 α 2,8-verknüpften Sialinsäuren (Mühlenhoff et al. 1998).

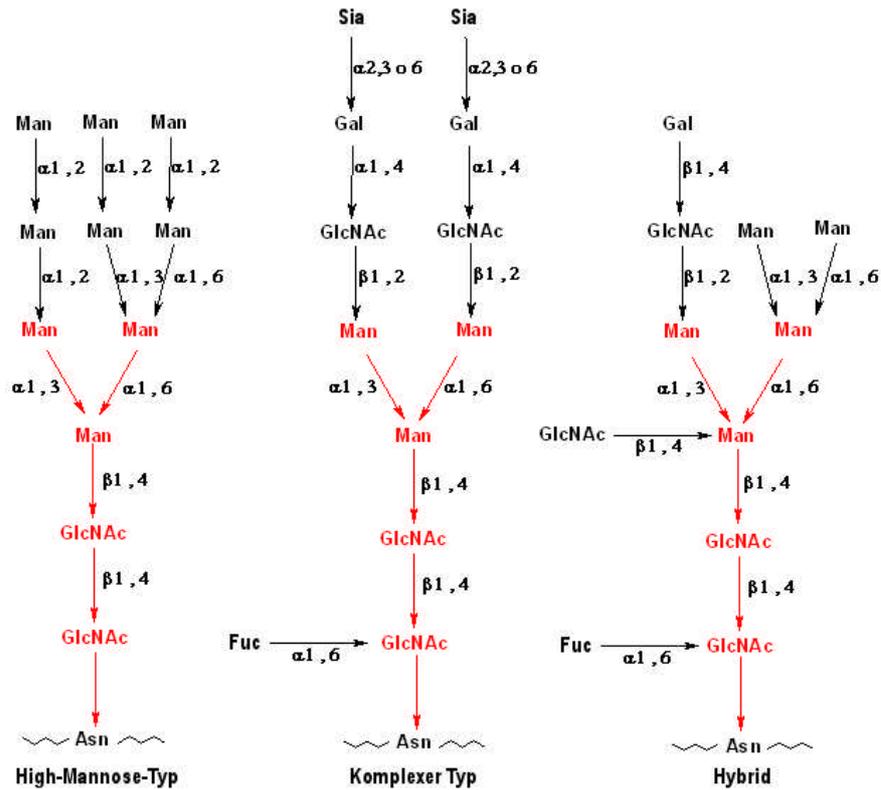


Abbildung 1.4 Grundstruktur der 3 Typen von N-Glycanen

Die für alle N-Glycane gemeinsame Kernstruktur (GlcNAc₂Man₃) ist rot dargestellt. Neben den in dieser Abbildung gezeigten bi- und triantennären Glycanen sind bei Kohlenhydratstrukturen des komplexen Typs auch tetra- und pentaantennäre Formen möglich.

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.

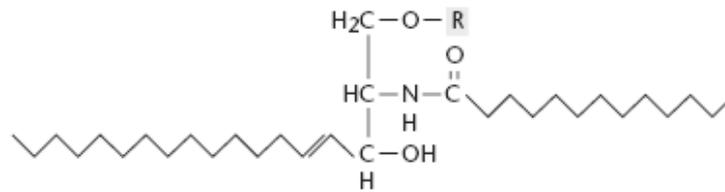


Abb. 1.5 Grundstruktur von Ceramid, Sphingomyelin, Cerebrosiden und Gangliosiden.

Je nach Substituent an der Stelle „R“ handelt es sich um ein Ceramid (R = H), ein Sphingomyelin (R = Cholin), ein Cerebrosid (R = Monosaccharid) oder ein Gangliosid (R = Oligosaccharid).

1.4 Biologische Funktionen von Sialinsäuren

Sialinsäuren tragen entscheidend zur Strukturvielfalt von Glycokonjugaten bei. Deshalb können zahlreiche biologische Funktionen direkt mit Sialinsäuren in Verbindung gebracht werden (Schauer 2004). 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 and 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 Abschnitt sollen die vielfältigen biologischen Funktionen von Sialinsäuren an einigen Beispielen dargestellt werden.

1.4.1 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 an vielen Adhäsionsvorgängen. Oftmals können Zelladhäsionsmoleküle ihre Bindungspartner nur an den spezifischen Sialylstrukturen erkennen.

1.4.1.1 Sialinsäurebindende Lektine

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“). 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). Selektine werden entweder auf Leukozyten (L-Selektin) oder auf aktiviertem 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 können (Takeda 1987).

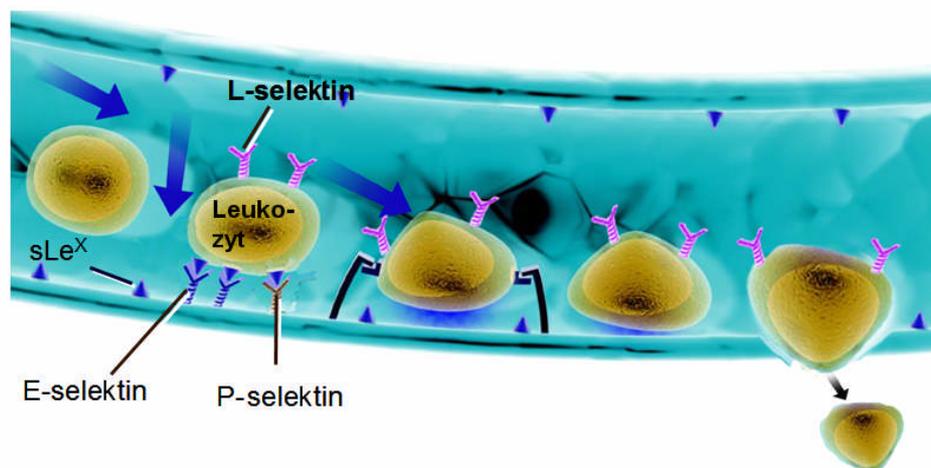


Abbildung 1.6 Selektinvermittelte Interaktion von Leukozyten mit Endothelzellen:

„Rolling“, Adhäsion, Migration

Siglecs bilden 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 and 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 and Bartsch 2000).

1.4.1.2 Neural cell adhesion molecule (NCAM) und Polysialinsäuren (PSA)

1.4.1.2.1 Struktur des NCAM

NCAM gehört zur Immunglobulinsuperfamilie und ist innerhalb dieser das erste Zelladhäsionsmolekül, das entdeckt werden konnte (Rutishauser et al. 1976). Die Grundstruktur bilden sich wiederholende Motive, so genannte Ig-artige Domänen und Fibronectin-Typ-III-Sequenzen. Alle NCAM-Isoformen basieren auf der gleichen Polypeptidkette und besitzen extrazellulär 5 Ig-artige Domänen mit 2 Fibronectin Typ III-Sequenzen (Hoffman et al. 1982; Cunningham et al. 1987). Die exakte Basen- und Aminosäuresequenz des NCAM-Proteins wurde von (Cunningham et al. 1987) beschrieben. Durch alternatives Splicing des primären Transkripts entstehen 3 Isoformen des NCAM (Owens et al. 1987). Diese Isoformen haben eine Molekülmasse von 120, 140 oder 180 kDa und besitzen einen ähnlichen extrazellulären Anteil. Die 140- und 180 kDa-Isoformen sind über eine transmembrane Domäne mit einem intrazellulären Anteil verbunden, während die kleinste 120 kDa-Isoform extrazellulär über einen Glycophosphatidyl-Inositol Anker an die Zellmembran geknüpft ist (Cunningham et al. 1987). NCAM ist phylogenetisch zwischen verschiedenen Wirbeltierspezies stark konserviert und stellt in der Stammesentwicklung ein bewährtes Prinzip zur Vermittlung zellulärer Interaktionen dar (Hoffman et al. 1984). Es vermittelt Bindungsreaktionen zwischen verschiedenen Zellen, und zwar sowohl homophile NCAM-NCAM-Bindungen (Hoffman et al. 1984), als auch heterophile Bindungen mit anderen ProteoGlycanen wie Heparansulfat und Chondroitinsulfat-ProteoGlycanen (Friedlander et al. 1994; Burg et al. 1995). NCAM reagiert mit weiteren Adhäsionsmolekülen entweder auf der eigenen Zelloberfläche in Form einer cis-Interaktion oder mit Adhäsionsmolekülen gegenüberliegender Zellen in einer trans-Interaktion, wobei sich große Adhäsionskomplexe bilden. Durch die Bindungsreaktion von NCAM werden intrazelluläre Signalkaskaden beeinflusst. Den ersten Hinweis für den Einfluss von NCAM auf intrazelluläre Signalwege erbrachten Schuch et al. (1989). Er blockierte die NCAM-Bindung *in vitro* durch spezifische Antikörper, steigerte dadurch die intrazelluläre Calciumkonzentration, senkte den intrazellulären pH und reduzierte verschiedene Moleküle des Phosphatidylinositol-Signalweges.

Weitergehende Studien zeigten, dass die Aktivierung von second messenger-Systemen zwischen verschiedenen Zellsystemen variiert und dass eine generalisierte Aussage zur intrazellulären Signalübertragung schwierig ist (von Bohlen und Halbach et al. 1992).

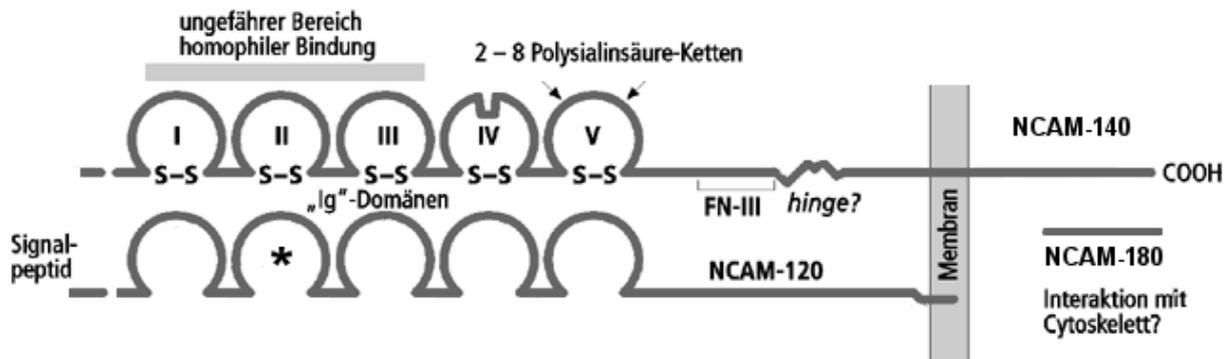


Abbildung 1.7 Proteinstruktur der wichtigsten NCAM-Isoformen. Bei NCAM-180 ist die intrazelluläre Domäne durch Insertion eines zusätzlichen Exons vergrößert. Hierdurch wird das Molekül zur Interaktion mit dem Cytoskelett befähigt. Extrazellulär besitzen alle Isoformen 5 Ig- und bis zu 2 Fibronectin-Typ-III-Domänen (FN-III). Im Hingebereich ist NCAM flexibel. * = Heparin-Bindungsstelle.

1.4.1.2.2 Polysialinsäuren

Polysialinsäuren (PSA) wurden aufgrund ihrer ungewöhnlichen Größe und Zusammensetzung erstmals als Pronase-resistentes Makromolekül beschrieben (Finne 1982). Sie bestehen aus α -2,8-verbundenen Sialinsäuren und werden im Golgiapparat von zwei eng verwandten Enzymen, den Polysialyltransferasen ST8SiaIV (Eckhardt et al. 1995; Nakayama et al. 1995) und ST8SiaII (Scheidegger et al. 1995; Yoshida et al. 1995), synthetisiert.

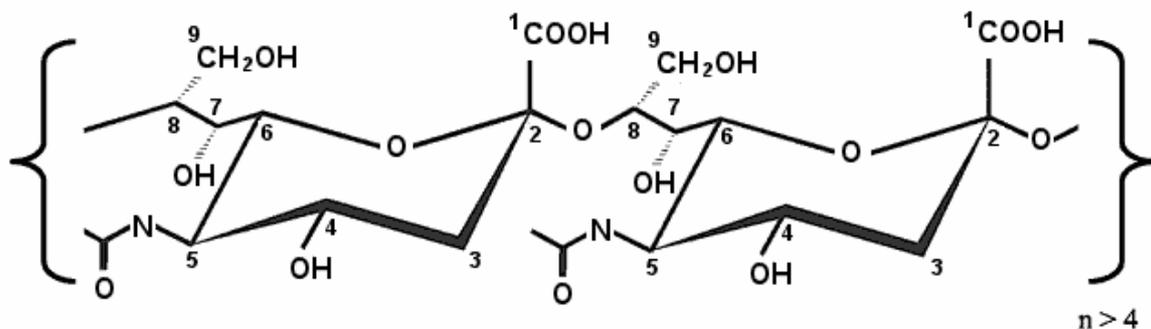


Abbildung 1.8 Sialinsäuredimer aus 5-N-Acetylneuraminsäure

Beide Enzyme können an den gleichen Glycosylierungsstellen arbeiten und synthetisieren ein PSA-Polymer mit ca. 50-60 Sialinsäureresten (Angata et al. 1998). Deutliche Unterschiede der

katalytischen Eigenschaften konnten bislang noch nicht gezeigt werden. Lediglich ein synergistischer Effekt der Zusammenarbeit von ST8SiaII und ST8SiaIV sowie eine Präferenz für verschiedene NCAM-Isoformen (Kitazume-Kawaguchi et al. 2001) sind bekannt. Die Modifikation mit PSA ist einzigartig. Neben den Polysialyltransferasen selbst (Autopolysialylierung) ist NCAM der einzige natürliche Akzeptor (Acheson et al. 1991; Tomasiewicz et al. 1993). Bestätigt wurde diese These durch die Konstruktion einer NCAM-knockout-Maus (B6.129P2-Ncam1^{tm1Cgn/J}). Das fehlende NCAM ging bei dieser Maus mit einem nahezu vollständigen Verlust von PSA einher (Cremer et al. 1994). Die Rolle der Autopolysialylierung von ST8SiaII und ST8SiaIV ist bis heute unklar. Vermutlich sind die Autopolysialylierung und die Glycosylierung von NCAM funktionell miteinander verknüpft (Mühlenhoff et al. 2001).

1.4.1.2.3 Polysialyliertes NCAM (PSA-NCAM)

Die Modifikation von NCAM mit PSA (PSA-NCAM) führt zu einer funktionellen Umkehr der Adhäsion. Die Adhäsion wird verringert und der Abstand zwischen den Zellmembranen vergrößert (Sadoul et al. 1983). Der Mechanismus dieser Effektumkehr wird durch zwei Theorien beschrieben: Die erste Theorie erklärt die anti-adhäsive Wirkung der PSA durch die raumfüllende, hydrophile und negativ geladene Raumstruktur der PSA. Hierdurch wird eine sterische Inhibition bewirkt, die andere Zelloberflächenmoleküle an der Interaktion hindert (Rutishauser et al. 1988). Die zweite Theorie geht von einer direkten Interaktion anderer Zelloberflächenmoleküle mit PSA aus. Durch eigene Bindungspartner von PSA-NCAM kann die Zelle für weitere Faktoren sensibilisiert werden und im Nervenzellverbund auf äußere Reize reagieren (Kiss et al. 2001). Die anti-adhäsive Wirkung der PSA ist unabhängig von der Korrespondenz zu NCAM. Auch in Wechselwirkung mit anderen Adhäsionsmolekülen, wie Integrinen und Cadherinen, zeigt PSA einen inhibierenden Einfluss auf Zell-Zellkontakte (Rutishauser et al. 1988; Fujimoto et al. 2001). Im Laufe der Ontogenese verkürzen sich die Polysialinsäureketten, so dass es zu einer verstärkten Adhäsion zwischen den Nervenzellen im adulten Organismus kommt (Seki and Arai 1993).

1.4.1.2.4 NCAM und PSA-NCAM während der Embryonalentwicklung

Die Expression von NCAM beginnt zwischen Tag 7.5 und 8 der Embryonalentwicklung im Neuroektoderm und Mesoderm. Am 9. Tag (E 9) kann NCAM auch in Somiten, verschiedenen mesenchymalen Geweben und im Herz nachgewiesen werden. Die PSA-Expression folgt mit geringem Verzug. So gelingt der früheste PSA-Nachweis an E 8.5 in ektodermalen Geweben.

Einen halben Tag später ist der Nachweis schließlich auch in Somiten, Herz und mesodermalen Geweben bzw. gegen Ende der Embryonalphase sogar in der Nasenhöhle, der Urniere sowie Zellen der Zunge, des Darmes und des Pankreas möglich. Eine differenzierte Expression der Polysialyltransferasen konnte dabei bislang noch nicht festgestellt werden (Ong et al. 1998). PSA wurde zwar nie ohne Enzymexpression nachgewiesen, aber die Enzyme durchaus ohne PSA (Phillips et al. 1997). Verschiedene funktionelle Studien zeigten bereits die Bedeutung des Glycoproteins für die Entwicklung des Neuralrohrs. So führte z. B. die Spontanmutation *Splotch-C57Be* auf dem Chromosom 1 der Maus bei homozygoten Tieren zur Embryoletalität an E 13-14. Neben lumbosacraler Rachischisis ab E 9.5 wurden Hirnschäden (z.B. Exenzephalie des Myelencephalon), fehlende oder veränderte Spinalganglien und Schwanzfehlbildungen beobachtet. Die Mutation in heterozygoter Form führte neben verringerter Ausprägung der beschriebenen Fehlbildungen zusätzlich zu Pigmentstörungen bei erwachsenen Tieren, wobei die weißen Flecken an Bauch, Pfoten und Schwanz der Mutation ihren Namen gaben. Viele der beschriebenen Störungen wurden auf eine gestörte Wanderung der Neuralleistenzellen zurückgeführt (Kapron-Bras and Trasler 1988; Moase and Trasler 1990). Die NCAM-Expression zeigte zum Zeitpunkt der Defektbildung an E 9.0 zwar keine örtlichen oder zeitlichen Abweichungen zum gesunden Tier, das NCAM-Bandenmuster wies jedoch eine zusätzliche 200 kDa-Isoform auf (Moase and Trasler 1991). Die nach oben veränderte Masse wurde hierbei auf eine abnorme Polysialylierung des NCAM zurückgeführt (Neale and Trasler 1994).

1.4.1.2.5 Funktionen von PSA-NCAM im adulten Organismus

Obwohl NCAM im adulten Organismus auch auf Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten, Schwann'schen Zellen und Muskelzellen zu finden ist, bleibt die Synthese von PSA im erwachsenen Säugetier auf wenige Regionen beschränkt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Expression und Aktivität der ST8SiaII schon kurz nach der Geburt nur noch sehr schwach vorhanden ist. Nur die ST8SiaIV bleibt in bestimmten Gehirnregionen mit lebenslanger PSA-Synthese vorhanden (Phillips et al. 1997; Hildebrandt et al. 1998). Hierzu zählen Bereiche der Hippocampusformation (Becker et al. 1996; Seki and Rutishauser 1998), neurosekretorische Neuronen des Hypothalamus-Hypophysensystems (Theodosis et al. 1991) und Neuroblasten des Bulbus olfactorius (Eckhardt et al. 2000). Diese Areale zeichnen sich durch eine lebenslange Plastizität aus. Dort ansässige Neuronen sind demnach potentiell in der Lage, sich zu regenerieren. Zur näheren Erforschung der Funktionen von PSA-NCAM wurden in der Vergangenheit mittels *gene-targeting* verschiedene knockout-Modelle erstellt. Hierzu zählt auch die Konstruktion der NCAM-knockout-Maus (B6.129P2-^{Ncam1tm1Cgn/J}). In dieser Maus wurden zwei Exons und das

flankierte Intron entfernt. Die homozygoten (NCAM(-/-))-und heterozygoten (NCAM(+/-))-knockout-Tiere waren lebensfähig und fertil. Adulte NCAM(-/-) - Tiere zeigten jedoch zu 10% ein verringertes Gehirngewicht und zu 36% einen verkleinerten Bulbus olfactorius. Im Morris water maze-Test, welcher zur Erprobung von räumlichem und zeitlichem Lernvermögen dient, zeigte die NCAM(-/-)-Maus eine signifikante Schwäche im räumlichen Lernverhalten (Cremer et al. 1994). Zudem war neben einem stärkeren Angst- und Vermeidungsverhalten (Stork et al. 1999) das Erkundungsverhalten schwächer und die Aggressivität zwischen männlichen Tieren stärker ausgeprägt als bei Kontrolltieren aus dem gleichen Wurf (Stork et al. 1997). Experimente, die darauf abzielten, die beobachteten Veränderungen an der NCAM(-/-)-Maus besser zu verstehen, lieferten in der Folge interessante Befunde. So scheint die Abwesenheit von PSA-NCAM die synaptische Plastizität in Reaktion auf elektrische Reize (LTP) (Cremer et al. 1998) und sogar die zirkadiane Rhythmik zu stören (Shen et al. 2001). NCAM(-/-)-Mäuse zeigten außerdem Projektionsfehler von corticospinalen Axonen und verkleinerte motorische Endplatten (Moscoso et al. 1998; Rolf et al. 2002).

Ein weiteres knockout-Modell wurde für die 180 kDa-Isoform des NCAM erstellt. Bei Untersuchungen des Bulbus olfactorius dieser Mäuse fanden sich kleine und unorganisierte Granulazellen. Vorläufer dieser Zellfraktion akkumulierten an ihrem Ursprungsort und waren offensichtlich unfähig zur gerichteten Wanderung (Tomasiewicz et al. 1993). Ähnliches ergaben Analysen des Hippocampus. Die hier ansässigen Moosfasern waren ungebündelt, unstrukturiert und aufgelockert. Interessanterweise konnte schon kurz darauf demonstriert werden, dass die gleichen Veränderungen auch durch eine gezielte EndoN-Injektion und damit PSA-Entfernung erreicht werden konnten. Die beschriebenen Defekte wurden also nicht direkt vom Verlust des 180 kDa-NCAM, sondern vielmehr durch das Fehlen der PSA verursacht (Seki and Rutishauser 1998). Eine wichtige Errungenschaft war demnach die Konstruktion der ST8SiaIV-knockout-Maus (B6.129P2-Siat8d^{tm1Zch}). Dieses Mausmodell besaß durch *gene targeting* eine lacZ/Neomycinresistenz-Kassette an Stelle des ersten Exons und teilweise des ersten Introns. Die ersetzten Anteile hatten eine Größe von ca. 2 kb und codierten den zytosolischen und transmembranen Anteil des ST8SiaIV-Gens. Die ST8SiaIV-Expression war demnach bei homozygotem Genotyp in allen Körperregionen ausgeschaltet, während das ST8SiaII- und NCAM-Expressionsmuster unbeeinflusst blieb. Auf diese Weise manipulierte Tiere waren lebensfähig, fertil und zeigten makroskopisch keine Auffälligkeiten. Erwartungsgemäß ergaben sich bei unveränderter PSA-Konzentration in den peripheren Organen deutliche Unterschiede der PSA-Expressionen in den Gehirnen erwachsener Tiere. Ab der 4. Woche sank der PSA-Gehalt im Gehirn der knockout-Tiere deutlich schneller als in den Kontrollen. Im Alter von 6 Monaten

war die PSA in Teilen des Moosfasertraktes des Hippocampus drastisch reduziert. Das Gehirngewicht und die Anatomie des Gehirns blieben dabei unauffällig. Entsprechend des PSA-Verlustes zeigten die Tiere ab der 6. Woche eine abgeschwächte LTP (long-term potentiation) in der CA1-Region des Hippocampus (Eckhardt et al. 2000). Alle Ergebnisse, die in gutem Einklang mit früheren Befunden stehen, wonach ST8SiaII die dominierende Polysialyltransferase bis zur Geburt ist, danach jedoch bis zur Nachweisgrenze abnimmt, und ST8SiaIV im Gehirn des erwachsenen Organismus erhalten bleibt (Hildebrandt et al. 1998). Der Einfluss von PSA-NCAM auf das Lernverhalten wurde insbesondere in der Ratte erforscht. Die Induktion der LTP *in vivo* an anaesthetisierten Ratten hatte eine erhöhte NCAM-Expression zur Folge (Fazeli et al. 1994). In einem passiven Vermeidungstest lernten Ratten, die bevorzugten dunklen Teile der Versuchsanlage zu finden und die erleuchteten Bereiche zu meiden. Die Tiere sollten sich später noch an den Versuchsaufbau erinnern. In diesem Test bewirkte eine Blockierung von NCAM durch Antikörper (Doyle et al. 1992) oder durch NCAM-Liganden (Foley et al. 2000), die intraventrikulär verabreicht wurden, ein verringertes Erinnerungsvermögen an den Versuchsaufbau. Die Injektion markierter PSA-Bausteine zeigte eine vermehrte Polysialylierung von NCAM in bestimmten Gehirnregionen nach dem Training (Doyle et al. 1992). Auch im *Morris water maze*-Test stieg der PSA-NCAM-Gehalt an (O'Connell et al. 1997). Eine intraventrikuläre Injektion von EndoN schwächte dagegen das Lern- und Erinnerungsvermögen bei gleichem Versuchsaufbau deutlich ab (Becker et al. 1996).

1.4.1.2.6 Einfluss von PSA-NCAM auf das Metastasierungsverhalten

Ein hoher Polysialinsäuregehalt in peripherem Gewebe ist charakteristisch für malignes Gewebe. In diversen immunhistochemischen Studien wurde PSA-NCAM auf verschiedenen bösartigen Tumoren nachgewiesen. Darunter zählen das alveolare Rhabdomyosarkom (RMS), das undifferenzierte Neuroblastom (Hildebrandt et al. 1998), der anaplastische Wilms-Tumor (Roth et al. 1988), das periphere T-Zelllymphom (Kern et al. 1992), das Pankreas-Carcinom (Tezel et al. 2001) und alle neuroendokrinen Lungentumoren (Lantuejoul et al. 1998). Lantuejoul konnte zeigen, dass die PSA-NCAM-Expression in *high-grade*-Tumoren (groß- und kleinzelliges Lungenkarzinom) signifikant höher ist als in *low-grade*-Tumoren (typisches und atypisches Carcinoid). Weiterhin wird angenommen, dass im Metastasierungsprozess die ST8SiaII-gesteuerte Polysialylierung führend ist. Analysen von Rhabdomyosarkometastasen in der Lunge zeigten eine Neuordnung des Pax-3-Gens (Schulte et al. 1997). Pax-3 ist stark an der Regulierung der ST8SiaII beteiligt. Eine Überexpression dieses Gens führt zu einer Steigerung der ST8SiaII-mRNA-Konzentration bei unveränderter ST8SiaIV-mRNA-Konzentration.

Außerdem zeigten Pax-3-transfizierte Zellen eine stärkere Zellzell- und Zellsubstratsinteraktion als nicht-transfizierte Kontrollen (Mayanil et al. 2000). Passend zu diesen Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass es keine Unterschiede bezüglich der ST8SiaIV-Expression in normalem Lungengewebe und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen gibt, während die ST8SiaII im normalem Lungengewebe gar nicht, im Tumorgewebe hingegen stark exprimiert wird (Tanaka et al. 2000). Eine nochmalige Bestätigung dieser Befunde wurde 2002 durch die Anwendung von Valproinsäure (VPA, 2-Propylpentanoylsäure), ein bereits seit Jahren etabliertes Medikament in der Therapie von Epilepsie, erbracht. Ihm wurde schon länger eine „Antikrebsaktivität“ zugesprochen, ohne dass man den genauen Mechanismus kannte. So führte die Behandlung mit VPA zu einer Verringerung des metastatischen Potentials unterschiedlicher Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* (Blaheta und Cinatl 2002; Blaheta et al. 2002; Blaheta et al. 2005). Cinatl et al. (2002) konnten demonstrieren, dass diese Wirkungen teilweise auf der Modulation des PSA-NCAM-Gehaltes basieren und Beecken et al. (2005) waren schließlich in der Lage, den Einfluss von VPA auf PSA-NCAM mit der Regulation der ST8SiaII- und ST8SiaIV-Expression zu verbinden. Mit Hilfe einer RT-PCR zeigten sie, dass VPA zu einer Erhöhung der ST8SiaIV-mRNA- und zu einer Verringerung der ST8SiaII-mRNA-Konzentration führt.

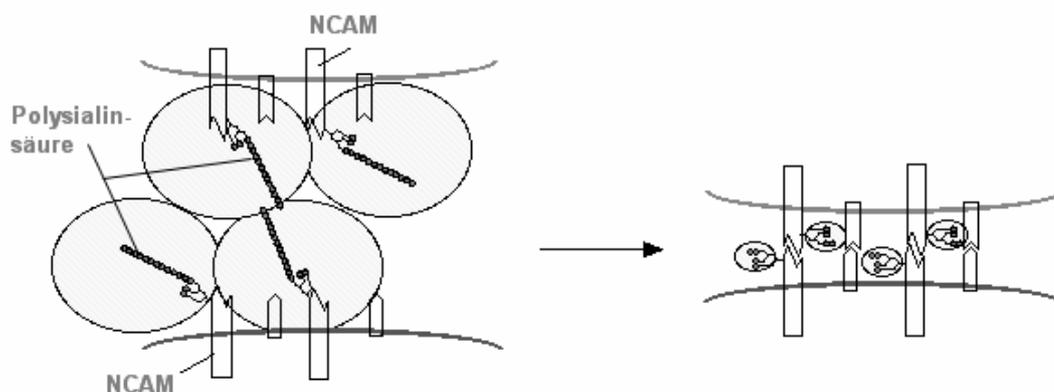


Abbildung 1.9 NCAM-vermittelte Zelladhäsionsprozesse im embryonalen (li.) und adulten Gehirn (re.)

1.4.2 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). Die sialinsäurebindenden Lektine von pathogenen Bakterien werden Adhäsine genannt und vermitteln die Bindung des Mikroorganismus an die Wirtszelle (Ofek and 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 Adhäsine von *E. coli* K99 bindet spezifisch Neu5Gc, welche besonders stark im Darm von Schweinen, den Wirten von *E. coli* K99, exprimiert ist (Yuyama et al. 1993). In einigen Fällen können auch die Toxine von Mikroorganismen Sialinsäuren binden. So binden die Toxine von Cholera, Botulinum und Tetanus an spezifische sialylierte Ganglioside ihrer Wirtszellen und werden anschließend durch rezeptorvermittelte Endocytose aufgenommen (Richards et al. 1979; Schengrund et al. 1991).

1.4.3 Maskierung antigener 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 Tanssialidase-Aktivität des Erregers transferiert die wirtseigenen Sialinsäuren auf die Zelloberfläche des Erregers und überdeckt so seine antigenen Strukturen (Colli 1993; Tomlinson et al. 1994). Embryonale Zellen sind ebenfalls durch Sialinsäuren geschützt und entgehen so der Interaktion mit dem mütterlichen Immunsystem (Kelm and Schauer 1997). 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 z.B. Blutgruppenantigene,

die durch spezifische Sialylstrukturen gekennzeichnet sind und nach Sialidasebehandlung ihre Antigenität verlieren (Pilatte et al. 1993).

1.4.4 Einfluss auf die Struktur und Funktion von Glycokonjugaten

Die Präsenz von Sialinsäuren ist wichtig für die biologische Funktion einiger Glycoproteine. So führt z.B. die Desialylierung des Somatostatin- oder 5-HT₂-Rezeptors 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 Erythropoetin, ein Hormon, das die Bildung von Erythrocyten stimuliert, gemacht (Wasley et al. 1991). Hierbei beruht die verringerte biologische Aktivität des Asialoproteins allerdings auf einer reduzierten Halbwertszeit im Blut (Egrie und Browne 2001). In vielen Fällen schützen Sialinsäuren Glycoproteine 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 und werden dann von Makrophagen erkannt und phagocytiert (Schlepper-Schäfer et al. 1980; Kluge et al. 1992). Ähnliches wird bei Serumglycoproteinen und Antigen-Antikörperkomplexen beobachtet. Sie werden nach Verlust ihrer terminalen Sialinsäuren durch den Asialoglycoproteinrezeptor der Leber erkannt, endocytiert und abgebaut (Ashwell and 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. 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 die 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).

1.4.5 Die Rolle der Sialinsäuren im Tumorstoffwechsel

Zahlreiche Tumore besitzen eine erhöhte Sialinsäurekonzentration auf ihren Oberflächen (Hakomori 1989; Bhavanandan 1991), was mit einer erhöhten Malignität in Verbindung gebracht wird. 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). Colonicarcinom- 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 (Kageshita et al. 1995), analog der Interaktion von Leukocyten mit Gefäßendothelien, zurückzuführen. Viele Krebszellen maskieren ihre antigenen Determinanten auch mit Sialinsäuren, ähnlich wie zahlreiche Pathogene, und entziehen sich so der immunologischen Überwachung (Dennis and Laferte 1985). Erst nach Entfernung der Sialinsäuren durch Sialidasebehandlung können sie von natürlichen Killerzellen erkannt und lysiert werden (Ahrens and 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 et al. 1985). Bestimmte Typen von Gangliosiden, die von Tumorzellen exprimiert werden, insbesondere solche, die viele Sialinsäuren tragen, haben eine hemmende Wirkung auf die Proliferation von Zellen der Immunantwort. Dieser Aspekt ist hinsichtlich der immunsuppressiven Effekte von Tumorerkrankungen bemerkenswert (Marcus 1984). Auf der anderen Seite führt, wie bereits beschrieben, die 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 (Sillanaukee 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 Melanome (Fahr and Schauer 2001). Aber auch die Konzentration von Sialinsäuren im Serum wird zur Verlaufskontrolle während der Tumorprogression genutzt (Fischer and Egg 1990).

1.5 Einsatz von Sia-Analoga

1.5.1 Grundprinzip des „Biochemical Engineering“

Die Modifikation zellulärer Sialinsäuren mittels Vorläuferanaloga wird Biochemical-Engineering genannt. Sie ermöglicht die funktionelle Untersuchung der N-Acyl-Seitenkette im Hinblick auf das Expressions-, Adhäsions-, Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Zelle. In unserer Arbeitsgruppe wurde erstmals demonstriert, dass N-substituierte Glucosamin- und D-Mannosamin-Analoga von Zellen aufgenommen und metabolisiert werden. Hierbei zeigte sich, dass Enzyme der Sialinsäuresynthese hinsichtlich Änderungen der N-Acyl-Seitenkette von ManNAc oder GlcNAc unspezifisch sind (Kayser et al. 1992). N-substituierte Analoga mit unterschiedlichen Acylgruppenlängen wie N-Propanoyl-, N-Butanoyl-, N-Pentanoyl-, N-Hexanoyl- oder N-Crotonoylmannosamine wurden von Zellen aufgenommen und nach jedem Analogon entstand die entsprechende N-Acylneuraminsäure, die schließlich auf der Zelloberfläche exprimiert wurde. Der enzymatische Transfer der C5-modifizierten Sialinsäuren auf Glycoproteine war bei der *in vitro*-Erprobung vier verschiedener Sialyltransferasen ebenso gut wie der Transfer des physiologischen Neu5Ac (Gross and Brossmer 1995). Zu einer Verbesserung der Aufnahme führte schließlich die Peracetylierung der N-Acyl-Analoga. Eine *in vitro*-Studie zeigte, dass die Bioverfügbarkeit der synthetisch hergestellten Vorläufermoleküle dank dieser Modifikation signifikant erhöht wird (Collins et al. 2000). Ein weiteres positives Signal war die Erkenntnis, dass die Zellvitalität durch die Langzeitinkubation mit Mannosamin-Analoga nicht beeinträchtigt wird. Sowohl Jurkat-Zellen (Wieser et al. 1996; Yarema et al. 1998), humane Lymphoid- bzw. Fibroblasten-Zelllinien verschiedener Spezies (Keppler et al. 1995; Herrmann et al. 1997; Keppler et al. 1998) als auch Rattenneuronen und -gliazellen in Form primärer Zellkulturen (Schmidt et al. 1998; Schmidt et al. 2000) bleiben nach ManNProp-Inkubation vital. Bei ManNBut und ManNPent jedoch weist das Wachstum bestimmter Zellkulturen eine Reduktion um 40% auf. Die *in vivo*-modulierte N-Acyl-Seitenkette der Neu5Ac hebt das Zell-Kontakt-kontrollierte Zellwachstum auf (Wieser et al. 1996).

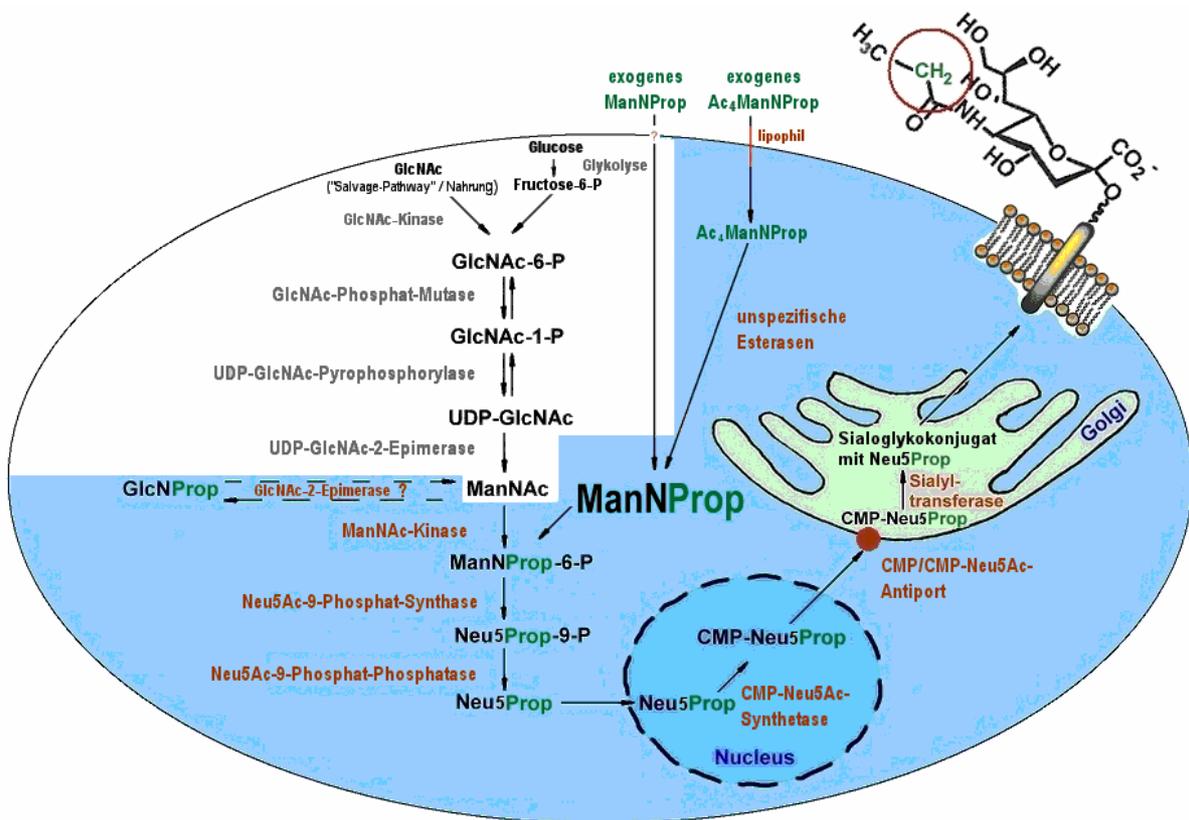


Abb. 1.10 Stoffwechselweg zur biochemischen Modifikation von N-Acylneuraminsäure (hier am Beispiel von ManNProp)

1.5.2 Einfluss der Modifikationen auf biologische Prozesse *in vitro*

1.5.2.1 Reduktion viraler Infektiosität

Biochemical-Engineering beeinflusst die Sialinsäure-abhängige Infektion von Mäusen und Primaten durch Influenzavirus-A, -C, Newcastle-disease-virus, Cardioviren und Polyomaviren. Sialinsäurevorläufer-Analoga wie N-Propionyl-, N-Butanoyl-, oder N-Pentanoyl-D-mannosamine reduzieren *in vitro* die Influenzavirus-A-Infektiosität um bis zu 80%. Es konnte gezeigt werden, dass modifizierte Sialinsäuren von Glykokonjugaten der Zelloberfläche ein sterisches Hindernis für die Hämagglutinin-vermittelte Bindung von Influenzavirus A darstellen (von Itzstein et al. 1993; Keppler et al. 1998; Monto et al. 1999).

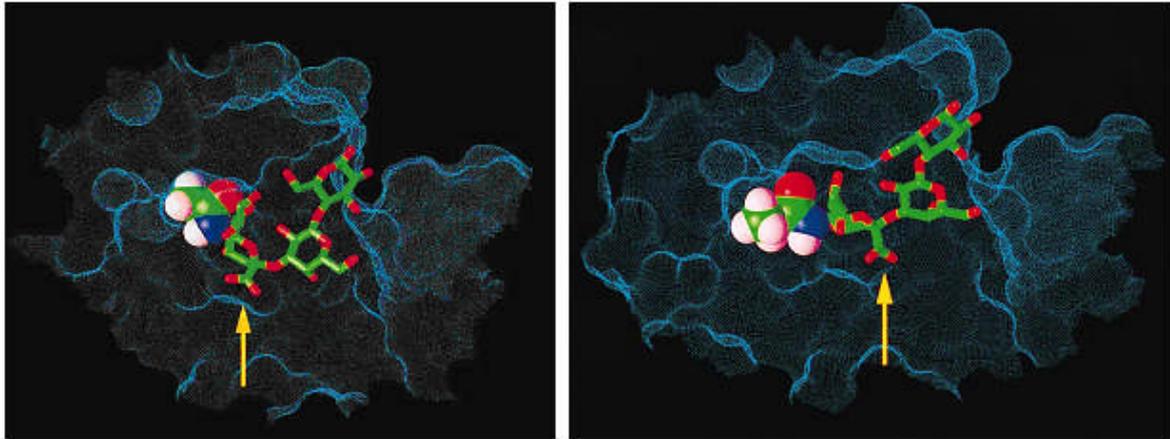


Abbildung 1.11 Interaktion von Hämagglutinin des Polyomavirus der Maus mit Neuraminsäure auf der Wirtszelloberfläche (Hellblau = Proteinoberfläche, Stäbchenmodell = Oligosaccharide (ohne H-Atome), 3D-Moleküle = N-Acetyl- u. N-Propanoyl-Gruppen (C-Atome=grün, O-Atome=rot, H-Atome=weiß, N-Atom=blau). **Links:** Die N-Acetylgruppe liegt genau in einer Bindungstasche. Die Carboxylgruppe der Sialinsäure (gelber Pfeil) liefert durch Interaktion mit einer Guanidiniumgruppe des Arginin 77 den Großteil der Bindungsenergie. **Rechts:** Die N-Propanoylgruppe passt nicht mehr in die Bindungstasche. Dadurch wird die modifizierte Sialinsäure nach rechts gedrückt und die Carboxylgruppe von ihrem Bindungspartner wegbewegt. (Herrmann et al. 1997).

Hierbei wirken die Analoga je nach Seitenkettenlänge durchaus unterschiedlich. Während ManNPent die Infektiosität von humanem Polyomavirus BK - durch Reduktion der Affinität des murinen 3T6-Zellrezeptoren zu Polyomaviren - um 30% reduziert (Herrmann et al. 1997), verstärkt ManNProp ihre Infektiosität um das Siebenfache. Weiterhin reduziert ManNProp die Infektiosität von African-green-monkey-B-lymphotropischen Papovaviren auf 1/10 der Kontrolle.

1.5.2.2 Einfluss auf das Wachstum neuraler Zellen

ManNProp induziert die Proliferation von Astrozyten und Mikrogliazellen, während Oligodendrozyten-Vorläuferzellen bei ManNProp-Gabe nicht proliferieren, sich jedoch ihre Anzahl aus sich regenerierenden Kleinhirn-Neuronen erhöht (Schmidt et al. 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Inkorporation von N-Propanoylneuraminsäuren bei gleichzeitigem GABA-Zusatz den intrazellulären Calciumgehalt von Oligodendrozyten steuert (Schmidt et al. 2000). Ein *in vitro* bereits durch ManNAc-Gabe angeregtes Axonwachstum von Neuronen – was bislang hinsichtlich des Wirkungsmechanismus ungeklärt ist – konnte durch ManNProp-vermittelte Bildung und Einbau von N-Propanoylneuraminsäure in die Neuronenoberfläche spezifisch gesteigert werden (Büttner et al. 2002). Dies hat zur Folge, dass die neuronale Regeneration effizienter wird. Für N-Glycolylmannosamin-Pentacetat konnte

gezeigt werden, dass es nach Umbau zu N-Glycolylneuraminsäure die Bindung von MAG an neurale Zellen inhibiert (Collins et al. 2000) – was ebenfalls für die posttraumatische neuronale Regeneration von großer Bedeutung ist.

1.5.2.3 Aktivierung der Proliferation humaner T-Zellen

Die N-Acetylneuraminsäure spielt in der Differenzierung und Reifung von Lymphozyten eine wichtige Rolle (Varki 1993). Durch ManNProp-induzierte Modifikation konnten humane T-Lymphozyten ebenso gut wie mit dem pflanzlichen Lektin Concanavalin A, welches im Gegensatz zu ManNProp zelltoxisch ist, zur Proliferation stimuliert werden. Dabei konnten erhöhte IL-2-Sekretion und gesteigerte Expression der IL-2-Rezeptor-Kette gemessen werden (Schüler 1997).

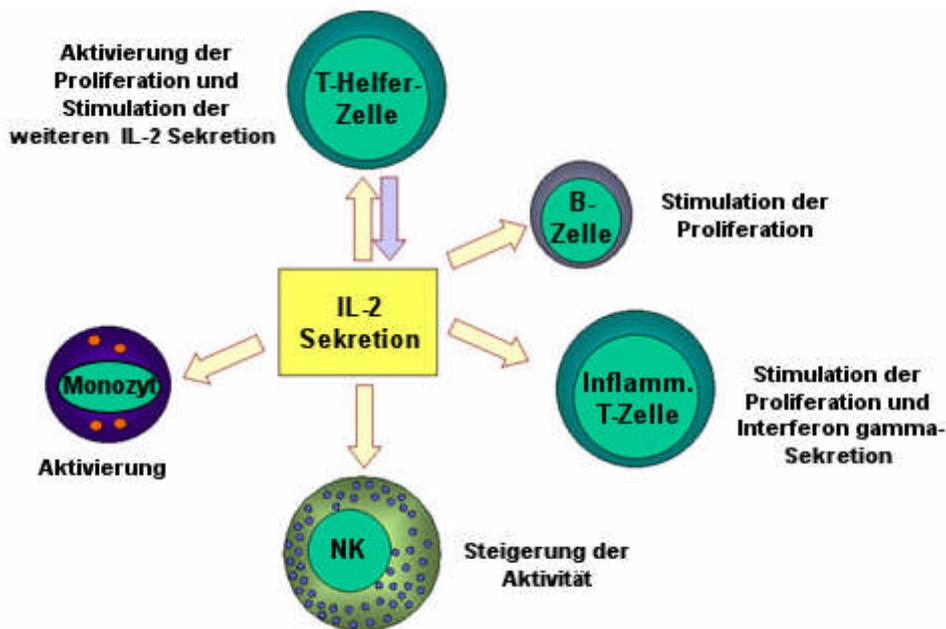


Abbildung 1.12 Einfluss von Interleukin 2 auf das Immunsystem

1.5.2.4 Markierung von Tumorzellen

Die Modifikation von Tumorzellen, die bereits mittels kovalenter Bindung von N-Acetylneuraminsäuren an die Zelloberfläche durchgeführt wurde (Brossmer et al. 1977), ist durch die Einführung der Sialinsäurevorläufer-Analoga in die Biochemie erweitert worden. Auf der Grundlage unserer Untersuchungen wurden funktionell aktive Seitenketten, z.B. mit Ketonen oder Aziden, anstelle der chemisch wenig reaktiven N-Propanoyl- oder homologen Gruppen eingeführt. Dies gelang vor allem mittels N-Levulinoyl-D-mannosamin (Mahal et al. 1997; Yarema et al. 1998; Lee et al. 1999; Prescher et al. 2004). Ketongruppen, die normalerweise

auf der Zelloberfläche fehlen, können zur Bindung mit anderen funktionellen Molekülgruppen wie Hydrazine, Hydroxylamine und Thiosemicarbazide genutzt werden. Auf diese Weise kann die Immunogenität von Tumorzellen durch Bildung von Neoantigenen wie das Konjugat von N-Levulinoylneuraminsäure mit einem immunogenen Carrier-Protein gesteigert werden (Lemieux and Bertozzi 2001). Außerdem konnte die Immunmarkierung von Tumorzellen mit N-Propanoylpolsialinsäuren durch spezifische Antikörperbindung zur Komplement-vermittelten Lyse genutzt werden (Liu et al. 2000).

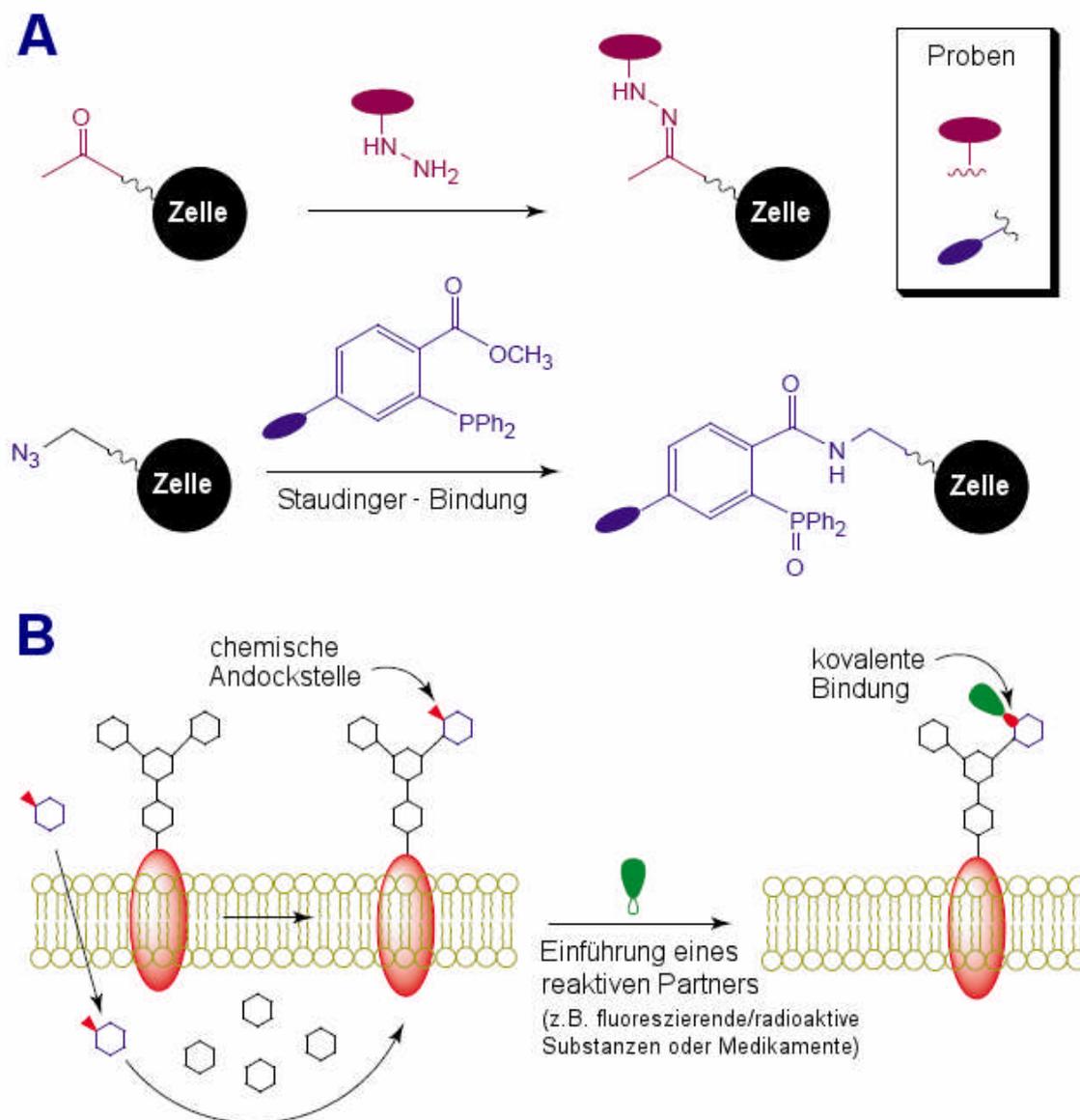


Abbildung 1.13 Integration von chemischen „Ankermolekülen“ in Zelloberflächen. A) Eingeführte Ketone und Azide können zur Bindung mit anderen funktionellen Molekülgruppen wie Hydrazinen oder Phosphinderivaten genutzt werden. (B) Unnatürliche Sialinsäurevorläufer, die reaktive funktionelle Gruppen wie Ketone und Azide tragen, können nach Integration in die Zellmembran mit später injizierten „Markermolekülen“ oder Medikamenten reagieren (Dube and Bertozzi 2003).

1.6 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. In unserer Arbeitsgruppe wurde erstmals gezeigt, dass *N*-substituierte D-Mannosamin-Analoga von Zellen aufgenommen und zu den entsprechenden Sialinsäuren metabolisiert werden. Dieses neue Verfahren, welches unter dem Namen „Biochemical Engineering“ in die Literatur eingegangen ist, ermöglicht eine kontrollierte und effiziente „biochemische Mikrochirurgie“ von Sialoglycokonjugaten in lebenden Zellen. Die biologischen Eigenschaften natürlicher Sialinsäuren bzw. deren *N*-Acetylseitenketten können auf diese Weise noch genauer studiert und gezielt modifiziert werden. In Kombination mit Zelllinien oder Mäusen, die hinsichtlich des Schlüsselenzyms der Sialinsäurebiosynthese (UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase) defizient sind und hierdurch eine reduzierte Anzahl konkurrierender endogener Sialinsäuren aufweisen, können Zellen bzw. Organe mit fast homogenen Populationen modifizierter Sialinsäuren erzeugt und damit sialinsäureabhängige Ligandenrezeptorinteraktionen noch besser studiert werden. Nachdem diesbezüglich in den letzten Jahren bereits sehr interessante Beobachtungen *in vitro* gemacht werden konnten, war es nun meine Aufgabe, die Verteilung der synthetischen Vorläufer bzw. deren äquivalenter Sialinsäuren sowie erste biologische Antworten in lebenden Tieren zu untersuchen. Hierbei sollten auch Ansätze für zukünftige diagnostische oder therapeutische Anwendungen gefunden werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von den Firmen ICN (Eschwege), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Boehringer Mannheim, Biochrom (Berlin), Serotech (Berlin) und Sigma (München) in höchster Qualitätsstufe bezogen. Zellkulturmaterialien wurden von den Firmen Falcon (Heidelberg) und Nunc (Wiesbaden) bezogen. Diese waren entweder sterile Einmal-Artikel oder wurden im Labor sterilisiert.

2.1.2 Versuchstiere

Alle untersuchten Tiere waren C57BL6-Mäuse und befanden sich in einem Alter zwischen 4 und 6 Monaten (Tierversuchsprojekt: G 0329/00, genehmigt am 13.03.2001).

2.1.3 Zelllinien

Oli-neu

Oligodendrozytenlinie

(Prof. Dr. J. Trotter, Mainz)

2.1.4 Antikörper

Primäre Antikörper:

Anti-NCAM 5B8 (monoklonal)

T. Jessel

Anti-PolySia 735 (monoklonal)

R. Gerardy-Schahn

Anti-PolyNeuNPropSia 13D9 (monoklonal)

H. J. Jennings

Anti-CNPase

Chemikon

Anti-PLP

Serotec

Anti-MOG

von Livington

Anti-Myelin Basic Protein (polyklonal)

Stressgen

Anti- β -Actin (monoklonal)

Sigma

Anti-mCgb

Pineda

Anti-Transferrin

Sigma

Sekundäre Antikörper:

Kaninchen-anti-Maus IgG (Peroxidase-Konjugat)

Dianova

Ziege-anti-Kaninchen IgG (Peroxidase-Konjugat)

Dianova

Kaninchen-anti-Ratte IgG (Peroxidase-Konjugat)	Sigma
Ziege-anti-Maus IgG (FITC-Konjugat)	Dianova
Ziege-anti-Kaninchen IgG (TRIC-Konjugat)	Dianova
Anti-Meerschweinchen IgG (Peroxidase-Konjugat)	Dianova

2.1.5 Kits und Marker

Kits:

BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
Phospho Protein Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Spectria RIA Kit	Orion Diagnostica

Protein-Molekulargewichtsstandards:

Dalton Marker VII (66 kDa, 45 kDa, 34,7 kDa, 24 kDa, 18,4 kDa, 14,3 kDa)	Sigma
Prestained Molecular Weight Standard A: (196, 118, 90, 70, 55, 36, 32 kDa) B: (185, 116, 84, 61,5, 55, 36, 31 kDa)	Sigma

2.1.6 Nährmedien

<u>Medium für Oli-neu-Zellen</u>	<u>500 x PEN/STREP</u>
0,22 g Glutamin	50 000 U/mL Penicillin
50 mL Pferdeserum	50 mg/mL Streptomycin
1,0 mL 500 x PEN/STREP	
mit DMEM ad 500 mL	

2.1.7 Puffer und Lösungen

2.1.7.1 Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese:

Gellösungen:

Lösung A

30 % Acrylamid (w/v)	
0,8 % N,N'Methylenbisacrylamid (w/v)	

Lösung C

0,2 % SDS (w/v)

Lösung B

0,2 % SDS (w/v)
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

15 %-ige Trenngellösung

4,5 mL Lösung A

2,25 mL Lösung B

2,25 mL aqua bidest.

45 µL APS (10%)

4,5 µL TEMED

10 %-ige Trenngellösung

3,75 mL Lösung A

2,25 mL Lösung B

3,0 mL aqua bidest.

45 µL APS (10%)

4,5 µL TEMED

7,5 %-ige Trenngellösung

2,25 mL Lösung A

2,25 mL Lösung B

4,5 mL aqua bidest.

45 µL APS (10%)

4,5 µL TEMED

6 %-ige Trenngellösung

1,8 mL Lösung A

2,25 mL Lösung B

4,95 mL aqua bidest.

45 µL APS (10%)

4,5 µL TEMED

4 %-ige Sammelgellösung

0,4 mL Lösung A

0,75 mL Lösung C

1,85 mL aqua bidest.

12 µL APS (10%)

3 µL TEMED

5x reduzierender Probenpuffer

14,5 % SDS (w/v)

0,3 M Tris/HCl, pH 6,8

50 % Glycerin (v/v)

25 % 2-Mercaptopropandiol

0,015 % Bromphenolblau (w/v)

5x nicht reduzierender Probenpuffer

wie 5x reduzierender Probenpuffer, ohne Mercaptopropandiol

10 x Laufpuffer

0,25 M Tris / HCl, pH 8,8

1,92 M Glycin

1 % SDS (w/v)

2.1.7.2 Lösungen für Gelfärbungen:

Coomassie-Blau-Färbelösung :

40 % Methanol (v/v)

10 % Essigsäure (v/v)

Coomassie-Blau-Entfärbelösung : 1 ‰o Serva Blue G-250 (w/v)
wie Färbelösung, ohne Serva-Blue G-250

2.1.7.3 Lösungen für Silberfärbung:

Fixierlösung

50 % Methanol
12 % Essigsäure
in aqua bidest.

Silbernitratlösung

0,08 g AgNO₃
0,02 % Formaldehyd ad 50 mL
aqua bidest.

Thiosulfatlösung

0,02 % Natriumthiosulfat
in aqua bidest.

Entwicklungslösung

3 % Natriumcarbonat
0,05 % Formaldehyd
0,0005 % Natriumthiosulfat
in aqua bidest.

2.1.7.4 Lösungen für den Westernblot:

Transfer-Puffer (Towbin):

150 mM Glycin
20 mM Tris/HCl, pH 8,3
10 % Ethanol (v/v)
vor Gebrauch 1:4 mit aqua bidest. verdünnen

Ponceau-Färbelösung

2 % Ponceau-Rot (w/v)
30 % TCA (v/v)
30 % Sulfosalicylsäure (w/v)

Waschpuffer:

PBS-Puffer :

150 mM NaCl
3 mM KCl
8 mM Na₂HPO₄
1 mM KH₂PO₄
pH 7,8

PBS-Tween:

PBS-Puffer + 0,1 % Tween 20

2.1.7.5 Lösungen für die ECL (Enhanced-Chemiluminescence-Luminol-Methode)

Lösung A: 6,8 mM p-Cumarsäure in DMSO

Lösung B: 1,25 mM Luminol in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5

Lösung C: 3 % H₂O₂ (v/v)

Entwicklerlösung: Kodak GBX Entwicklerkonzentrat, 1:5 verdünnen mit aqua bidest.

Fixierlösung: Kodak GBX Fixiererkonzentrat, 1:5 verdünnen mit aqua bidest.

2.1.7.6 Lösungen für die Aufarbeitung von Proteinen

Solubilisationspuffer für Zellen

10 mM Tris / HCl, pH 7,4

150 mM NaCl

1 mM CaCl₂

1 mM MgCl₂

0,5 mM PMSF, Proteaseinhibitorcocktail

1 % Triton X-100

2.1.7.7 Puffer für die Aufarbeitung von Membranproteinen aus Maushirn

Homogenisationspuffer

1 mM NaHCO₃

1,25 mM CaCl₂

0,5 mM MgCl₂

0,5 mM PMSF, Proteaseinhibitorcocktail

pH 7,5

Solubilisationspuffer

10 mM Tris / HCl, pH 8

150 mM NaCl

1,25 mM CaCl₂

0,5 mM MgCl₂

0,5 mM PMSF,

Proteaseinhibitorcocktail

1 % Triton X-100

2.1.7.8 Lösungen für den tryptischen Verdau von Proteinen im Polyacrylamidgel

Verdaupuffer

25 mM NH₄HCO₃

Reduktionslösung

100 mM DTT

100 mM NH₄HCO₃

Carbamidomethylierungslösung

55 mM NH₄HCO₃

Trypsinlösung

12,5 µg/mL Trypsin in

25 mM NH₄HCO₃

2.1.7.9 Zellkultur-PBS

wie PBS, pH 7,4, Osmolarität: 297 mOsm

2.1.8 Geräte

Brutschrank (Zellkultur)	6000 Heraeus	Heraeus
Elisa-Reader	Spectra	SLT-Labinstruments
Gelelektrophoresesystem	Mini-Protean 2	BioRad
Heizblock	Thermomixer 5336	Eppendorf
Kühlzentrifuge	Centrikon H-401	Kontron Instruments
Tischzentrifuge	Biofuge 13	Heraeus
Ultrazentrifuge	Centrikon T-2070	Kontron Instruments
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus
Mikroskop	TMS	Nikon
Mikrowelle	RZV2G	Sharp
Pipetten	Eppendorf Research	Eppendorf
Spektralphotometer	Ultrospec 3000	Pharmacia
Vortex	Vortex-Genie 2	Bender & Hobein

2.1.9 Sonstiges

Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schüll, Dassel
-----------------------	-------------------------------

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung und Passagieren von eukaryontischen Zellen

Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C unter 5% CO₂-Begasung. Oli-neu-Zellen wurden in DMEM mit 10% Pferdeserum als Suspensionskultur gehalten. Je nach Zelldichte wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage passagiert und verdünnt. Hierzu wurden die adhärennten Zellen mit 0,05% EDTA in PBS vom Zellkulturflächenboden gelöst und die Zellsuspension in Falconröhrchen überführt. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 3 min bei 900 g. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert, die Zellen mit einer Kanüle vereinzelt und anschließend wieder in ein mit frischem Medium versetztes Kulturgefäß überführt.

2.2.1.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Eukaryontische Zellen können in flüssigen Stickstoff für längere Zeiträume gelagert werden. Dazu wurden frisch gewaschene und pelletierte Oli-neu-Zellen in DMEM mit 20% Pferdeserum und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen, langsam auf -80°C abgekühlt und in flüssigen Stickstoff überführt. Eingefrorene Zellen können wieder in Kultur genommen werden, indem sie schnell aufgetaut, in frischem Medium gewaschen und anschließend in Medium im Brutschrank inkubiert werden.

2.2.2 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Proteinbestimmung

2.2.2.1.1 Bradford-Methode [Bradford, 1976]

Die Proteinbestimmung wird nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt, bei der der Farbstoff Coomassie-Brillantblau mit Proteinen unter Komplexbildung reagiert. 20 µl proteinhaltige Probe werden mit 1 ml Bradford-Reagenz (10% (v/v) Phosphorsäure / 5% (v/v) Ethanol / 0,1% (w/v) Coomassie G-250) versetzt und 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wird die Extinktion bei 578 nm bestimmt. Als Proteinstandard dient Rinderserumalbumin.

2.2.2.1.2 BCA-Methode [Smith et al., 1985]

Für die Durchführung der Proteinbestimmung wurde der BCA-Test-Kit der Firma Pierce, Rockford, USA, verwendet. Der Kit enthält die Lösung A (BCA) und Lösung B (4% CuSO₄·5H₂O). Proteine reduzieren im alkalischen Milieu Cu²⁺ zu Cu⁺. Die Bichinolin-4-carbonsäure reagiert mit Cu⁺, wobei zwei Bichinolinsäure-Moleküle einen intensiv purpur

gefärbten Chelatkomplex mit dem Cu^{++} -Ion eingehen. Die vorliegenden Proben wurden in 96er-Well-Mikrotiterplatten mit je 200 μl der Reaktionslösung, die aus 50 Teilen Lösung A und einem Teil der Lösung B zusammengesetzt wurde, versetzt. Nach 30 min-Inkubation bei 37°C wurde die Extinktion bei 570 nm im ELISA-Reader gemessen. Anhand einer Eichreihe aus Rinder-Serum-Albumin (BSA) bekannter Konzentrationen konnte die unbekannte Proteinkonzentration der zu testenden Probe bestimmt werden.

2.2.2.2 Konzentrieren von Proben

Proteine werden durch Ultrafiltration in einer UH 100/75-Ultrahülse in einer Ultrahülse-Apparatur (Schleicher & Schuell, Deutschland) unter Vakuum angereichert. Eine Konzentration der Proteine unter denaturierenden Bedingungen wird durch die Acetonfällung erzielt. Dafür wird die proteinhaltige Probe mit 4 Volumenteilen Aceton gemischt und für mindestens 1 h bei 20°C inkubiert. Die ausgefällten Proteine werden für 10 min bei 4°C und $20000 \times g$ abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Proteinpellet in der Speedvac bis zur Trocknung eingeengt. Die getrockneten Proteinpellets werden in 20 μl reduzierendem Probenpuffer resuspendiert und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.2.2.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die vertikale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird nach der Methode von Laemmli (1970) mit dem Mini-Protean II System der Firma BioRad (Deutschland) durchgeführt. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich an hydrophobe Regionen der Proteine an, wodurch diese denaturieren und eine stark negative Ladung eingeführt wird. Dabei ist die Ladung eine Funktion der Größe der Proteine. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes ist die Beweglichkeit der Proteine im SDS-Gel dann proportional zum Logarithmus ihrer Molekulargewichte. Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese wird ein System aus zwei Gelen, einem Trenn- und einem Sammelgel, verwendet. Das Sammelgel weist einen sauren pH-Wert auf, so dass das im Laufpuffer enthaltene Zwitterion Glycin im Sammelgel nur zu einem geringen Teil als Anion vorliegt. Dadurch kommt es beim Anlegen eines elektrischen Feldes zu einem Mangel an Anionen im Sammelgel, so dass sich ein starkes lokales elektrisches Feld zwischen den sich schnell bewegenden Chloridionen und den langsameren Glycinkationen aufbaut. Dies führt zu einer stärkeren Beschleunigung der anionischen Proteine in dem großporigen Sammelgel und damit zu einer Fokussierung der Proteine. Mit dem Übergang ins Trenngel gehen die Glycin-Zwitterionen aufgrund des höheren pH-Wertes wieder voll in den anionischen Zustand über, wodurch der Ionenmangel aufgehoben wird und wieder eine

konstante Feldstärke im gesamten Gel herrscht. Aufgrund der kleineren Porengröße des Trenngels werden die Proteine entsprechend ihrem Verhältnis Molekulargewicht zu Ladung verlangsamt. Für die diskontinuierliche SDS-PAGE werden die proteinhaltigen Proben mit Probenpuffer gemischt und 5 min bei RT inkubiert oder 3 min bei 95 °C gekocht. Die anschließende Elektrophorese erfolgt für 10 min bei einer konstanten Spannung von 120 V, anschließend bei 180 V. Als Größenstandard dient der Molekulargewichtsmarker „Prestained SDS-Molecular Weight Standard Mixture“ (Sigma, Deutschland).

2.2.2.4 2D-Gelelektrophorese

2.2.2.4.1 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Die isoelektrische Fokussierung erlaubt die Trennung von Proteinen gemäß ihrem isoelektrischen Punkt, d.h. das Protein wandert im elektrischen Feld bis zu der Stelle im pH-Gradienten, an dem seine Nettoladung gleich Null ist. Zur Ausbildung des notwendigen pH-Gradienten werden sog. lösliche Ampholine eingesetzt. Ampholine sind heterogene Synthesegemische aus niedermolekularen, aliphatischen Oligoamino-oligocarbonsäuren. Diese haben aufgrund ihres zwitterionischen Charakters die Fähigkeit, Proteine in Lösung zu halten. Der pH-Gradient richtet sich durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus, wobei die Trägerampholytmoleküle mit niederem pI bis an das anodische, die mit höherem pI an das kathodische Ende des Gels wandern. Die anderen Trägerampholytmoleküle ordnen sich dazwischen in der Reihenfolge ihres pI an. Zur Durchführung: Zunächst wurden die Streifenhalter mit je 35µl Probe (ca. 10µg Protein) beladen und anschließend die Fokussierungsstreifen (Immobiline Dry Strips pH 4-7) eingebracht. Waren alle Halter derart beladen, wurden sie auf die Elektrodenplatte der IPGphor-Einheit gestellt und die Plastikdeckel der Streifenhalter aufgebracht. Danach wurde die Schutzhaube der IPGphor-Einheit geschlossen und das Rehydrierungs- und IEF-Protokoll gestartet.

Rehydrierungs- und IEF-Programm

Parameter

Rehydration	2h	0V step and hold Pause
STEP1	10h	30V step and hold
STEP2	1h	500V step and hold
STEP3	1h	1000V step and hold
STEP4	1h	5000V step and hold
STEP5	4h	8000V step and hold

Gesamtlaufzeit: 19h, Gesamtvoltstundenzahl (Vhrs) ca. 34-36.000Vhrs.

In der Programmpause nach 2h wurden die inzwischen aufgequollenen Fokussierungsstreifen mit 350µl DryStrip Cover Fluid überschichtet und die eigentliche Fokussierung gestartet. Nach Ablauf der Fokussierung wurden die Streifen entweder sofort für die weitere Auftrennung in der 2. Dimension eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.2.2.4.2 Auftrennung SDS-PAGE (2. Dimension):

Zunächst wurde die 2D-Elektrophoresekammer mit 200 ml frisch angesetztem 1xSDSPAGE-Laufpuffer beschickt. Vor Auftrennung der Proben in der 2. Dimension wurden die Fokussierungsstreifen umgepuffert, um die Proteine mit SDS zu beladen. Die Äquilibration der Streifen erfolgte dabei in 2 Schritten. Zunächst wurden die fokussierten IPG-Streifen in separaten Glasröhrchen unter ständigem Schütteln für 15min in 12ml Äquilibrationpuffer 1 inkubiert. Dabei wurden in Gegenwart von DTT die fokussierten Proteine vollständig reduziert. Parallel dazu wurden die Proteine mit SDS beladen, denaturiert und erhielten dabei eine negative Oberflächenladung. Zudem wurde dadurch der im Lysepuffer enthaltene Thioharnstoff, der das Auswandern der Proteine aus dem Fokussierungsstreifen stark behindern würde, ausgewaschen. Im zweiten sich direkt anschließenden Schritt wurden die Streifen erneut unter ständigem Schütteln für 15min in 12ml Äquilibrationpuffer 2 inkubiert. Dabei erfolgte durch die Umsetzung mit Jodacetamid eine Blockierung der reduzierten, freien SH-Gruppen, was die Ausbildung von unerwünschten Thiolbrücken endgültig verhinderte. Auch diese Inkubation erfolgte in Gegenwart von SDS, das damit zur weiteren Beladung der Proteine genutzt werden konnte. Der Äquilibrationpuffer 2 wurde anschließend zur Entfernung von freiem Jodacetamid in 1x SDS-PAGE-Laufpuffer ausgewaschen. Die Streifen konnten dann bis zum Auftrag auf das SDS-PAGE-Gel für kurze Zeit in 1x SDS-PAGE-Laufpuffer zwischengelagert werden. Zur Beladung von Gelen mit äquilibrierten Fokussierungsstreifen wurden die Gele seriell zunächst mit Ladepuffer mit Low-Melting-Agarose überschichtet und die Streifen nacheinander vorsichtig auf die Geloberkante aufgebracht. Ein direkter Kontakt zwischen Fokussierungsstreifen und Geloberkante verhinderte das spätere Auftreten von falschen Doppelspots bzw. störender Luftblasen. Vor dem Erstarren der Agarose wurde pro Gel ein Streifen Whatmanpapier mit 15µl mit Proteinmolekulargewichtsstandard mitaufgetragen. Die mit Marker getränkten Papierstreifen wurden dann auf der sauren Seite des Fokussierungsstreifens in die Agarose eingebettet. Um den Austritt der Proteine aus den Streifen zu erleichtern, wurde die Trennung initial mit geringer Voltzahl durchgeführt (1h mit 50V), danach wurde die Spannung derart eingestellt, dass die Gele über Nacht aufgetrennt wurden (80-100V). Die Trennung wurde abgebrochen, sobald die Lauffront das Ende der Gelkassette erreicht hatte.

2.2.2.4.3 Gelanalyse

Zur Auswertung der aufgetrennten Proteinspots wurden die eingeschweißten Gele mit einer Auflösung von 300dpi in Originalgröße farbig (Millionen von Farben) eingescannt und unter ihrem Namen mit Gelnummer als TIFF-file abgelegt. Zur weiteren Spotanalyse mit dem Programm Photoshop wurden die Gele unterschiedlich gefärbt (Kontrolle grün, ManNProp rot) und übereinandergelegt. Dadurch ließen sich interessante und zwischen den verschiedenen Versuchsreihen unterschiedliche Spots besser darstellen. Um endgültige Aussagen treffen zu können, war es notwendig, jeden einzelnen Proteinspot zu betrachten und vor allem die richtige Zuordnung zu überprüfen. Das Programm war nicht in der Lage, Proteine, die durch verschiedene Modifikationen wie z.B. Glycosylierungen oder Phosphorylierungen, in ihrer Lage auf den Proteingelen verschoben waren, richtig zuzuordnen.

2.2.2.5 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Proteine über 0,5 µg können in Gelen sehr einfach mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G-250 angefärbt werden, wobei der Farbstoff mit den Proteinen unter Komplexbildung reagiert. Nach der Elektrophorese wird das Trenngel für mindestens 1 h bei RT in Färbelösung (40% (v/v) Ethanol / 10% (v/v) Essigsäure / 0,1% (w/v) Serva-Blue) geschüttelt. Das gefärbte Gel wird anschließend dreimal in Entfärbelösung (5% (v/v) Ethanol / 7,5% (v/v) Essigsäure) für jeweils 1 h bei RT geschüttelt, bis nur noch die Proteinbanden gefärbt sind.

2.2.2.6 Silberfärbung von Proteingelen

Proteine, deren Menge zwischen 0,5 µg und 50 ng liegt, werden in Proteingelen mit der Silberfärbung nachgewiesen. Nach der Elektrophorese wird das Trenngel für 20 min bei RT in Fixierlösung (40% (v/v) Ethanol / 10% (v/v) Essigsäure / 0,05% (v/v) Formaldehyd) geschüttelt. Anschließend wird dreimal für 5 min mit 50% (v/v) Ethanol gewaschen. Dann wird 1 min in 0,02% (w/v) Na₂S₂O₃ unter leichtem Schwenken inkubiert, dreimal 20 sec in aqua bidest. gewaschen, 15 min in 0,16% (w/v) Silbernitrat / 0,08% (v/v) Formaldehyd inkubiert und erneut dreimal 20 sec mit aqua bidest. gewaschen. Die Färbung erfolgt nach Sichtkontrolle in 5% (w/v) Natriumcarbonat / 0,0005% (w/v) Na₂S₂O₃ / 0,05% Formaldehyd für 1-5 min. Das Gel wird zügig in Fixierlösung überführt, wodurch die Färbereaktion gestoppt wird. Nach 20-minütiger Inkubation in der Fixierlösung wird das Gel bis zum Trocknen in Wasser gelagert.

2.2.2.7 Western-Blot

Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf Nitrocellulosemembranen wird in Anlehnung an Towbin et al. (1979) im Tank-Blot-Verfahren mit Blotapparaturen der Firma BioRad (Deutschland) durchgeführt. Direkt nach der Elektrophorese wird der Sandwich-Blot luftblasenfrei zusammengebaut, so dass die Nitrocellulosemembran (Protran® Nitrocellulose Transfer Membran; Schleicher & Schuell, Deutschland) zur Anode zeigt. Der Transfer wird bei 4 °C mit einer konstanten Stromstärke von 250 mA für 1 h in Transferpuffer (25 mM Tris / 160 mM Glycin / 10% (v/v) Ethanol) durchgeführt. Zur Überprüfung des Proteintransfers werden die auf die Membran übertragenen Proteine mit Ponceau-Färbelösung (0,2% (w/v) Ponceau-Rot S / 3% (v/v) Trichloressigsäure / 3% (w/v) Sulfosalicylsäure) angefärbt. Dazu wird die Membran etwa 1 min in die Färbelösung getaucht und dann mit 1% (v/v) Essigsäure solange entfärbt, bis Proteinbanden sichtbar werden. Bei Verwendung des „Standard Mixture for High-Molecular-Weights 30000-200000“-Markers werden die Markerbanden auf der Membran markiert. Anschließend wird die Membran durch zweimaliges Waschen in PBS (11 mM Na₂HPO₄ / 0,7 mM NaH₂PO₄ / 140 mM NaCl) mit 0,1% (v/v) Tween-20 (PBS-Tween) vollständig entfärbt.

2.2.2.8 Immunologischer Proteinnachweis auf Nitrocellulosemembranen

Der Nachweis spezifischer Proteine auf der Nitrocellulose-Membran erfolgte immunologisch mit Antikörpern. Dafür wird die Membran zunächst für mindestens 30 min bei RT mit Blockierungspuffer (5% (w/v) Milchpulver in PBS-Tween) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wird die Membran zweimal für je 5 min in PBS-Tween gewaschen und für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Als primäre Antikörper wird der Penta-His-Antikörper (Qiagen, Deutschland) oder der H-15-Antikörper (Santa Cruz, USA) 1:2000 in PBS-Tween bzw. das Epimerase-Antiserum 1:500 in Blockierungspuffer verwendet. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS Tween für 5 min wird die Membran für 2 h mit dem sekundären Antikörper bei RT inkubiert. Die verwendeten sekundären Antikörper Rat-Anti-Mouse und Goat-Anti-Rabbit (Dianova, Deutschland; 1:5000 in PBS-Tween) sind mit Meerrettichperoxidase gekoppelt, so dass die Blotmembranen mit dem Enhanced-Chemoluminescence-Luminol-System entwickelt werden können. Zuvor wird die Membran noch je zweimal mit PBS-Tween und PBS gewaschen, anschließend mit Whatman-Papier getrocknet und in eine Folie gelegt. Durch Inkubation mit einer frisch hergestellten Mischung aus 10 µl 6,8 mM p-Cumarsäure in DMSO, 1 ml 1,25 mM Luminol in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5 und 3 µl 3% (v/v) H₂O₂ entsteht, katalysiert durch die Peroxidase, eine Chemolumineszenz, deren Signale mit einer LAS-1000-Kamera (Fuji, Japan)

für 30 sec bis 1 h aufgenommen werden. Eine Quantifizierung von Proteinbanden wird mit dem Programm Image Gauge V3.4 durchgeführt.

2.2.2.9 Identifizierung von Proteinen

2.2.2.9.1 Tryptischer Verdau von Proteinen im Polyacrylamidgel

2.2.2.9.1.1 Präparation des Polyacrylamidgels

Das Coomassie-Blau gefärbte Gel wurde in aqua bidest. ü.N. gewässert. Die zu analysierenden Proteinbanden wurden aus dem Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten und in kleine Würfel (1mm^2) zerteilt, die in ein 0,5 mL Eppendorfgefäß überführt wurden. Die Gelstückchen wurden 2x nacheinander mit H_2O versetzt, was anschließend wieder entfernt wurde.

2.2.2.9.1.2 Entfernung von Coomassie-Blau und SDS

Zu den Gelstücken wurde Verdauopuffer zugegeben, so dass sie gerade bedeckt waren (ca. 20 μl für eine Bande aus einem Minigel). Dies wurde für 15 min schüttelnd bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Verdauopuffer durch Acetonitril / H_2O (1:2) ersetzt, gefolgt von einer weiteren Inkubation für 15 min unter Schütteln. Bei diesem Schritt schrumpften die Gelstücke und das Coomassie-Blau trat aus. Der Überstand wurde abgenommen und durch 100% Acetonitril ersetzt. Nach 15-minütiger Inkubation wurde der gleiche Vorgang mehrere Male wiederholt, bis die Gelstücke ihre blaue Farbe verloren hatten und milchig trüb erschienen. Nach dem letzten Durchgang wurde die Flüssigkeit durch Zentrifugation in der speed vac vollständig entfernt.

2.2.2.9.1.3 Reduktion und Carbamidomethylierung

Die lyophilisierten Gelstücken wurden mit Reduktionslösung versetzt und bei 56°C für 30 min inkubiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Gelstückchen wieder durch Zugabe von Acetonitril für 15 min geschrumpft. Der Überstand wurde abgenommen und die Gelstücke mit Iodacetaminlösung für 30 min im Dunklen bei RT inkubiert. Nach erneuter Abnahme des Überstandes erfolgte die Zugabe von Verdauopuffer und eine 15 minütige Inkubation unter Schütteln. Anschließend erfolgte eine erneute Schrumpfung mit 100% Acetonitril. Der Überstand wurde abgenommen und übrig gebliebene Flüssigkeit durch Zentrifugation in der speed vac entfernt.

2.2.2.9.1.4 Tryptische Spaltung

Die Gelstückchen wurden zunächst nach Zugabe von Trypsinlösung für 30 min auf Eis rehydratisiert. Überstehende Flüssigkeit wurde entfernt und die Gelstückchen so mit Verdauopuffer benetzt, dass sie gerade bedeckt waren. Nach dichtem Schließen der Eppendorfgefäße erfolgte der Trypsinverdau über Nacht bei 37°C unter milden Schütteln.

2.2.2.9.2 Entsalzen der Proben mit Zip-Tip

Geringe Flüssigkeitsmengen können mit Zip-Tips entsalzt werden. Zip-Tips sind Pipettenspitzen, die eine C18-Matrix zur Entsalzung enthalten, die hydrophobe Bestandteile aus einer Lösung bindet, während hydrophile Bestandteile in der Flüssigkeit verbleiben. Gebundene Moleküle können mit einem stark hydrophoben Lösungsmittel, wie z.B. Acetonitril, eluiert werden. Der Verdau-Überstand wurde mit 1/4 des Probenvolumens an 2,5% TFA (Trifluoressigsäure) angesäuert. Die Zip-Tips wurden 3x mit je 10 µl 50% Acetonitril/H₂O äquilibriert und anschließend 2x mit 10 µl 0,1% TFA gespült. Nun wurde die angesäuerte Probe 10x mit den Zip-Tip-Spitzen auf- und abpipettiert, dabei binden die Peptide an die Matrix. Nach 5x Waschen der Spitzen mit je 10 µl 0,1% TFA wurden die Peptide mit gesättigter Matrixüberstandslösung (α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure, „ α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid“ (CCA)), 50% Acetonitril, 0,1% TFA (v/v) eluiert.

2.2.2.9.3 Herstellung des Matrixüberstandes

Eine Spatelspitze Matrixpulver (α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure) wurde mit 250 µl 50% Acetonitril/0,1% TFA in ein Eppendorfgefäß gegeben, gevortext und abzentrifugiert. Der gesättigte Matrixüberstand wurde für die Elution der Peptide aus der Zip-Tip-Matrix verwendet.

2.2.2.9.4 Peptide-Mass-Fingerprinting (Beavis and Chait 1996; Pappin 2003)

Mit Hilfe der MALDI-TOF-MS können die Massen von Peptiden und Proteinen mit einer Genauigkeit von 0,001- 0,1 Promille bestimmt werden. Ein unbekanntes Protein, das zuvor mit einer spezifischen Protease (z.B. Trypsin) verdaut wurde, lässt sich durch Bestimmung der Peptidmassen mittels MALDI-TOF-MS und anschließender Datenbankrecherche eindeutig identifizieren. Bei der Anwendung der MALDI-Methode wird die Peptidprobe in eine sogenannte Matrix, die aus sauren, UV-adsorbierenden organischen Molekülen besteht, eingebettet. Im Hochvakuum des Massenspektrometers wird das Protein-Matrix-Gemisch, das zuvor auf einen Metallträger aufgetragen wurde, mit gepulsten UV-Lasern bestrahlt, der die UV-adsorbierenden Matrixmoleküle und die im Kristall eingebauten Peptide in die Gasphase

freisetzt. Gleichzeitig übertragen die Matrixmoleküle Protonen auf die Peptide, so dass diese als positiv geladene Peptidionen vorliegen. Die Peptidionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und gelangen anschließend in eine feldfreie Flugröhre, an dessen Ende sich ein Detektor befindet. Durch die Beschleunigung im elektrischen Feld erhalten die Peptide eine konstante Geschwindigkeit v , die antiproportional ist zur Wurzel aus der Masse (m) durch Ladungszahl (z) der Peptide ($v \sim 1/\sqrt{(m/z)}$); [$v = \sqrt{(2z/m * eU)}$; wobei e = Elementarladung; U = Beschleunigungsspannung im E-Feld; $v = s/t$, s = Flugstrecke im feldfreien Raum und t = Flugzeit bedeutet]. Anhand der Flugzeiten im feldfreien Raum können die Massen der Peptide bestimmt werden. Die Peptide liegen meistens als einwertige, positive Ionen vor, können aber auch zweifach oder dreifach durch die Matrix mit Protonen beladen werden (mehrere Peaks im Diagramm). Als Matrix wurde α -Cyano-4-hydroxymizinsäure verwendet. Nach Herstellung der gesättigten Matrixlösung wird 1 μ l der Peptidprobe mit 1 μ l des Matrixüberstandes gemischt oder die Peptide werden mit 10 μ l Matrixüberstand aus der Zip-Tip-Spitze eluiert. 1 μ l des Gemischs wird direkt auf den Probenträger pipettiert und im Dunklen trockenen gelassen. Die Messung am Spektrometer wurde in Zusammenarbeit mit C. Kannicht von Octapharm durchgeführt. Das Massenspektrometer (Bruker Biflex Instrument) wurde mit den Massen des Adrenocorticotropin-Hormon-Fragmentes 18-39 (Sigma) und Angiotensin II (Sigma) (externe Standards) kalibriert. Von einem Nitrogenlaser werden UV-Strahlen mit einer Wellenlänge von 337 nm erzeugt. Die Auswertung der Massenspektren erfolgte mit dem Programm Mascot [Perkins et al., 1999] von Matrix-Science der NCBI-Inr-Datenbank oder mit PeptIdent Peptide-Mass-Fingerprinting der Swiss-Prot Datenbank, wobei für die Suche zwei übersehene Trypsinschnittstellen und eine Peptidmassentoleranz von $\pm 0,3$ D zugelassen wurde.

2.2.3 Spezielle Methoden

2.2.3.1 Sialinsäurevorläufer

2.2.3.1.1 N-Acetylmannosamin

Der physiologische Vorgänger der Sialinsäure N-Acetylmannosamin (ManNAc) wurde von Sigma bezogen.

2.2.3.1.2 Synthese der N-Acyl-D-mannosamin Derivate

Zunächst wurde D-Mannosamin-HCL bis zu einer Konzentration von 10mM in 30 ml Methanol gelöst. Bei 0° C erfolgte die Zugabe von NaOMe/Methanol (zu 11 mM) und K-Bicarbonat/HCl (zu 12 mM), um HCl zu entfernen. Diese Lösung wurde für 2h bei 4°C gerührt und anschließend in einem Vakuumverdampfer getrocknet. Das Produkt wurde danach mittels

Säulenchromatographie gereinigt. Hierzu wurde Kieselerdegel 60 (Merck, Deutschland) und Essigsäureethylester/Methanol/H₂O (5:2:1 bis 10:2:1, je nach Polarität des Anhydrids) als Elutionspuffer verwendet. Anschließend wurde das Produkt mittels NMR-Spektroskopie analysiert und charakterisiert. Die Lagerung der N-Acyl-D-mannosamin-Derivate erfolgte bei 4°C.

2.2.3.1.3 Peracetylierung

Die N-Acyl-D-mannosamin-Derivate wurden in trockenem Pyridin aufgelöst (ca. 10 ml Pyridin für 1g Mannosamin) und mit Essigsäureanhydrid (2 Äquivalente pro OH Gruppe) versetzt. Diese Mischung wurde bei Raumtemperatur bis zum Abschluss der Reaktion (TLC überwacht) gerührt. Anschließend erfolgte die Reinigung des Reaktionsgemisches auf Kieselerdegel 60 (Merck, Deutschland).

2.2.3.2 Tierbehandlung und Organgewinnung

Männlichen C57 BL/6 Mäusen wurde 2x täglich ManNAc (1 g/kg in 200 µl PBS), ManNProp (1 g/kg in 200 µl PBS), Ac₄ManNProp (200 mg/kg in 400 µl PBS) oder Trägerlösung (200 µl PBS) für 1, 2, 4, 13 oder 45 Tage intraperitoneal injiziert. 12 Stunden nach der letzten Injektion erfolgte die Tötung der Mäuse sowie die Entnahme von Gehirn, Rückenmark, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz, Gl. submandibularis, Bauchmuskulatur und Blut (in Blutzellen und Serum getrennt). Nach makroskopischer Begutachtung wurde schließlich ein Teil der Organe histologisch bzw. histochemisch untersucht und der andere Teil für weitere Untersuchungen eingefroren.

2.2.3.3 Histologische und histochemische Analysen:

10 µm Kryostatschnitte der Organe wurden bei 20° C in einem Reichert-Jung-Kryostaten geschnitten und auf nicht-vorgekühlte Objektträger aufgetragen. Die Abschnitte wurden entweder mit Periodat acid-Schiffbasereaktion oder Sudan-Schwarz-Reaktion bearbeitet um Kohlehydrate oder Lipide wie beschrieben darzustellen (Roneis 1968). Für weitere histologische Analysen wurden die Abschnitte mit Hematoxylin, Eosin oder Methyleneblau wie beschrieben bearbeitet (Lojda et al. 1979). Für histochemische Analysen wurden die Abschnitte auf Aminopeptidase A, Aminopeptidase M, Dipeptidylpeptidase IV, γ-Glutanyl Transpeptidase, nicht-spezifische alkalische Phosphatase, saure Phosphorylase oder nicht-spezifische Esterasen wie beschrieben analysiert (Lojda et al. 1979).

2.2.3.4 Herstellung der Organ-Membranpellets

Die Organe der Mäuse wurden von Blut sowie groben Fett- und Bindegewebsauflagerungen befreit und in einer Pufferlösung (1mM NaHCO₃, 0.2mM CaCl₂, 0.2mM MgCl₂, Protease Inhibitor Cocktail (Sigma), PMSF (Sigma), pH 7.9) homogenisiert. Nach Zentrifugation (30.000 g, 1 h, 4°C) wurde das Membranpellet mehrfach gewaschen und in einer Speedvac getrocknet.

2.2.3.5 Sialinsäure-Quantifizierung mittels Periodat/Resorcinol-Methode

Freie Sialinsäure wurde mit der etablierten Periodat/Resorcinol Methode quantifiziert. Getrocknete und gewogene Membranpellets wurden jeweils in 250 µl PBS gelöst, mit 5µl 0,4mM Periodatsäure versetzt und für 90 min bei 37°C oxidiert. Anschließend wurden diese Gemische mit 500 µl 6% Resorcinol/2,5 mM CuSO₄/44% HCl versetzt und für genau 15min bei 100°C gekocht. Nach kurzer Abkühlung wurden jeweils 500 µl t-Butyl-Alkohol hinzugefügt, die Proben gevortext und für 5 min zentrifugiert, um die Zelltrümmer auszufällen. Unmittelbar danach wurde der Überstand abgenommen und der OD bei 630 nm gemessen. Die Konzentrationen konnten nun im Vergleich mit einer Standardkurve (0-250 µM Sialinsäure) berechnet und auf die mg Membrangewebe bezogen werden.

2.2.3.6 N-Propanoylneuraminsäure-Quantifizierung mittels RP-HPLC

Getrocknete Membranpellets wurden in 2 mol/l Essigsäure für 1 h bei 80° C hydrolysiert. Anschließend wurde die Essigsäure in einem hohen Vakuum sowie Peptide und Salze mittels Kationenauschromatographie entfernt. Im nächsten Schritt wurden die Sialinsäuren über die Kondensation mit 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxy-benzol (DMB, Sigma) für 2,5 h bei 56° C speziell gelabelt und mittels RP-HPLC über ODS-Hypersil (250 x 3 mm; 0,3 µm; Bischoff, Leonberg, Deutschland) analysiert. Das Trennprinzip der HPLC besteht darin, dass eine zu analysierende Probe in einen Flüssigkeitskreislauf injiziert und in dieser Flüssigkeit, der mobilen Phase, mittels einer Pumpe unter hohem Druck durch eine Trennsäule gepumpt wird, die mit einem sog. Packungsmaterial, der stationären Phase, gefüllt ist. Bestandteile der Probe treten dabei mit der stationären Phase in unterschiedliche Wechselwirkungen und werden verzögert aus der Säule ausgeschwemmt. Die Art und Kombination der beiden Phasen richtet sich nach den chemischen Eigenschaften der zu untersuchenden Substanzen. Die so getrennten Anteile der Probe werden dann weiter in der mobilen Phase in die Messzelle eines hinter die Säule geschalteten Detektors transportiert und fließen an einer Messelektrode vorbei, an der eine elektrische Spannung anliegt. Dabei werden die enthaltenen Substanzen teilweise oxidiert. Der hierbei entstehende Elektronenfluss wird gegen eine Referenzelektrode gemessen und als

(elektrisches) Signal an einen Integrator oder Computer weitergeleitet, der die Signale graphisch in Form von Ausschlägen, sog. Peaks, aufarbeitet. Diese Form der elektrochemischen Detektion wird als amperometrisch bezeichnet. Je größer die Menge der oxidierten Substanz und des daraus resultierenden Elektronenflusses, desto größer ist der Ausschlag bzw. Peak am Integrator/Computer. Die Identifizierung der enthaltenen Substanzen erfolgt durch den Vergleich mit isolierten Referenzsubstanzen in Reinform, welche separat injiziert und mit der gleichen zeitlichen Verzögerung, der sog. Retentionszeit, wieder aus der Säule ausgespült werden. Das Prinzip der RP-HPLC beruht auf einem Umkehrphasensystem, bei dem die stationäre Phase unpolar und die mobile Phase polar ist. Charakteristisch für diese Art von Adsorptions-Chromatographie ist die Verzögerung von Substanzen mit zunehmend hydrophobem Charakter. In unseren Versuchen wurde ein Gradient zwischen Wasser (A) und Acetonitril/Methanol (6/4; V/V; B) von 0,5 ml/min angewendet. Die Elution begann mit 10% B für 10 min, gefolgt von einem Anstieg auf 22% B innerhalb von 35 min und auf 50% in weiteren 28 min. Die gelabelten Sialinsäuren wurden mittels Fluoreszenz bei 373 nm und 448 nm überwacht. Die relativen Retentionszeiten der unphysiologischen DMB-Sialinsäuren wurden in Bezug auf DMB-NANA berechnet und mit den erhaltenen Daten der synthetischen DMB-Sialinsäure-Derivate verglichen. Die relativen Konzentrationen wurden über den Einbau des Fluoreszenz-Signals berechnet.

2.2.3.7 Herstellung der Gehirn-Proteinfractionen

Die getrockneten Membranpellets der Mäuse-Gehirne wurden mit Solubilisationspuffer (150 mM NaCl, 50mM Tris, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1% Triton X-100, Protease-Inhibitor Cocktail (Sigma), pH 7.8) versetzt und über 1h auf Eis gerührt. Nach Zentrifugation (10.000 g, 5 min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und zur weiteren Analyse eingefroren.

2.2.3.8 Radioimmunoassay zur Bestimmung von Testosteronkonzentrationen

Die Bestimmung der Serumkonzentration von Testosteron in männlichen Versuchstieren erfolgte u.a. nach der Vorschrift des Radioimmunassay-Kits (RIA) Spectria der Firma Orion Diagnostica. Bei diesem Verfahren konkurriert eine festgelegte Anzahl von markierten Testosteronmolekülen mit dem Testosteron der Maus um die Bindungsstellen begrenzt vorhandener Antikörper. Mit zunehmender Menge von unmarkiertem Testosteron steigt dessen Konzentration im Präzipitat, d.h. markiertes Testosteron wird verdrängt und die Radioaktivität des Antigen-Antikörper-Komplexes sinkt. Bestätigt wurden die Ergebnisse in freundlicher Kooperation mit dem Institut

für klinische Chemie am UKBF Berlin. Hier wurden die Proben den Routinebestimmungen des Labors (ELISA) zugeführt.

2.2.3.9 Analyse des Phosphorylierungszustandes von Proteinen

Mit dem PhosphoProtein Purification Kit können phosphorylierte Proteine von nichtphosphorylierten getrennt werden. Die Phosphoproteine binden an die Aufreinigungssäulen, während die restlichen Proteine durch die Säulen durchlaufen. Durch die anschließende Probenkonzentrierung und Entsalzung beider Proteinfractionen sollen die getrennten Proteine für den Einsatz in der 2D-Analyse vorbereitet werden. Der Kit wurde nach Herstellerangaben zur Auftrennung von Proteinproben in phosphorylierte und nichtphosphorylierte Proteine eingesetzt. Nach der Aufreinigung wurden die Proteinfractionen mit Nanosep Ultrafiltration Columns (phosphorylierte Proteine) und Centricon Plus-20 Centrifugal-Filter-Devices nach Herstellerprotokollen in Rabilloud-Puffer aufkonzentriert.

3 Ergebnisse

3.1 Quantitative Bestimmung der Sialinsäuren

3.1.1 Verteilung der natürlichen Sialinsäuren in vivo

Sialinsäuren bilden eine Grundvoraussetzung für das Leben. So wurde bereits gezeigt, dass die Inaktivierung vom Schlüsselenzym der Sia-Biosynthese in Mäusen eine sehr frühe embryonale Letalität verursacht (Schwarzkopf et al. 2002). Dennoch gab es bis jetzt keine detaillierten Daten über den Inhalt oder die Konzentration von Sialinsäuren in den verschiedenen Tierorganen. Wir entschieden uns deshalb, zunächst die Sia-Konzentration von Membranen verschiedener Mausorgane mittels Resorcinoltest zu quantifizieren. Dabei fanden sich 2 Gruppen von Organen. Milz, Blutzellen, Unterkieferspeicheldrüse (Gl. submandibularis), Gehirn, Lunge und Rückenmark wiesen einen sehr hohen Anteil (mehr als 43 nmol/mg) membrangebundener Sialinsäuren auf. In Leber, Herz, Niere und Bauschmuskulatur fanden wir dagegen nur die Hälfte oder weniger (Abb. 3.1). Interessanterweise gehören die Zellen der ersten Organgruppe (hoher Sialinsäuregehalt) auch zu denjenigen, die äußerst intensiv in Zellinteraktionsprozesse involviert sind (z.B. Gehirnzellen, Immunzellen).

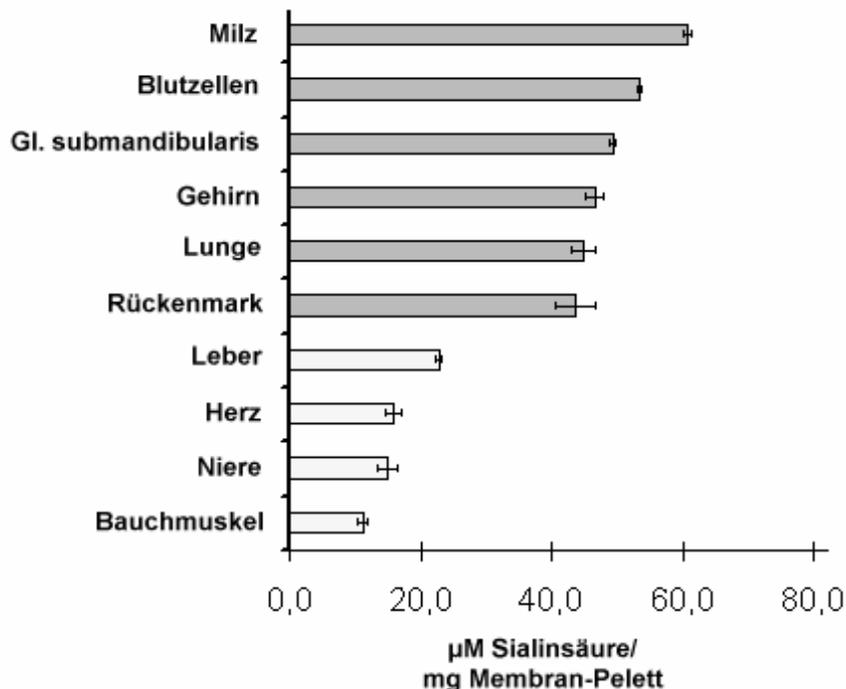


Abbildung 3.1 Quantifizierung des natürlichen Sialinsäuregehaltes verschiedener Organe in WT-Mäusen.

Nach Homogenisierung der Organe erfolgte in einem mehrschrittigen Verfahren die Isolierung der Membranfraktionen. Anschließend wurde die jeweilige Sialinsäurekonzentration mittels Periodat-/Resorcinolmethode gemessen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (inklusive Standardabweichung) aus 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils 2 WT-C57BL6-Mäusen (= 6 Tiere pro Balken).

3.1.2 Verteilung von Sialinsäuren in heterozygot GNE-defizienten Mäusen

Ein homozygoter GNE-Mangel ist am Tag 8,5 der embryonalen Entwicklung tödlich (Schwarzkopf et al. 2002). Tiere mit heterozygotem GNE-Mangel hingegen sind lebensfähig und weisen - oberflächlich betrachtet sowie ersten Untersuchungen zufolge - keine benachteiligenden Defizite auf. Da die GNE das Schlüsselenzym der Sia-Biosynthese darstellt, stellten wir uns die Frage, ob für den GNE-Mangel heterozygote Tiere im Vergleich zu WT-Mäusen ein Defizit an Sialinsäure zeigen. Zugleich versuchten wir herauszufinden, wieviel Sialinsäure tatsächlich für das Leben (z.B. in Mäusen) notwendig ist. Gemäß dem zuvor bereits beschriebenen WT-Maus-Untersuchungsmuster analysierten wir also - ohne Applikation von natürlichen oder synthetisch veränderten Sia-Vorläufern - die membrangebundenen Sialinsäuren in heterozygoten GNE-Mangel-Mäusen. Die erste Beobachtung unterstützte unsere Ergebnisse an WT-Mäusen. Auch hier fanden wir zwei Gruppen von Organen. Gehirn, Rückenmark, Lunge, Milz, Blutzellen sowie Gl. submandibularis bildeten die erste (hohe Sia-Konzentration) bzw. Leber, Niere und Bauchmuskulatur die zweite (niedrige Sia-Konzentration) Gruppe. Allerdings - und dies war der 2. Informationsgewinn - beobachteten wir in beiden Gruppen ein signifikant niedrigeres Sialylierungsniveau. Das Spektrum der ersten Gruppe fiel von 40-60 nmol/mg auf 30-40 nmol/mg (mit Ausnahme der Milz), das der zweiten von 10-25 nmol/mg auf 9-15 nmol/mg (mit Ausnahme der Niere). Dies entspricht einer durchschnittlichen Reduktion der membrangebundenen Sialinsäuren um 25% (Abbildung 3.2). Bezüglich der Organmorphologie zeigte sich kein Unterschied zu den WT-Tieren.

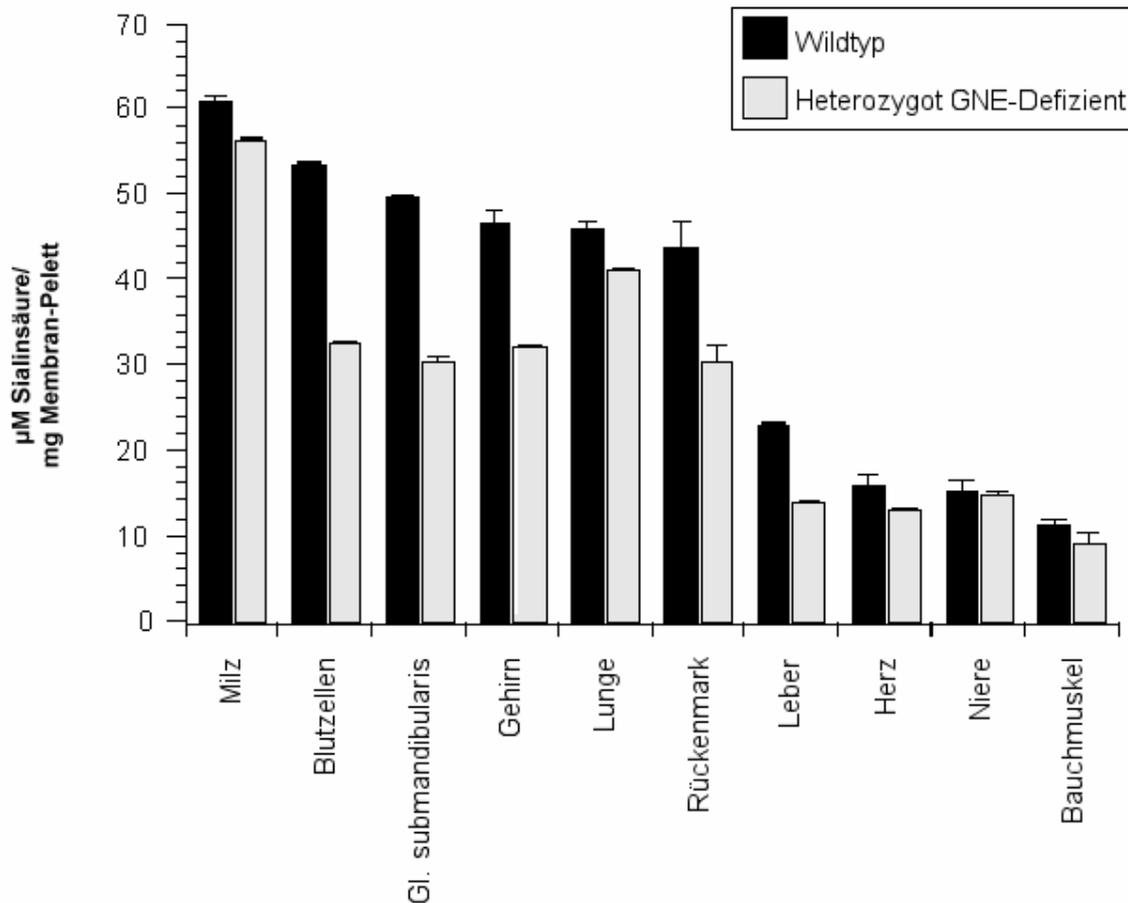


Abbildung 3.2 Vergleich des natürlichen Sialinsäuregehaltes verschiedener Organe zwischen Wildtyp- und HT-GNE-Mangel-Mäusen. Nach Homogenisierung der Organe erfolgte die Isolierung der Membranfraktionen. Anschließend wurde die jeweilige Sialinsäurekonzentration mittels Periodat-/Resorcinolmethode gemessen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (inklusive Standardabweichung) aus 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils 2 WT- oder 2 HT-GNE-Mangel-Mäusen (= 6 Tiere pro Balken).

Diese Reduktion sollte nun durch ein weiteres Experiment bestätigt werden. Da Serum-Transferrin ein Modellglycoprotein für Glycosylierungsmuster ist (Xin et al. 1991), untersuchten wir es von Wildtyp und GNE-defizienten Mäuse mittels 2-D-Gel-Elektrophorese und Western-Blot. Die Serumkonzentration war dabei in beiden Tiermodellen ähnlich (Abb. 3.3A). Trotzdem fanden wir ein voneinander abweichendes Wanderungsmuster. In Wildtyp-Mäusen stellte sich ein scharf begrenzter Punkt dar (Abb.3.3B, blauer Pfeil), wobei davon auszugehen ist, dass es sich hierbei um vollständig Glycosyliertes Transferrin handelt. Bei den GNE-Mangel-Mäusen hingegen fanden wir 2 weitere Punkte mit deutlichem Shift in einen niedrigeren pH-Bereich (Abb. 3B, rote Pfeile). Diese könnten demnach jeweils einem Verlust der Sialylierung an einer bzw. zwei Ketten entsprechen. Ein damit verbundener Verlust an Molekulargewicht ist zudem bereits andeutungsweise in Abb. 3.3A zu erkennen.

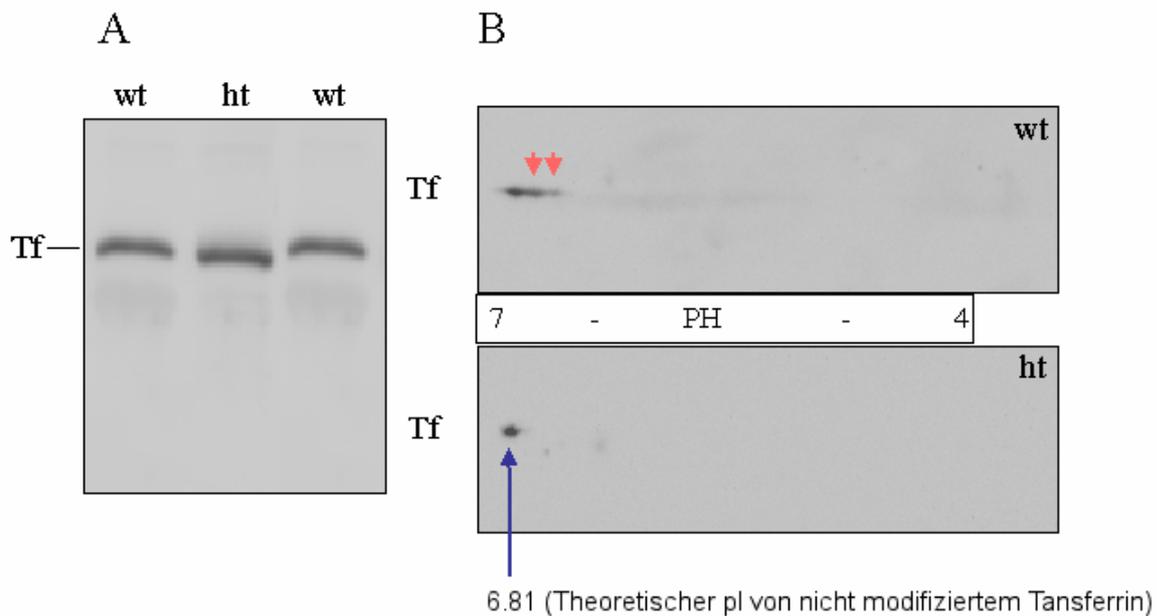


Abbildung 3.3 Analyse von Transferrin.

Serumproben von Wildtyp- oder heterozygoten GNE-Mangel-Mäusen wurden auf 7,5% SDS-Gelen (A) oder mittels 2D-Gelelektrophorese (B) aufgetrennt und mittels Western-Blot (polyklonaler Antitransferrin-Antikörper) analysiert. Die roten Pfeile zeigen ein leicht abgewandeltes Molekulargewicht (3-stufig bei WT-Mäusen) an.

3.1.3 Veränderung des Sialinsäuregehaltes nach Behandlung mit ManNAc

ManNAc-Applikation steigert die Sialylierung und Polysialylierung von NCAM *in vitro* (Bork et al. 2005). Nun stellte sich natürlich die Frage, ob ähnliche Befunde auch *in vivo* zu beobachten sind. Um eine Antwort darauf zu finden, behandelten wir eine definierte Anzahl von C57 BL/6-Mäusen über einen Zeitraum von 1, 4 oder 13 Tagen zweimal täglich mit 1000 mg/kg KG ManNAc (intraperitoneale Injektion). Hierbei beobachteten wir – außer in der Gl. submandibularis, deren Sialinsäuregehalt auch nach ManNAc-Applikation unbeeinflusst blieb (Abb. 3.4A) – eine organspezifische Zunahme der Sialinsäuren in Gehirn, Rückenmark, Blutzellen, Niere und Leber, wobei nach 13 Tagen die höchste Sia-Konzentration gemessen werden konnte (Abb. 3.4B). Die anderen Organe (Bauchmuskulatur, Herz, Lunge und Milz) zeigten hingegen einen komplexeren Ablauf. Einem starken Anstieg des Sialinsäuregehaltes nach bereits einem Tag folgte ein Rückgang bis zum Tag 4 bzw. ein erneuter Anstieg bis zum 13. Tag (Abb. 3.4B). Dieser Ablauf war in allen Wiederholungsversuchen sehr gut reproduzierbar.

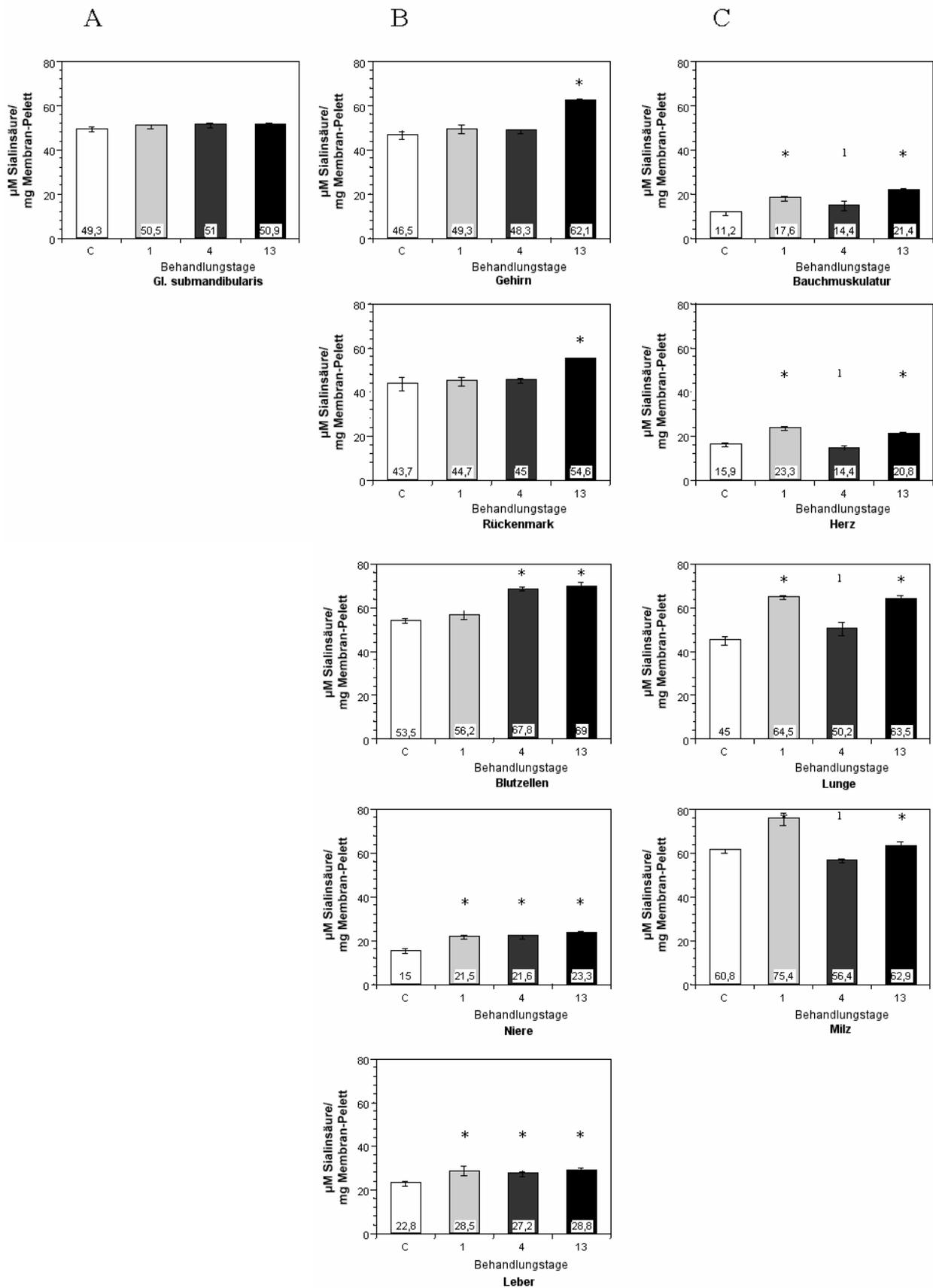


Abbildung 3.4 Quantifizierung des Sialinsäuregehaltes verschiedener Organe nach Behandlung mit ManNAc. Mäusen wurde über 1, 4 oder 13 Tage zweimal täglich 1 g/kg KG ManNAc intraperitoneal injiziert. Anschließend erfolgte die Homogenisierung der Organe, die Isolierung der Membranfraktionen und die Messung der jeweiligen

Sialinsäurekonzentration mit Hilfe der Periodat-/Resorcinolmethode. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (inklusive Standardabweichung) aus 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils 2 WT-C57BL6-Mäusen (= 6 Tiere pro Balken). * = Signifikanter Anstieg im Vergleich zu den Kontrolltieren ($p < 0.01$). 1 = Signifikanter Abfall im Vergleich zu den Kontrolltieren ($p < 0.01$).

3.1.4 Veränderung des Sialinsäuregehaltes unter ManNProp-Behandlung

3.1.4.1 Vergleich: ManNProp vs. Ac₄ManNProp

Da ManNProp wie ManNAc im Detail noch nicht identifizierte Transportmechanismen benötigt, um die Plasmamembran zu überqueren, nutzten wir für den Großteil unserer Experimente peracetyliertes ManNProp (Ac₄ManNProp). In verschiedenen *in vitro*-Experimenten konnte diesbezüglich bereits gezeigt wurde, dass jene lipophilen Mannosamine ohne spezifische Transportmechanismen in die Zellen aufgenommen und über unspezifische Esterasen in den "freien" Zucker überführt werden (Sarkar et al. 1995; Collins et al. 2000; Jones et al. 2004). Um diese Befunde *in vivo* zu bestätigen, injizierten wir zweimal täglich 200 mg/kg Ac₄ManNProp oder 1000 mg/kg ManNProp und verglichen die eingebaute N-Propanoyl-Neuraminsäure in Lebermembranen nach 4 Tagen. Wie erwartet, fanden wir keine Unterschiede. In beiden Fällen wurden zwischen 20 und 25 % der natürlichen Sialinsäuren ersetzt, obwohl - in Anbetracht der jeweiligen Molekulargewichte - die Dosis des injizierten Ac₄ManNProp auf 1/10 der ManNProp-Dosis reduziert wurde (Abb. 3.5). Auch bezüglich der Gesamtsialinsäuren gab es keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.7).

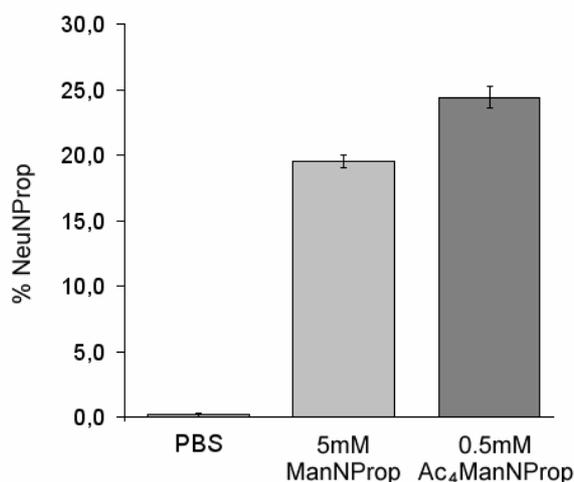


Abbildung 3.5 Vergleich des Einbaus von 5mM ManNProp und 0.5mM Ac₄ManNProp.

C57BL6-Mäuse wurden über 4 Tage zweimal täglich mit 1 g/kg KG ManNProp oder 200 mg/kg KG Ac₄ManNProp behandelt. Anschließend wurde die Leber entnommen, homogenisiert, die Membranfraktion isoliert und der prozentuale Einbau von N-Propanoyl-Neuraminsäure mittels HPLC ermittelt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (inklusive Standardabweichung) aus 3 unabhängigen Versuchen.

3.1.4.2 Behandlung von Wildtyp-Mäusen

Zunächst gingen wir der Frage nach, ob die Gabe von ManNProp - ähnlich wie ManNAc - ebenfalls zu einem Anstieg der Gesamtsialinsäuren führt. Hierzu injizierten wir den Mäusen über einen Zeitraum von 1, 2, 4, 13 und 45 Tagen zweimal täglich 200 mg/kg KG Ac₄ManNProp und quantifizierten anschließend den Sia-Gehalt der Organmembranen mittels Resorcinoltest. Im Einklang mit unseren ManNAc-Versuchen führte auch die Applikation von Ac₄ManNProp zu einem organspezifischen Anstieg der membrangebundenen Sialinsäuren, wobei Gehirn und Milz die stärksten Zunahmen zeigten. Ähnlich wie unter der Behandlung mit dem natürlichen Sia-Vorläufer fanden wir nach 4 Tagen einen zwischenzeitlichen Abfall der Gesamtsialinsäuren. Auch hier kam es allerdings nach 13 Tagen zu einem Wiederanstieg. Zusätzlich behandelten wir eine Tiergruppe über 45 Tage. Hierbei zeigte sich eine gleichbleibende Sialinsäuremenge, so dass wir annehmen können, dass es sich bei den erhobenen Messwerten um die Sättigungsgrenze der Organmembranen handelt (Abb. 3.6)

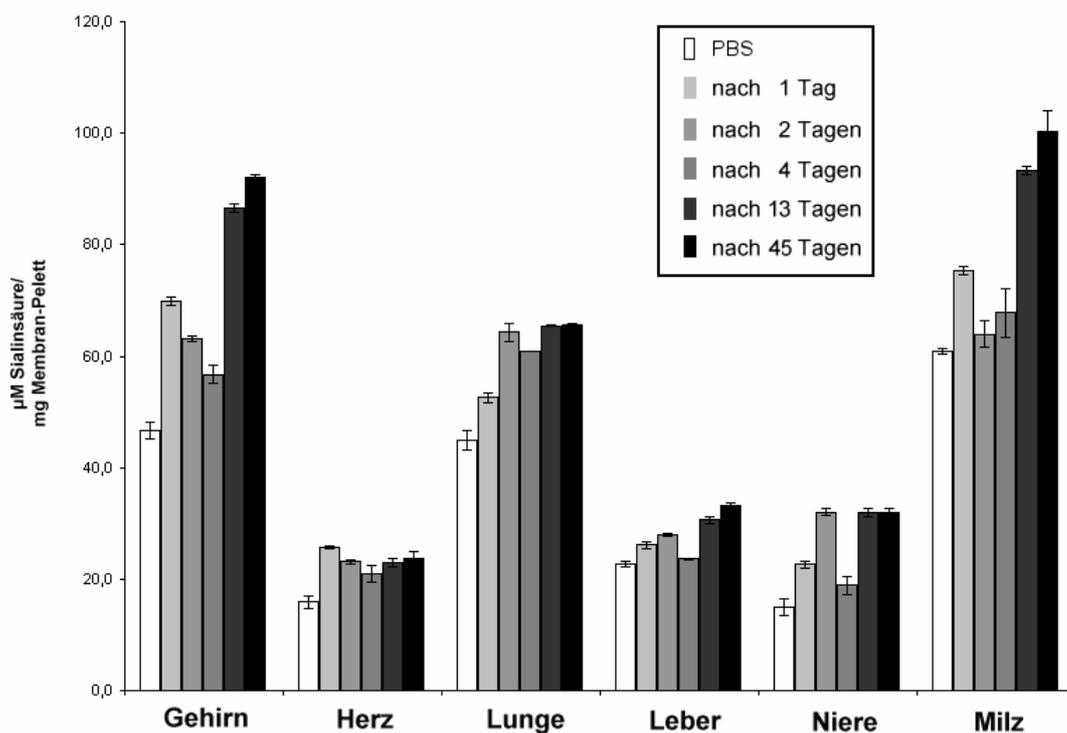


Abbildung 3.6 Quantifizierung des Sialinsäuregehaltes verschiedener Organe nach Behandlung mit Ac₄ManNProp. Mäusen wurde über 1, 2, 4, 13 oder 45 Tage zweimal täglich 200 mg/kg KG Ac₄ManNProp intraperitoneal injiziert. Anschließend erfolgte die Homogenisierung der Organe, die Isolierung der Membranfraktionen und die Messung der jeweiligen Sialinsäurekonzentration mittels Periodat-/Resorcinolmethode. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (mit Standardabweichung) von mindestens 5 Tieren.

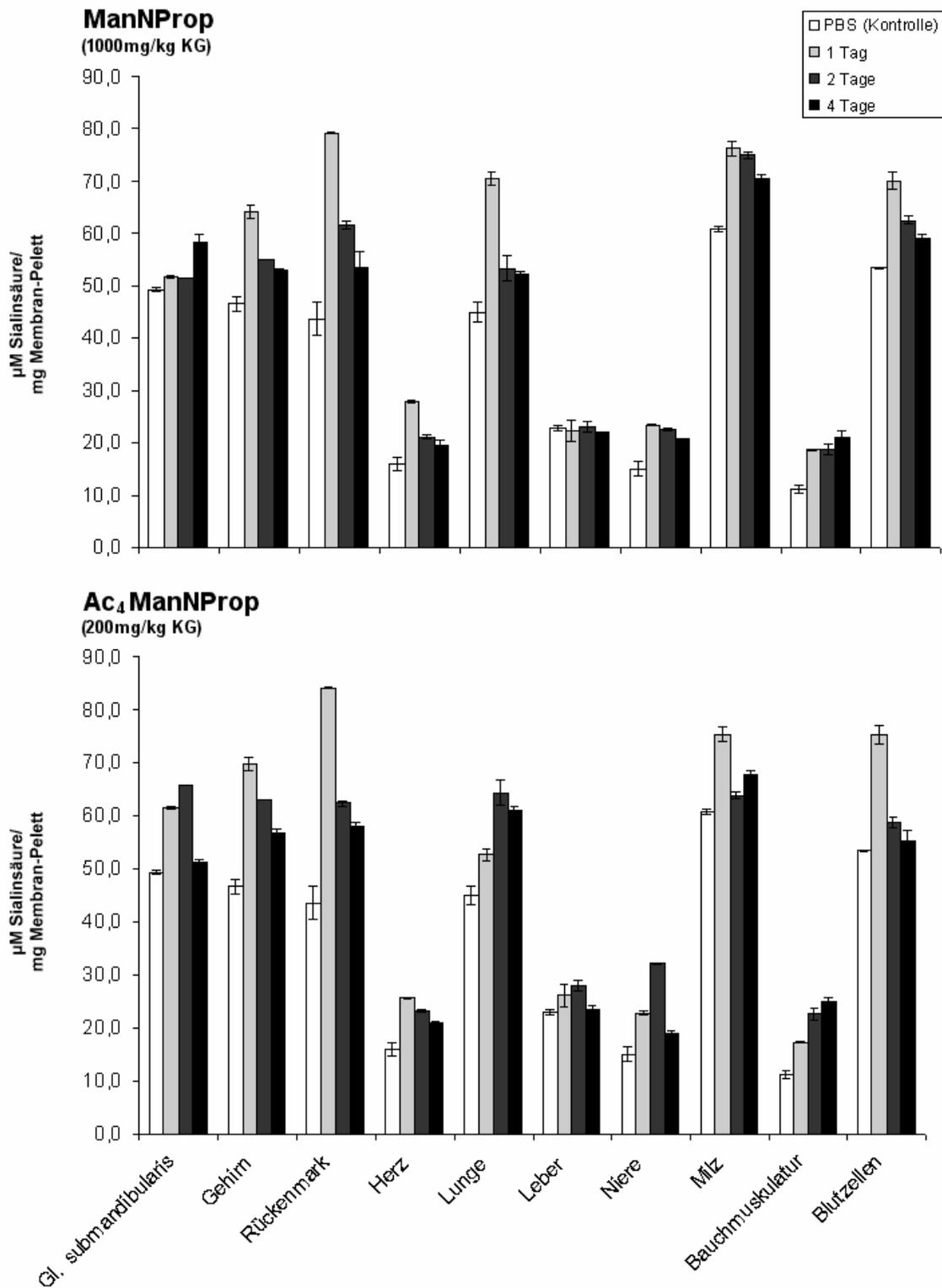


Abbildung 3.7 Vergleich des Sialinsäuregehaltes nach Behandlung mit ManNProp und Ac₄ManNProp

C57BL6-Mäuse wurden über 1, 2 oder 4 Tage zweimal täglich mit 1 g/kg KG ManNProp oder 200 mg/kg KG Ac₄ManNProp behandelt. Anschließend erfolgte die Homogenisierung der Organe, die Isolierung der Membranfraktionen und die Messung der jeweiligen Sialinsäurekonzentration mittels Periodat-/Resorcinolmethode. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (inklusive Standardabweichung) von mindestens 5 Tieren.

3.1.4.3 Behandlung von heterozygoten GNE-Mangel-Mäusen

Wie verhält sich nun aber der Sialinsäuregehalt bei GNE-Mangel-Mäusen? Aufgrund der Tatsache, dass Sia-Analoga, wie z.B. ManNProp, nach der GNE-Aktivität in den Sia-Syntheseweg münden, stellte sich natürlich die Frage, ob sich die Menge der membrangebundenen Sia bei GNE-Mangel-Mäusen und Wildtyp-Mäusen nach einer Behandlungsdauer von 4 Tagen annähert. Interessanterweise beobachteten wir diese Tendenz lediglich in der Gl. submandibularis und in den Blutzellen. Milz, Gehirn, Rückenmark, Leber, Herz, Niere und Bauchmuskel behielten dagegen das bereits zuvor beschriebene Defizit bei. In der Lunge verzeichneten wir sogar eine Zunahme des Defizits im Vergleich zu den nicht behandelten GNE-Mangel-Mäusen (Abb. 3.8).

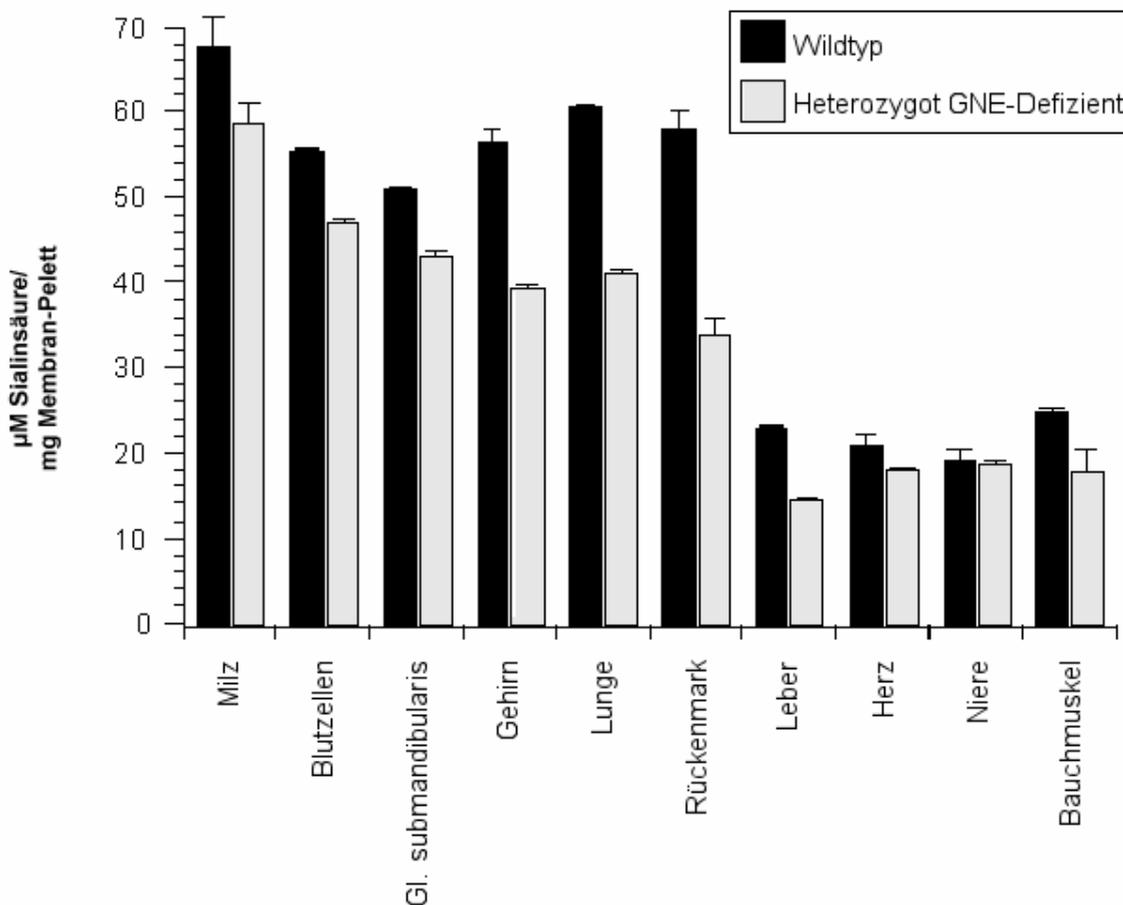


Abbildung 3.8 Vergleich des Sialinsäuregehaltes verschiedener Organe zwischen Wildtyp- und HT-GNE-Mangel-Mäusen nach Behandlung mit Ac₄ManNProp. Wildtyp- und HT-GNE-Mangel-Mäuse wurden über 4 Tage zweimal täglich mit 200 mg/kg KG Ac₄ManNProp behandelt. Nach Homogenisierung der Organe erfolgte die Isolierung der Membranfraktionen. Anschließend wurde die jeweilige Sialinsäurekonzentration mittels Periodat-/Resorcinolmethode gemessen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (inklusive Standardabweichung) von mindestens 5 Tieren.

3.1.5 Veränderung des Sialinsäuregehaltes unter ManNPent-Behandlung

In einer weiteren Versuchsreihe untersuchten wir den Einfluss der Länge der N-Acetylseitenkette. Daher injizierten wir über max. 13 Tage 200 mg/kg KG Ac₄ManNPent. Interessanterweise beobachteten wir hierbei in den meisten Organen (Gl. submandibularis, Herz, Leber, Milz, Blutzellen) auch noch nach 13 Tagen niedrigere Gesamtsial-Konzentrationen als in den Kontrollmäusen. Lediglich die ZNS-Präparate zeigten einen signifikanten Anstieg (Abb. 3.9).

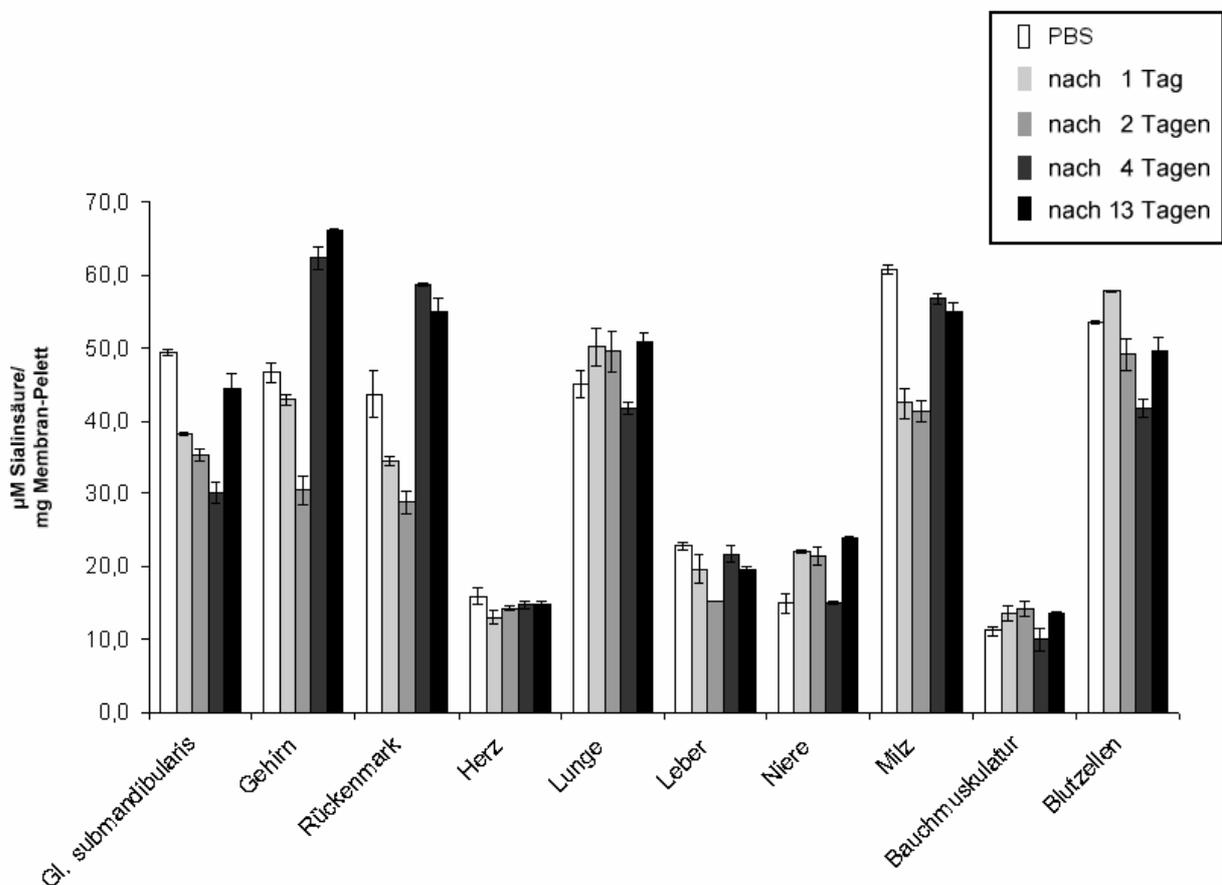


Abbildung 3.9 Quantifizierung des Sialinsäuregehaltes verschiedener Organe nach Behandlung mit Ac₄ManNPent. Mäusen wurde über 1, 2, 4 oder 13 Tage zweimal täglich 200 mg/kg KG Ac₄ManNPent intraperitoneal injiziert. Anschließend erfolgte die Homogenisierung der Organe, die Isolierung der Membranfraktionen und die Messung der jeweiligen Sialinsäurekonzentration mittels Periodat-/Resorcinolmethode. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (mit Standardabweichung) von mindestens 5 Tieren.

3.2 Organabhängiger Einbau von NeuNProp in die Membranen

3.2.1 Austausch natürlicher Sia in Abhängigkeit von der Behandlungszeit (WT)

Im nächsten Experiment untersuchten wir, wie viele der natürlichen Sialinsäuren - und welche (N-Acetyl oder N-Glycolyl) bevorzugt - durch den synthetischen Zucker ausgetauscht werden. Hierzu analysierten wir die Membranpräparate mittels HPLC-Technik. Interessanterweise fanden wir in allen untersuchten Organen N-Propanoyl-Neuraminsäure. Der Prozentsatz der ausgetauschten Sia nahm mit steigender Behandlungsdauer zu, wobei nach 45 Tagen das Maximum erreicht wurde. Etwas überrascht waren wir über den relativ geringen Austausch im Gehirn (1% nach 45 Tagen). Den höchsten Umsatz zeigte das Herz mit über 60% N-Propanoyl-Neuraminsäure. In Leber, Niere und Milz wurden jeweils über 40%, in der Lunge etwas 1/4 der natürlichen Sialinsäuren ersetzt (Abb. 3.10). Außerdem konnten wir zeigen, dass es bezüglich der natürlichen Sia keine signifikante Bevorzugung gab. Am Beispiel des Herzens erkennt man, dass der Anteil der N-Acetyl-Neuraminsäure nach 45 Tagen von 50% auf 20% bzw. der der N-Glycolyl-Neuraminsäure von 50% auf 28% gefallen ist (Abb. 3.11).

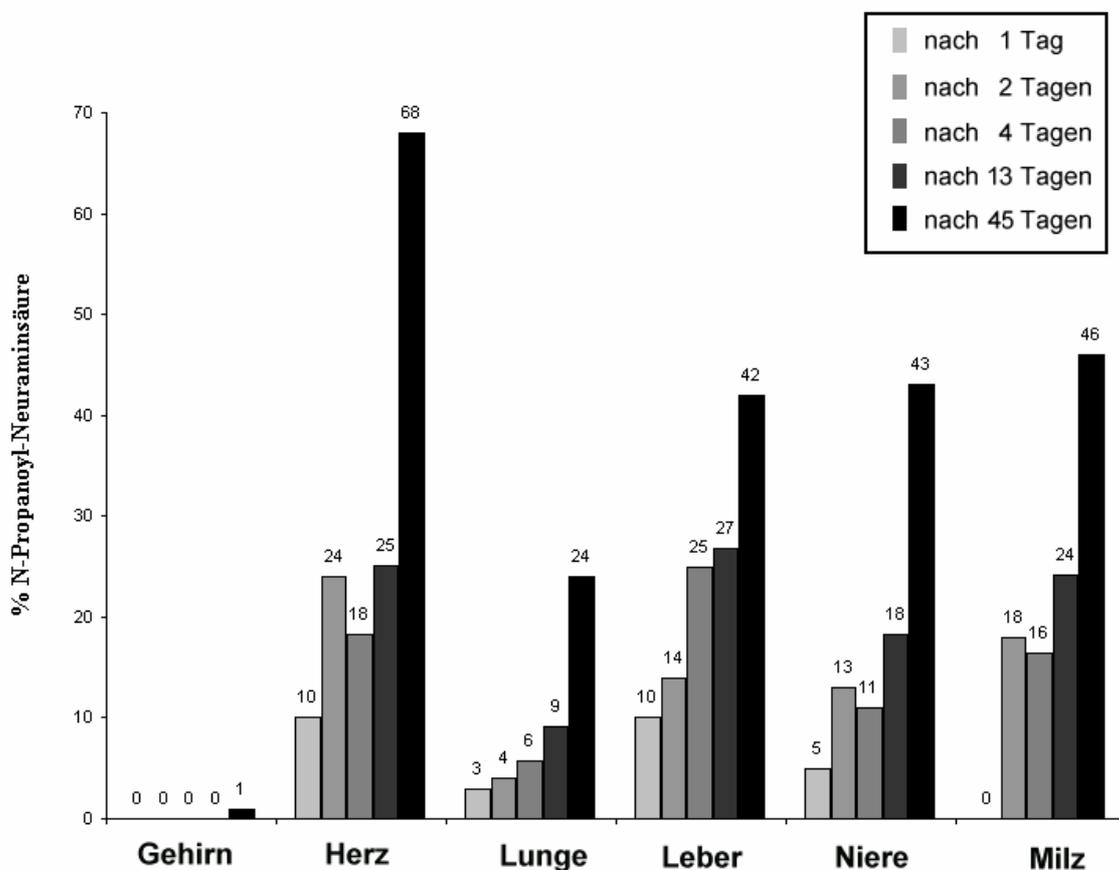


Abbildung 3.10 Zeit- und Organabhängiger Einbau von N-Propanoyl-Neuraminsäure

Mäusen wurde über 1, 2, 4, 13 oder 45 Tage zweimal täglich 200 mg/kg KG Ac₄ManNProp intraperitoneal injiziert. Anschließend erfolgte die Homogenisierung der Organe, die Isolierung der Membranfraktionen und die Messung des prozentualen Einbaus von N-Propanoyl-Neuraminsäure mittels HPLC. Die Balken repräsentieren den Mittelwert von mindestens 5 Tieren.

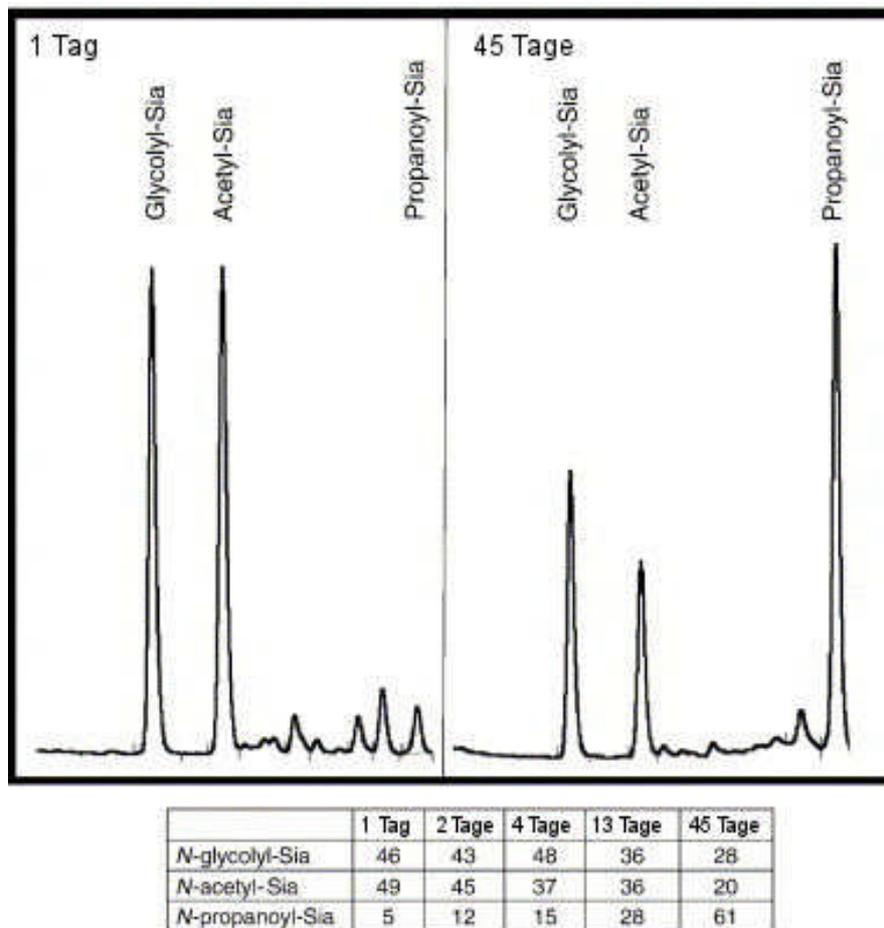


Abbildung 3.11 Austausch der natürlichen Sialinsäuren (N-Acetyl-/N-Glycolyl-Sia) am Beispiel des Herzens. Mäusen wurde über 1, 2, 4, 13 oder 45 Tage zweimal täglich 200 mg/kg KG Ac₄ManNProp intraperitoneal injiziert. Anschließend wurde das Herz entnommen, homogenisiert, die Membranfraktion isoliert und mittels HPLC analysiert. Die Abbildung stellt ein repräsentatives Elutionsprofil nach einem Tag und 45 Tagen dar. Die Tabelle fasst alle beobachteten Daten zusammen.

3.2.2 Epimerase-knock-out-Mäuse nach 4 Tagen ManNProp

Die gleiche Untersuchung führten wir an den für die Epimerase heterozygoten Knock-out-Mäusen durch. Überraschenderweise kam es in 3 Organen zu signifikanten Unterschieden. Während Leber und Milz doppelt soviel Austausch zeigten, fanden sich in der Gl. submandibularis fast gar keine synthetisch veränderten Sialinsäuren. Die übrigen Organe verhielten sich wie bei den Wildtyp-Tieren (Abb. 3.12).

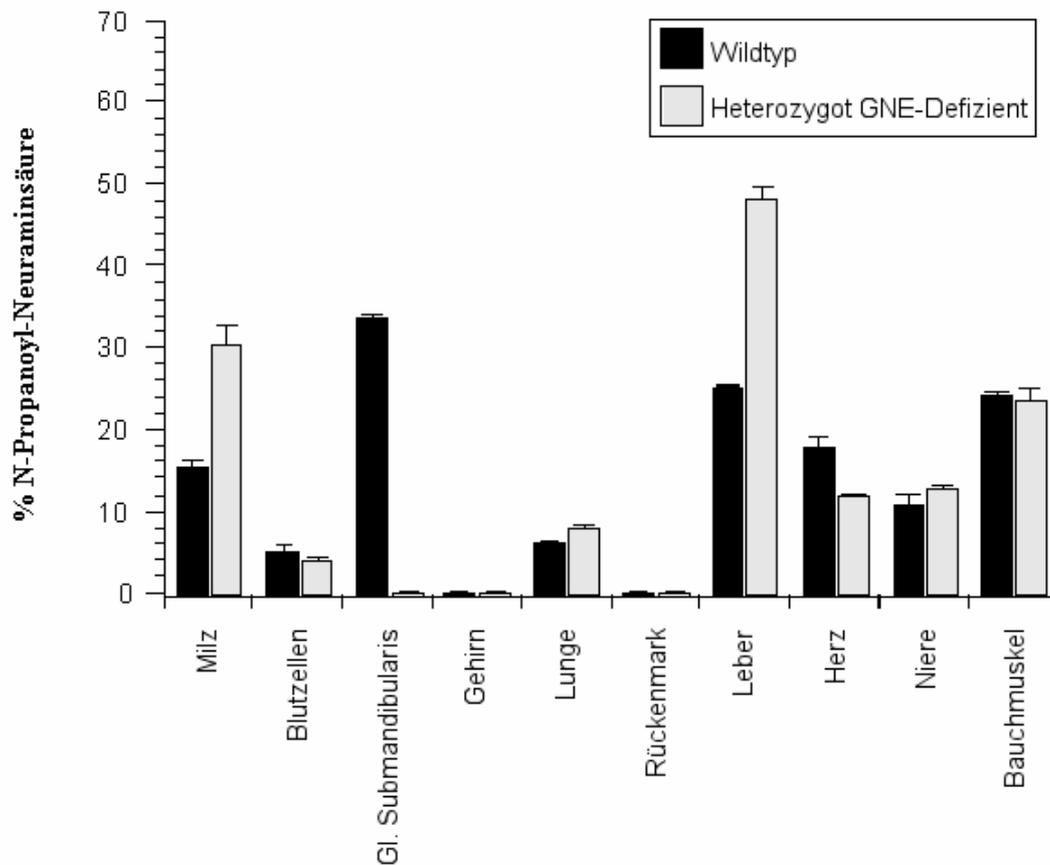


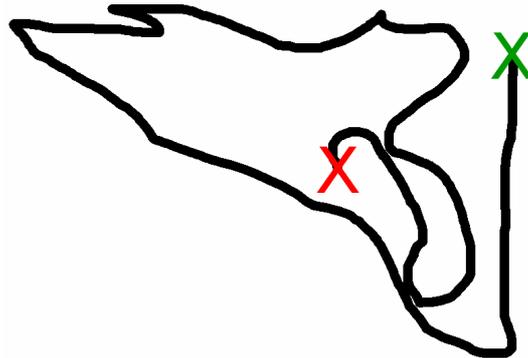
Abbildung 3.12 Vergleich des Einbaus von N-Propanoyl-Neuraminsäure zwischen Wildtyp- und HT-GNE-Mangel-Mäusen. Wildtyp- und HT-GNE-Mangel-Mäuse wurden über 4 Tage zweimal täglich mit 200 mg/kg KG Ac₄ManNProp behandelt. Nach Homogenisierung der Organe erfolgte die Isolierung der Membranfraktionen. Anschließend erfolgte die Analyse mittels HPLC. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (inklusive Standardabweichung) von mindestens 5 Tieren.

3.3 Untersuchung der Tiere bezüglich beobachteter „Nebenwirkungen“

3.3.1 Aktivitätssteigerung nach ManNProp-Behandlung

Im Rahmen unserer Versuche beobachteten wir, dass sowohl die Aktivität als auch die Aggressivität der ManNProp-behandelten Tiere signifikant anstiegen. Im Vergleich zu den Kontrolltieren (78 Wegeinheiten) legten die behandelten Mäuse im gleichen Zeitabschnitt (90 sec) etwa das 3fache (221 Wegeinheiten) an Strecke zurück (Abb. 3.13). Außerdem wurde die Handhabung der Tiere – aufgrund zunehmenden Beißverhaltens – mit steigender Behandlungszeit immer schwieriger.

A



B

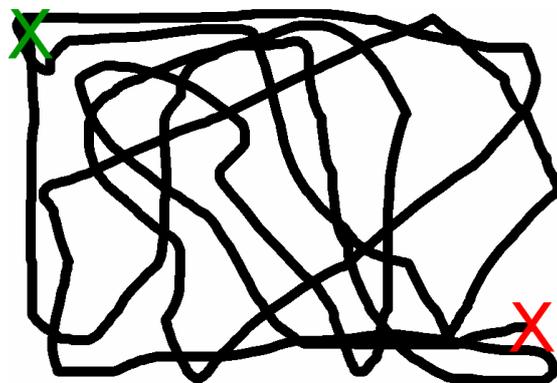


Abbildung 3.13 Laufstrecke nach Behandlung mit PBS (A) und Ac₄ManNProp (B) in jeweils 90 sec

Mäusen wurde über 13 Tage zweimal täglich 200 mg/kg KG Ac₄ManNProp intraperitoneal injiziert. Am 8. Tag erfolgte eine Videoaufnahme von 90 sec. Das Video wurde auf einem 15“-Monitor betrachtet, die Laufstrecke auf einer darüberliegenden Folie nachgezeichnet und deren Länge mittels Wegstreckenmessgerät ermittelt. Das grüne Kreuz steht für die Start-, das rote Kreuz für die Stopposition der Aufnahme. Dieses Verhalten konnte in 3 aufeinanderfolgenden Experimenten mit jeweils mindestens 2 Mäusen pro Gruppe beobachtet werden.

Auf der Suche nach einer Erklärung schlossen wir diesen Beobachtungen, neben der bereits geplanten PolySia-NCAM-Untersuchung, eine ausführliche Labordiagnostik (u.a. Testosteronbestimmung), histologische/(immun-)histochemische Untersuchungen und eine Verhaltenstestserie an.

3.3.2 Veränderung der NCAM-Polysialylierung

Erst vor Kurzem war unsere Arbeitsgruppe in der Lage zu demonstrieren, dass ManNProp *in vitro* über die Hemmung der ST8SiaII zu einer Senkung der Polysialylierung von NCAM führt (Horstkorte et al. 2004). Um zu prüfen, ob eine ähnliche Veränderung auch *in vivo* zu beobachten ist, untersuchten wir Gehirnmembranen entsprechender Mausgruppen bezüglich der

Gesamt-Polysialylierung mit Hilfe des Antikörpers 735. Hierbei zeigte sich, dass es nach 13 Tagen ManNAc-Behandlung zu einer 35%igen Steigerung der Polysialylierung kommt. In Gegensatz dazu kam es unter Ac₄ManNProp-Behandlung, wie erwartet, bereits ab dem 1. Tag zu einem Rückgang des Polysialinsäuregehaltes, der sich nach 13 Tagen auf etwa 60% belief (Abb. 3.14 A und B).

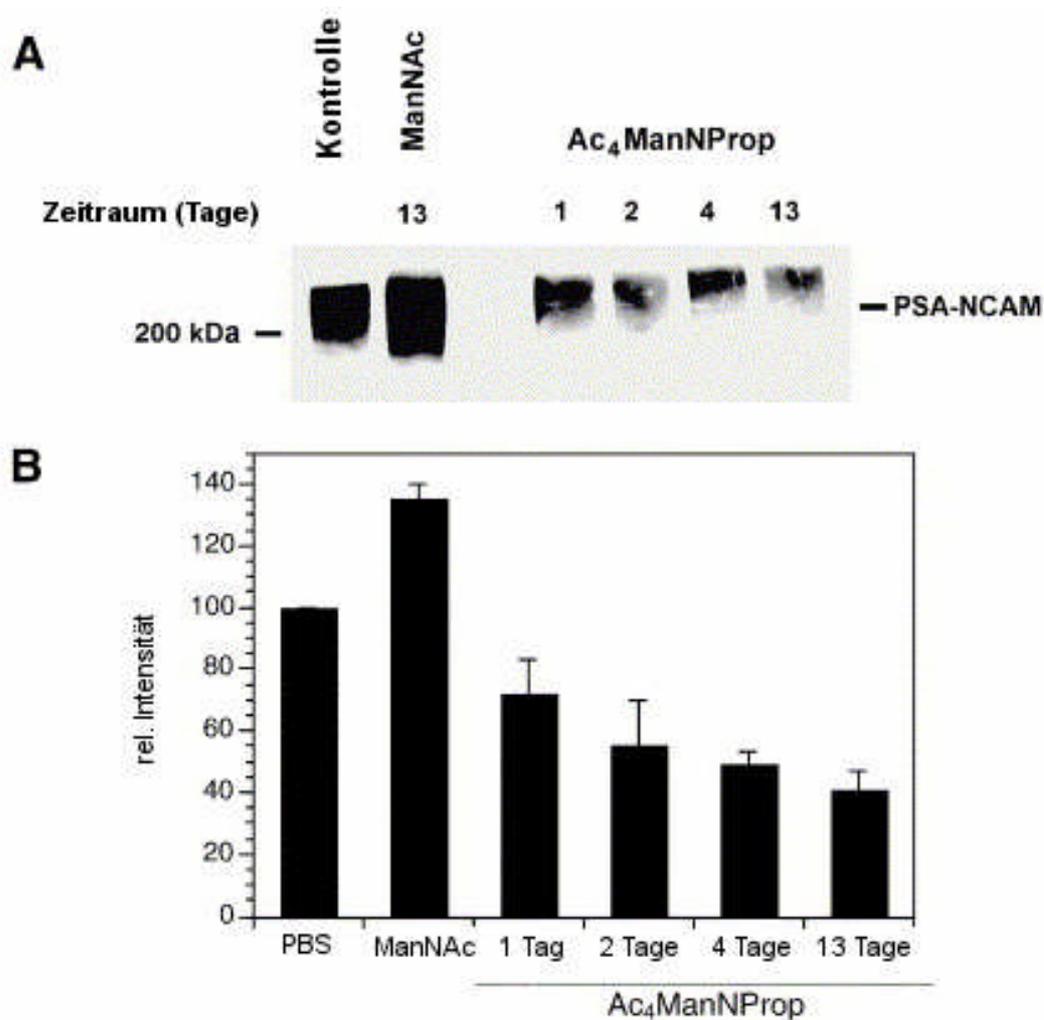


Abbildung 3.14 Analyse der Polysialylierung von NCAM

Mäusen wurde über 13 Tage zweimal täglich PBS (Bahn 1) oder 1 g/kg KG ManNAc (Bahn 2) bzw. über 1, 2, 4 und 13 Tage 200 mg/kg KG Ac₄ManNProp (Bahn 3-6) intraperitoneal injiziert. Anschließend erfolgte die Entnahme und Homogenisierung der Gehirne, die Isolierung der Membranfraktionen, die Auftrennung der Membransolubilisate in 7,5%-SDS-PAGE-Gelen und die Analyse im Western-Blot.

A) Ergebnis nach Inkubation mit dem monoklonalen Anti-poly-SIA Antikörper 735.

B) Quantifizierung der Western-Blot-Analyse unter (A). Diese wurde unter Nutzung drei unabhängig durchgeführter Versuche ausgeführt (= drei Tiere)

Um diese Ergebnisse zu bekräftigen, untersuchten wir die Gehirnmembranen mit Hilfe des monoklonalen Anti-NCAM-Antikörpers 5B8 (Dodd et al. 1988). Dieser bindet spezifisch an nicht oder nur niedrig polysialyliertes NCAM und bestätigte somit den in Abbildung 3.14 beschriebenen Befund. Nach 13 Tagen ManNAc-Behandlung - mit einer gesteigerten PolySia-Expression - beobachteten wir ein schwächeres Signal des 5B8. Nach Ac₄ManNProp-Applikation - und einer verminderten PolySia-Expression - kam es hingegen zu einer Signalverstärkung des 5B8 (Abbildung 3.15). Nebenbefundlich fiel zudem auf, dass die NCAM-180-Isoform stärker von den Veränderungen betroffen war als die NCAM-140-Isoform.

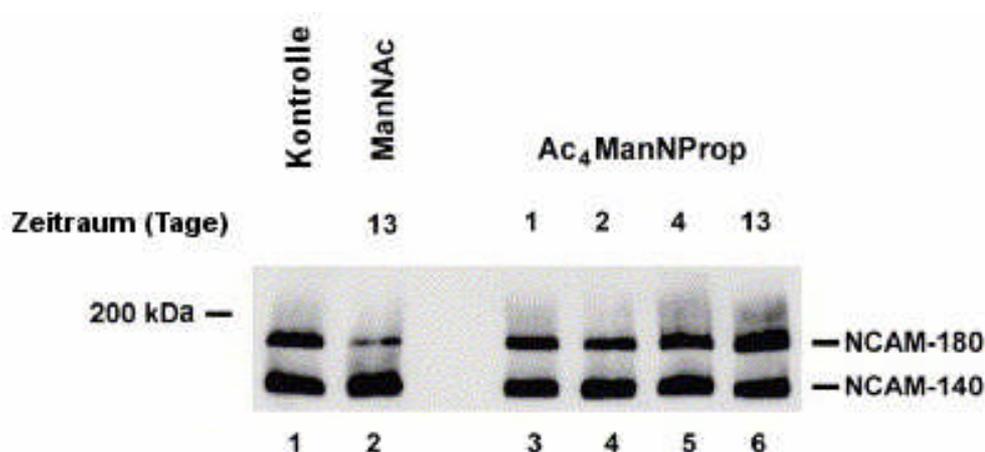


Abbildung 3.15 Analyse der Polysialylierung einzelner NCAM-Isoformen

Mäusen wurde über 13 Tage zweimal täglich PBS (Bahn 1) oder 1 g/kg KG ManNAc (Bahn 2) bzw. über 1, 2, 4 und 13 Tage 200 mg/kg KG Ac₄ManNProp (Bahn 3-6) intraperitoneal injiziert. Anschließend erfolgte die Entnahme und Homogenisierung der Gehirne, die Isolierung der Membranfraktionen, die Auftrennung der Membransolubilisate in 7,5%-SDS-PAGE-Gelen und die Analyse im Western-Blot mit dem monoklonalen Anti-NCAM Antikörper 5B8.

Natürlich wollten wir auch wissen, ob metabolisch hergestellte N-Propanoyl-Neuraminsäure in das "Polysialinsäurenetzwerk" eingebaut wird. Hierzu nutzten wir den monoklonalen Antikörper 13D9. Dieser wurde gegen Gruppe-B *Neisseria meningitidis* entwickelt und erkennt hauptsächlich Polysialinsäuren mit verlängerter Seitenkette. Wir beobachteten sowohl nach 4 als auch nach 13 Tagen einen geringen Einbau, der mit unserer HPLC-Analyse (Abbildung 3.10) im Einklang steht.

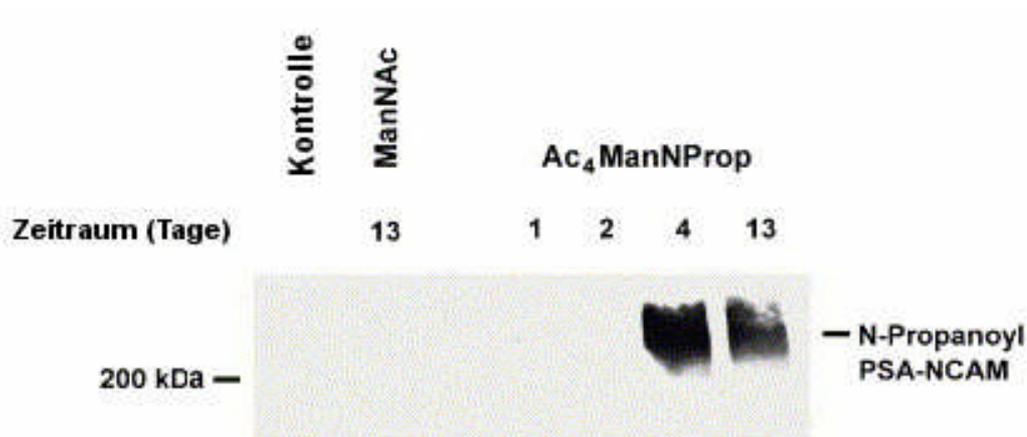


Abbildung 3.16 Einbau von N-Propanoyl-Neuraminsäure in Polysia-NCAM.

Mäusen wurde über 13 Tage zweimal täglich PBS (Bahn 1) oder 1 g/kg KG ManNAC (Bahn 2) bzw. über 1, 2, 4 und 13 Tage 200 mg/kg KG Ac₄ManNProp (Bahn 3-6) intraperitoneal injiziert. Anschließend erfolgte die Entnahme und Homogenisierung der Gehirne, die Isolierung der Membranfraktionen, die Auftrennung der Membransolubilisate in 7,5%-SDS-PAGE-Gelen und die Analyse im Western-Blot mit dem monoklonalen Anti-N-propanoyl-poly-Sia Antikörper 13D9. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängige Versuche.

3.3.3 Anstieg der Testosteronkonzentration im Serum behandelter Mäuse

3.3.3.1 Messungen des Serumtestosterons

Aufgrund der Aggressivitätszunahme behandelter Tiere führten wir zudem Messungen der Serumkonzentration des Testosterons durch. Hierbei zeigte sich ein dramatischer Anstieg der Testosteronschwankungsbreite von 0.5 – 4.4 nmol/l (PBS, Mittelwert: 2.0 nmol/l) auf 0.5 – 54.4 nmol/l (4 Tage ManNAC, Mittelwert: 10.9 nmol/l) bzw. 1.0 – 53.0 nmol/l (4 Tage ManNProp, Mittelwert: 13.3 nmol/l) (Abb.3.17). Betrachtet man die Gesamtstreuung der gemessenen Werte, ist diese nach Behandlung um das 10fache erhöht.

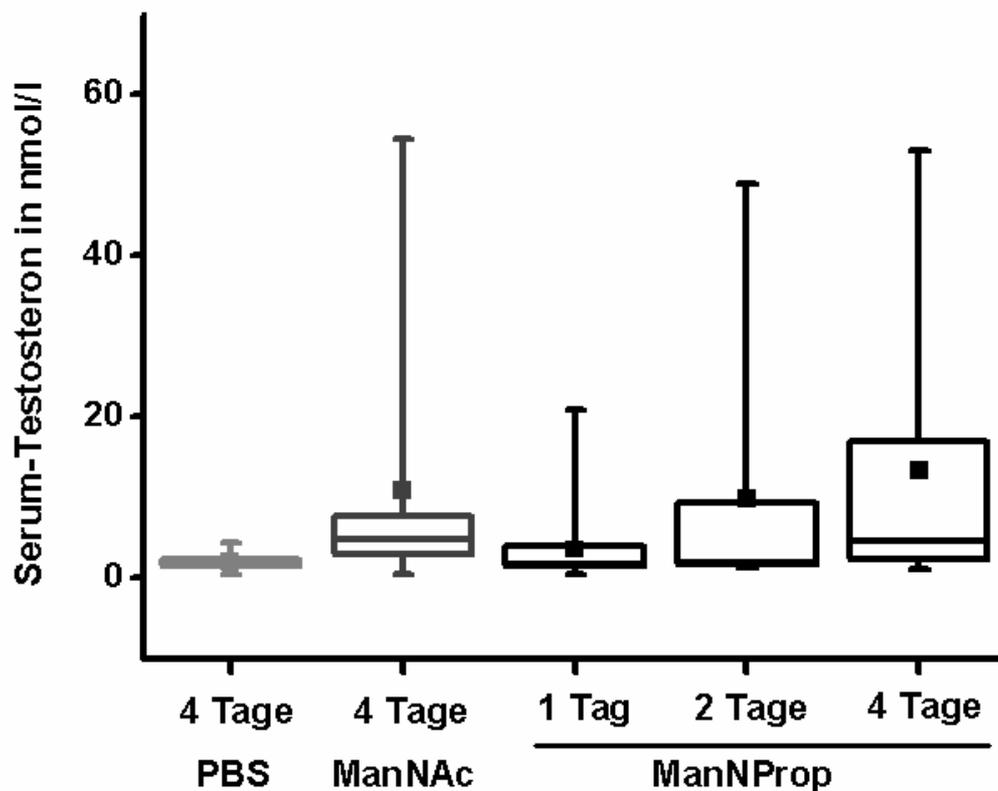


Abbildung 3.17 Analyse der Testosteronkonzentration im Serum

Mäusen wurde über 4 Tage zweimal täglich PBS (Bahn 1) oder 1 g/kg KG ManNAc (Bahn 2) bzw. über 1, 2 und 4 Tage 200 mg/kg KG Ac₄ManNProp (Bahn 3-5) intraperitoneal injiziert. Anschließend wurde das Blut entnommen und in Blutzellen + Serum getrennt. Die Analyse der Testosteronkonzentration erfolgte schließlich mit Hilfe eines RIA-Kits der Firma Orion Diagnostica und einem ELISA-Verfahren, das durch unseren Kooperationspartner (Institut für klinische Chemie, Charité CBF) durchgeführt wurde. Pro Gruppe wurden mindestens 15 Tiere untersucht.

3.3.3.2 Antikörper gegen β -hCG

In der Absicht, einen ersten Anhaltspunkt für die Ursache des Testosteronanstiegs zu finden, entschlossen wir uns, die eventuell begleitende Veränderung des β -CG (Chorion- Gonadotropin beta) bzw. dessen Vertreter in der Maus mCgb (Mus musculus Chorion-Gonadotropin beta) zu untersuchen. Hierzu führten wir zunächst einen Vergleich der Proteinsequenzen von β -hCG und mCgb durch, um zu eruieren, ob der käuflich erwerbliche Antikörper gegen β -hCG auch für Mäuseseren verwendbar ist. Da die Übereinstimmung allerdings nur 81,2% betrug, wurde ein spezifischer Anti-Peptid-Antikörper hergestellt. Die Analyse der mCgb-Sekundärstruktur zur Findung dessen möglicher Epitope basierte auf der von Parker und Kollegen veröffentlichten Methode (Parker et al. 1986). Hierbei stellte sich NH₂-CDDPHLQASSSSKD-CONH₂ als die am

Besten geeignete Sequenz zur Antikörpergewinnung heraus. Es folgte die Synthese des Peptids und anschließend die Immunisierung eines Kaninchens und eines Meerschweinchens über insgesamt 120 Tage. Die Testung des gereinigten Antikörpers nach 60 (A) und 120 Tagen (B) ergab schließlich das in Abbildung 3.18 dargestellte Ergebnis. Wie erwartet zeigte sich nach 120 Tagen ein deutliches Signal auf Höhe 37 kDa (Molekulargewicht des β -hCG bzw. mCgb = 36.5 kDa).

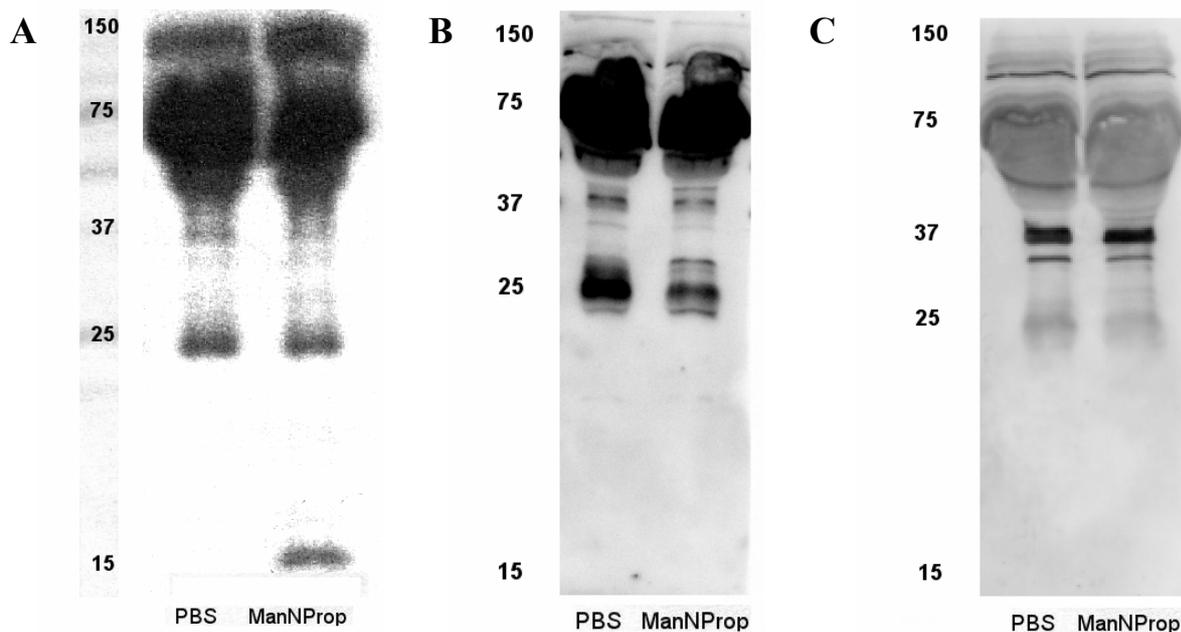


Abbildung 3.18 Vergleich der Serumproteine PBS- vs. ManNProp behandelter Tiere

Mäusen wurde über 4 Tage zweimal täglich PBS (Bahn 1) oder 200 mg/kg KG Ac_4 ManNProp (Bahn 2) intraperitoneal injiziert. Anschließend wurde das Blut entnommen und in Blutzellen + Serum getrennt. Das Serum wurde in 12,5%-SDS-PAGE-Gelen aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. A) Ponceaufärbung der mittels Gelelektrophorese aufgetrennten und auf Nitrocellulosefolie übertragenen Serumproteine. B) mCgb-Antikörpertest nach 60 Tagen Immunisierung. C) mCgb-Antikörpertest nach 120 Tagen Immunisierung. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängige Versuche.

Interessanterweise fand sich bezüglich des mCgb zunächst kein Unterschied zwischen PBS- und ManNProp-behandelten Tieren. In einem anschließenden Versuch, der ManNProp-behandelte Tiere mit hohen Testosteronwerten, denen mit niedriger Konzentration im Serum gegenüberstellte, ergab sich allerdings ein beeindruckend klares Bild. Es zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen Testosteronanstieg und mCgb-Signal (Abbildung 3.19).

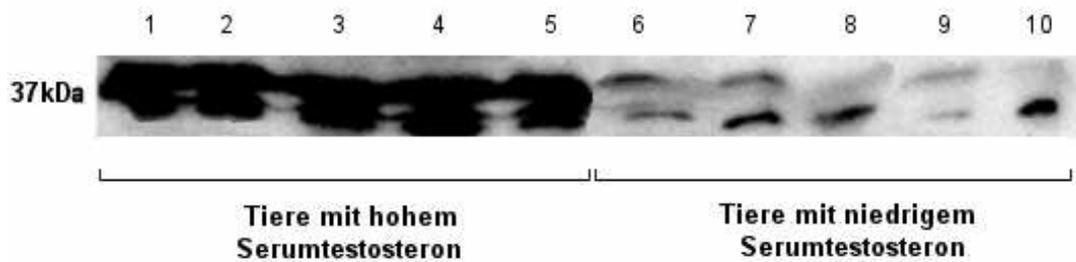
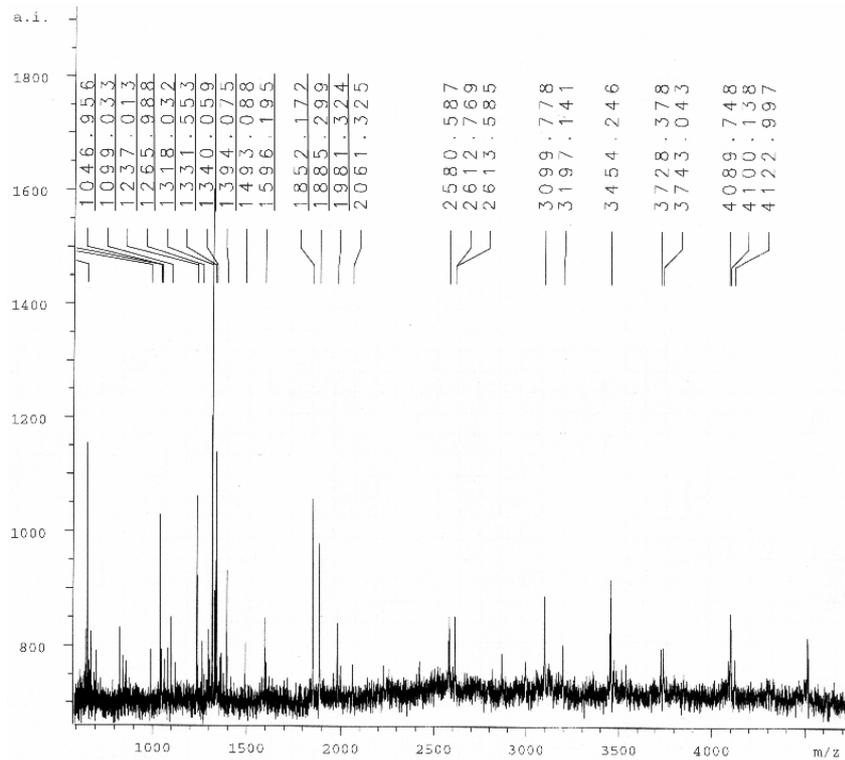


Abbildung 3.19 mCgb-Konzentration im Serum in Abhängigkeit zur Testosteronkonzentration

Mäusen wurde über 4 Tage zweimal täglich PBS, 1 g/kg KG ManNAc oder 200 mg/kg KG Ac₄ManNProp intraperitoneal injiziert. Anschließend wurde das Blut entnommen, in Blutzellen + Serum getrennt und die Testosteronkonzentration ermittelt. Seren mit hoher Testosteronkonzentration wurden auf Bahn 1-5, Seren mit niedriger Testosteronkonzentration auf Bahn 6-10 aufgetragen. Anschließend erfolgte nach der Auftrennung der Solibilisate in 12,5%-SDS-PAGE-Gelen die Analyse im Western-Blot mittels Anti-mCgB-Antikörper. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängige Versuche.

Im Rahmen dieser Untersuchung kamen zwei neue Fragen auf. Zum einen zeigte sich in der Ponceaufärbung der Serumproteine bei ManNProp-behandelten Tieren eine deutliche Bande bei 15 kDa, die bei keinem Kontrolltier gefunden werden konnte (Abb. 3.18B). Zum anderen deutete sich nach ManNProp-Behandlung – wenngleich dies nur auf einer Kreuzreaktion des Antikörpers nach 60 Tagen Immunisierung beruhte – eine verminderte Expression eines 25 kDa großen Proteins an (Abb. 3.18A). Um diesen Proteinen einen Namen geben zu können, untersuchten wir die entsprechenden Gelabschnitte mit Hilfe der MALDI-Technologie. Danach handelt es sich bei dem 25kDa-Fragment sehr wahrscheinlich um das Apolipoprotein A1 (Bestandteil des HDL) und bei dem 15 kDa-Fragment um mTSARG1 (Testis and spermatogenesis cell related protein *Mus musculus*) (Abb. 3.20)

A



B

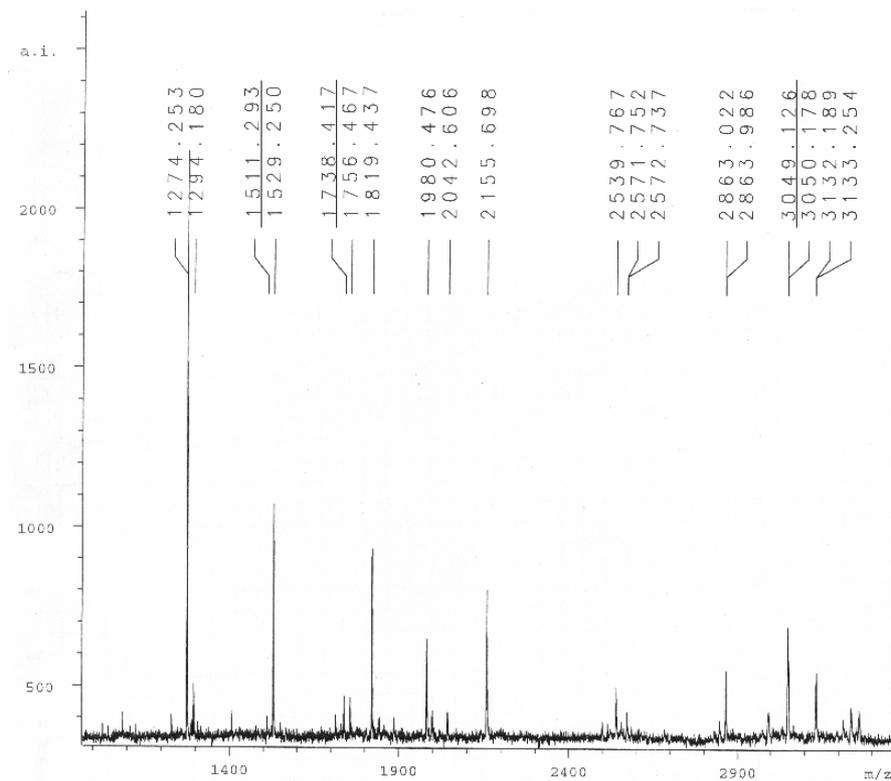


Abbildung 3.20 Analyse auffälliger Proteinbanden

Mäusen wurde über 4 Tage zweimal täglich 200 mg/kg KG Ac₄ManNProp intraperitoneal injiziert. Anschließend wurde das Blut entnommen und in Blutzellen + Serum getrennt. Das Serum wurde in 12,5%-SDS-PAGE-Gelen aufgetrennt und mittels Coomassielösung gefärbt. Anschließend wurden die Proteinbanden auf Höhe 25kDa (A) sowie 15kDa (B) ausgeschnitten und mittels Maldi-Technologie + PeptIdent einem Protein zugeordnet.

3.3.4 Weitere Labordiagnostik

Im Rahmen der Vollständigkeit führten wir zudem Messungen der wichtigsten klinischen und immunologischen Laborparameter durch. Hier fanden wir bezüglich Cholesterin (1.4–2.9 mmol/l), Triglyceriden (0.82–1.98 mmol/l), Gesamtprotein (42–55 g/l) und alkalischer Phosphatase (48–68 U/l) keine signifikanten Abweichungen zwischen PBS-, ManNAc-, ManNProp- und Ac₄ManNProp-Behandlung (jeweils 3 Tiere). Auch in der flusszytometrischen Untersuchung von Blutzellmarkern fand sich bezüglich MHC-II, CD38 (frühe T- and B-Zellen), CD45 (Allgemeines Leukozytenantigen, Tyrosinphosphatase) und CD58 (Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten) keine veränderte Expression.

3.3.5 Histologische und (immun-)histochemische Analysen der Organe

Von allen Organen ManNAc- bzw. Analoga-behandelter Tiere wurden – in Kooperation mit Prof. Dr. Reinhart Gossrau – Kryoschnitte angefertigt, welche mit Sudan-Schwarz, Periodat-acid-Schiffbase, Hematoxylin, Eosin oder Methylen-Blau-Lösung behandelt und anschließend mit den Präparaten der Kontrollmäuse (PBS) verglichen wurden. Es folgte die Analyse bezüglich eventueller Aktivitätsveränderungen der Aminopetidase A, Aminopeptidase M, Dipeptidylpeptidase IV, Gamma-Glutamyltranspeptidase sowie der unspezifischen alkalischen Phosphatase, sauren Phosphatase und der unspezifischen Esterasen. Zusammenfassend fanden bis auf eine Verbreiterung der Keimzellepithelschicht sowie eine erhöhte Spermatogenese im Hoden ManNProp-behandelter Tiere keine signifikanten Unterschiede und v.a. keinen Hinweis auf toxische Eigenschaften von ManNAc, ManNProp oder Ac₄ManNProp (Gamma-GT und AP sind sehr sensitive Marker für toxische Veränderungen (Gossrau and Günther 1993)).

3.3.6 Verhaltenstests

Hierzu starteten wir in Kooperation mit PD Dr. Dirk Montag (Leibniz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg) eine umfangreiche Versuchstierreihe. Insgesamt wurden 15 Tiere jeder Gruppe „Shuttle box“- , „Morris Watermaze“- und „Rotarod“-Tests unterzogen. Diese Untersuchungen sollten Aufschluss über die Lern-, Gedächtnis- und Koordinationsleistungen bringen. Eine Shuttlebox besteht aus zwei identischen Boxen, welche über einen Durchgang miteinander in Verbindung stehen. Das jeweilige Versuchstier wurde in eine der beiden Boxen gesetzt und einem leichten Stromschlag ausgesetzt. Es konnte diesem Schock nur entgehen, indem es in die andere Box wechselte. Das entsprechende Lernverhalten wurde über 5 Tage beobachtet. Hierbei zeigte sich, dass ManNProp-behandelte Tiere ca. 10% häufiger einem elektrischen Schmerzreiz entgehen konnten (Abb. 3.21).

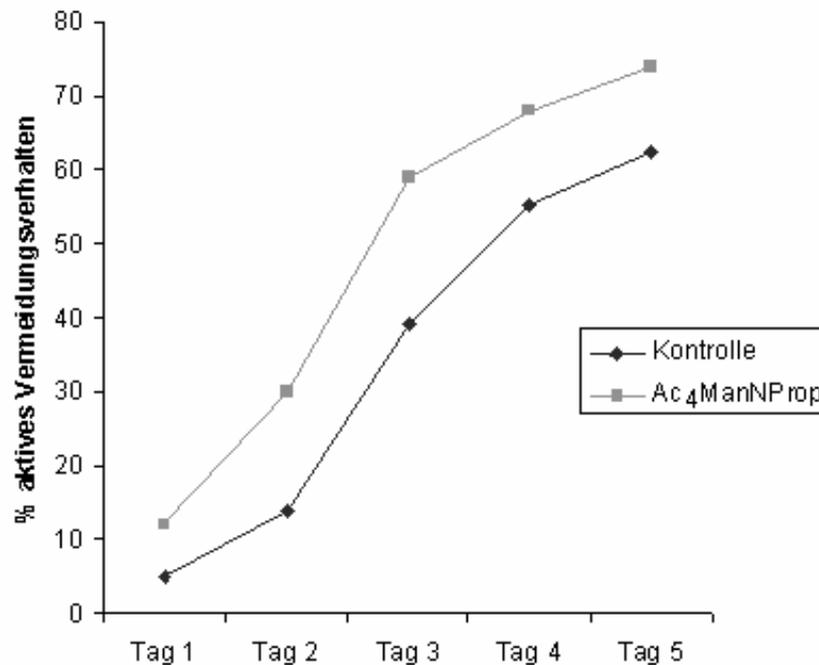


Abbildung 3.21 Analyse des Lern- bzw. aktiven Vermeidungsverhaltens (Shuttlebox)

Mäusen wurde über 45 Tage zweimal täglich PBS (Kontrolle) oder 200 mg/kg KG Ac₄ManNProp intraperitoneal injiziert. Ab der 2. Woche wurden die Tiere einzeln in einer standardisierten „Shuttlebox“ über 5 Tage bezüglich ihres aktiven Vermeidungsverhaltens untersucht. Die Punkte repräsentieren jeweils den Mittelwert von mindestens 3 Tieren.

Mit dem Morris Watermaze-Versuchsaufbau kann neben dem Lernverhalten die räumliche Orientierung und die „Lernflexibilität“ der Tiere untersucht werden (Stewart and Morris 1993). Hierbei mussten die Mäuse lernen, eine für sie unsichtbare Plattform unter der Wasseroberfläche in einem Schwimmbecken zu finden und anschließend auf diese Plattform zu klettern, um aus dem Pool herausgeholt zu werden. Die Schwimmversuche der Mäuse fanden an 5 aufeinanderfolgenden Tagen statt, wobei jede Maus pro Tag 4 Schwimmdurchgänge absolvierte. Am 4. Tag wurde die Position der Plattform verändert, um die "Umlerngeschwindigkeit" der Mäuse zu studieren. Bis zum 3. Tag zeigte sich kein eindrucksvoller Unterschied zwischen beiden Tiergruppen. Den diskreten Vorsprung der Ac₄ManNProp-Tiere holten die Kontrollmäuse bis zum dritten Tag vollständig auf. Interessanterweise zeigte sich jedoch nach der Neuplatzierung der Plattform ein signifikanter Unterschied zu Ungunsten der Ac₄ManNProp-Tiere. Diese brauchten nun etwa 10 Sekunden länger, das angestrebte Ziel zu erreichen (Abb. 3.22).

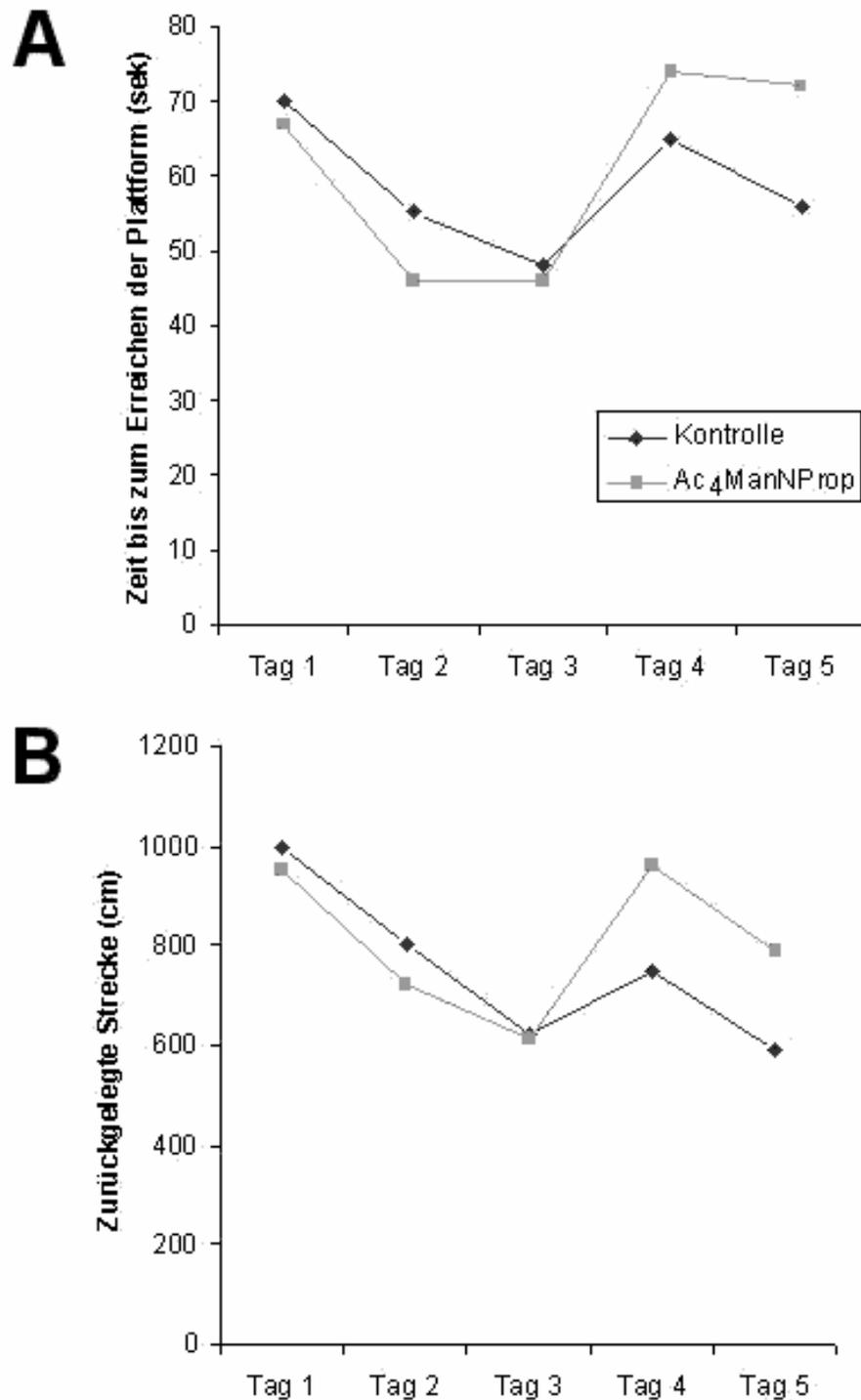


Abbildung 3.22 Analyse der räumlichen Orientierung und Flexibilität (Morris-Watermaze-Test)

Mäusen wurde über 45 Tage zweimal täglich PBS (Kontrolle) oder 200 mg/kg KG Ac₄ManNProp intraperitoneal injiziert. Ab der 2. Woche wurden die Tiere einzeln in einem standardisierten „Morris-Watermaze“-Versuchsaufbau über 5 Tage bezüglich ihrer räumlichen Orientierung und Flexibilität untersucht. Das obere Diagramm (A) zeigt die benötigte Zeit bis zum Erreichen der Plattform, das untere (B) den jeweils zurückgelegten Weg. Die Punkte repräsentieren jeweils den Mittelwert von mindestens 3 Tieren.

Das Rotarod ist ein speziell für Mäuse entwickeltes Laufrad, mit dem die motorische Leistung der Tiere, insbesondere die Koordination der Vorder- und Hinterläufe und die Gleichgewichtsfunktion, erfasst werden kann (Carter et al. 1999). Es handelt sich hierbei um ein akzellerierendes Laufrad, dessen Umdrehungsgeschwindigkeit während der Messung kontinuierlich gesteigert wird. Zu Beginn drehte sich die Stange 4-mal pro min, danach wurde die Umdrehungsgeschwindigkeit alle 30 sec gesteigert, bis nach 300 sec die Maximalgeschwindigkeit von 40 Umdrehungen pro min erreicht war. Sobald die Mäuse das Gleichgewicht verloren und sich nicht mehr auf der Laufstange halten konnten, fielen sie auf eine Kontaktplatte und die Zählung der Laufzeit wurde unterbrochen. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Tiergruppen konnte hierbei nicht gefunden werden.

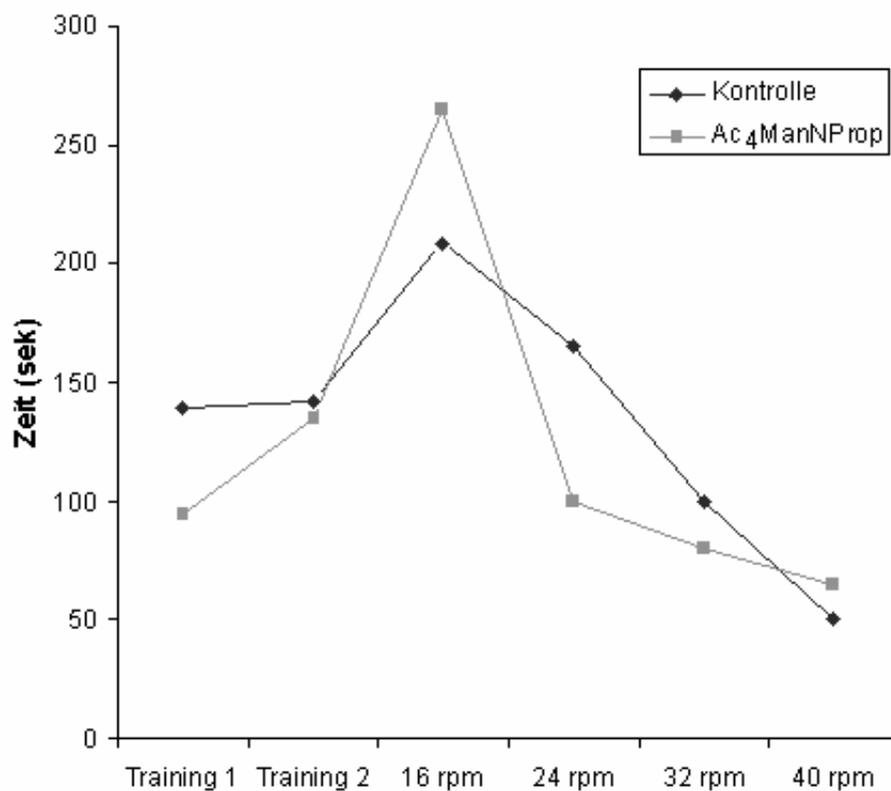


Abbildung 3.23 Analyse von Bewegungskoordination und Gleichgewichtsfunktion (Rotarod)

Mäusen wurde über 45 Tage zweimal täglich PBS (Kontrolle) oder 200 mg/kg KG Ac₄ManNProp intraperitoneal injiziert. Ab der 2. Woche wurden die Tiere einzeln in einem standardisierten „Rotarod“-Versuchsaufbau bezüglich der Koordination von Vorder- und Hinterläufen bzw. Gleichgewichtsfunktion untersucht. Die Punkte repräsentieren jeweils den Mittelwert von mindestens 3 Tieren.

Bei der Prepulse-Inhibition wird die Abschwächung des Schreckreflexes durch einen vor dem eigentlichen Schreckreiz dargebotenen, weniger intensiven Reiz gemessen. Die Prepulse-Inhibitionsmessung wird unter anderem auch zur Untersuchung schizophrener Informationsverarbeitungsdefizite verwendet. Es wird angenommen, dass es sich bei PPI um eine automatisch ablaufende Modulation des Schreckreflexes handelt. Die Modulation wird durch Aufmerksamkeit beeinflusst. Um zu prüfen, ob die Behandlung Einfluss auf die Aufmerksamkeit der Mäuse hat, führten wir zudem eine Messung der Prepulse-Inhibition des Schreckreflexes durch. Gating-Defizite - gestörte Informationsverarbeitungsprozesse, die sich in einer Abschwächung geforderter motorischer Reaktionen auf sensorische Reize äußern - wären in dieser Untersuchung durch eine verminderte Prepulse-Inhibition gekennzeichnet (McGhie and Chapman 1961). Wir fanden keinen signifikanten Unterschied, wenngleich die behandelten Tiere – im Sinne einer verbesserten Aufmerksamkeit – tendenziell etwas besser abschnitten.

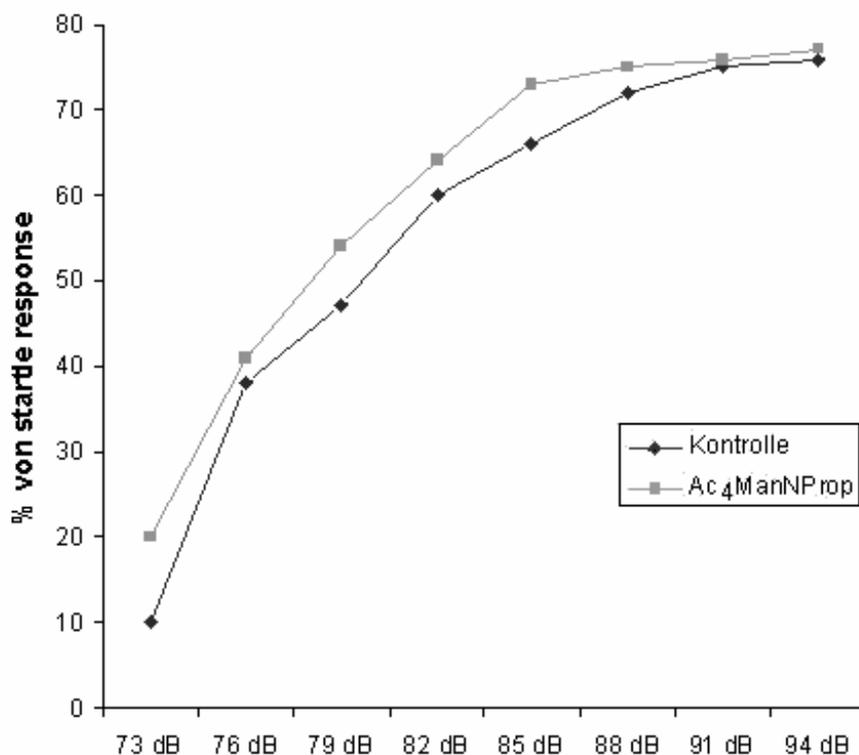


Abbildung 3.24 Analyse der Prepulse-Inhibition (Abschwächung des Schreckreflexes)

Mäusen wurde über 45 Tage zweimal täglich PBS (Kontrolle) oder 200 mg/kg KG Ac₄ManNProp intraperitoneal injiziert. Ab der 2. Woche wurden die Tiere einzeln in einem standardisierten „Prepulse-Inhibition“-Versuchsaufbau bezüglich eventueller Gating-Defizite untersucht. Die Punkte repräsentieren jeweils den Mittelwert von mindestens 3 Tieren.

3.4 Analyse der Myelin-assoziierten Proteine

3.4.1 Veränderung von MBP und MOG *in vivo*

Da sich in *in vitro*-Versuchen mit Oligodendrozyten bereits abzeichnete, dass es unter der Behandlung mit Sia-Analoga zu (noch nicht näher beschriebenen) Veränderungen intrazellulärer Prozesse kommt und wir in einem „Vor-Versuch“, der zusammen mit Verena Künzel im Rahmen der Etablierung eines stabilen EAE (Experimentelle Autoimmunencephalitis) – Mausmodells durchgeführt wurde, eine tendenziell bessere Klinik der behandelten Mäuse beobachten konnten, untersuchten wir Gehirnpräparate auf die Myelinproteine MBP und MOG. Hierbei zeigte sich bezüglich des MBP ein schwächeres Signal nach ManNAc- sowie eine deutliche Signalsteigerung nach ManNProp-Applikation (Abb.3.25A). Gegenteilig verhielt sich die Veränderung des MOG (Abb.3.25B).

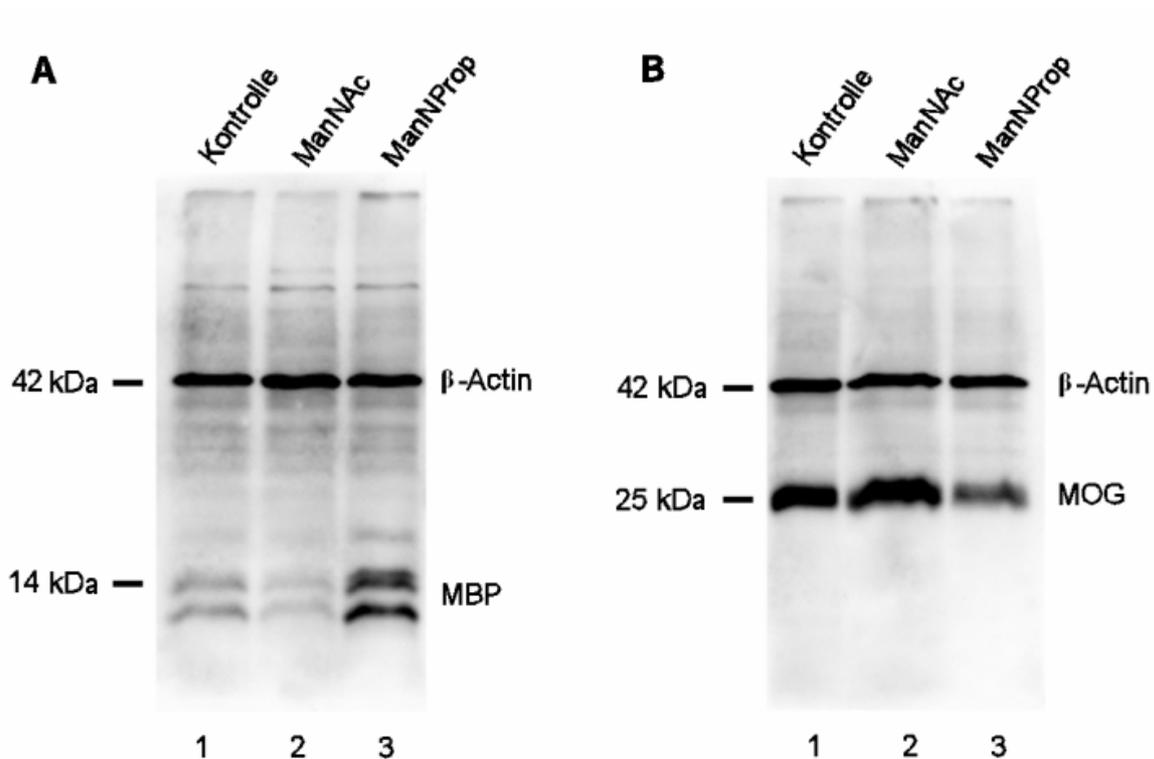


Abbildung 3.25 Analyse der Myelin-assoziierten Proteine MBP und MOG

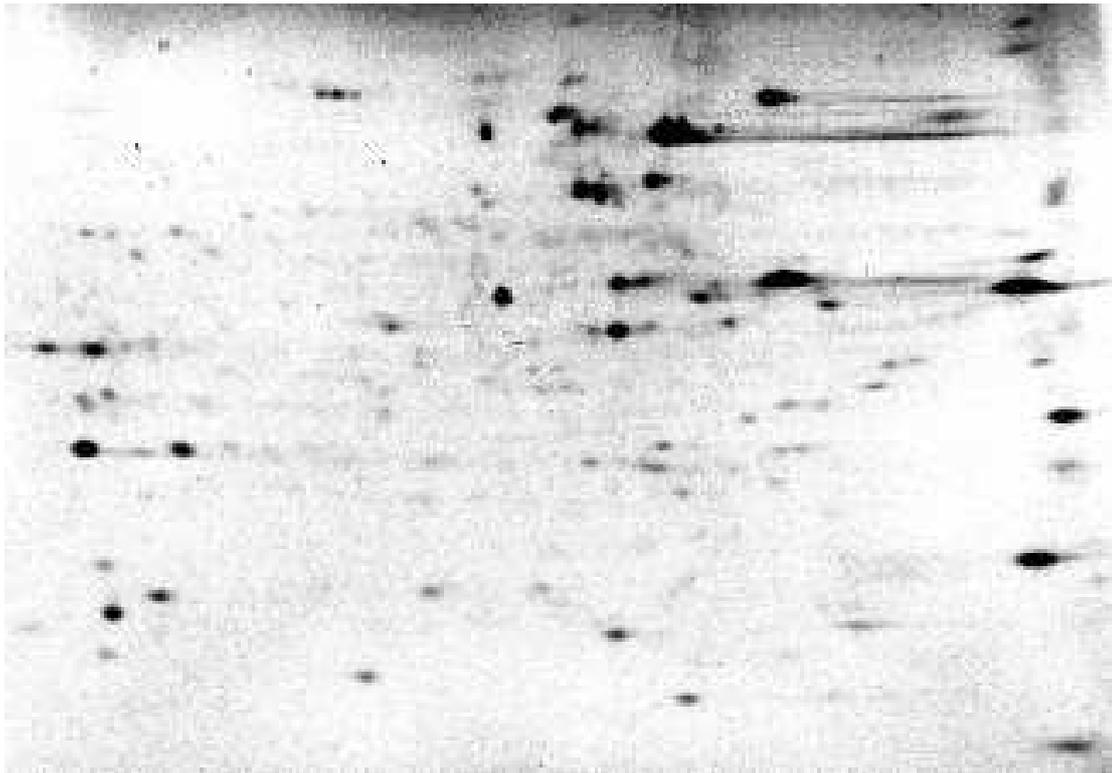
Mäusen wurde über 13 Tage zweimal täglich PBS (Bahn 1), 1g/kg KG ManNAc (Bahn 2) oder 200 mg/kg KG Ac₄ManNProp (Bahn 3) intraperitoneal injiziert. Anschließend erfolgte die Entnahme und Homogenisierung der Gehirne, die Isolierung der Membranfraktionen, die Auftrennung der Membransolubilisate in 7,5%-SDS-PAGE-Gelen und die Analyse im Western-Blot. A) Ergebnis nach Inkubation mit dem polyklonalen Anti-MBP Antikörper. B) Ergebnis nach Inkubation mit dem monoklonalen Anti-MOG Antikörper. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängige Versuche.

3.4.2 Veränderung des Phosphorylierungszustandes von Proteinen in Oli-neu-Zellen

Da alle bisher durchgeführten Experimente keine Aussage erlauben, ob die beobachteten Befunde auf die Veränderung des „Endproduktes“, also der Sialinsäure, zurückzuführen sind oder ob auch intrazelluläre Regulationsmechanismen von den applizierten Sia-Analoga-Vorläufern beeinflusst werden. Da Oligodendrozyten, u.a. aufgrund der oben beschriebenen Veränderungen Myelin-assoziiierter Proteine *in vivo*, ein geeignetes *in vitro*-Modell darzustellen schienen, untersuchten wir das Phosphorylierungsmuster der Proteine in Zellen der Oli-neu-Reihe vor und nach Behandlung mit ManNAc oder ManNProp. Insgesamt fiel ein genereller Rückgang der Phosphorylierung auf, wobei diese Beobachtung nach Applikation des natürlichen Vorläufers ManNAc etwas stärker ausgeprägt war, als nach der Gabe von ManNProp (Abb. 3.26).

A



B**C****Abbildung 3.26 2D-Gelelektrophorese nach Isolierung der phosphorylierten Proteine aus Oli-neu-Zellen**

Oligodendrozyten wurden 72h mit PBS (A), 5mM ManNAc (B) oder 5mM ManNProp (C) inkubiert. Es folgte die Ablösung der adhärenenten Zellen, die Isolierung der phosphorylierten Proteine mittels PhosphoProtein Purification Kit (Qiagen) und schließlich die Auftrennung. des Solibilisates mittels 2D-Gelelektrophorese (pH 4-7, links = basische Proteine, rechts = saure Proteine). Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängige Versuche.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Erkenntnisse von Sialinsäuren *in vivo* gewonnen. Zu Beginn wurde erstmals die Verteilung natürlicher Sialinsäuren in den Organen der Maus analysiert. In Anbetracht der Tatsache, dass Sialinsäuren eine entscheidende Rolle bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen spielen und Mäuse das Standardlabortier darstellen ist die nun ermittelte detaillierte Aufschlüsselung ein großer Informationsgewinn. Insgesamt fanden zwei Gruppen von Organen, diejenigen mit hoher (Milz, Blutzellen, Gl. submandibularis, ZNS, Lunge) und die mit niedriger (Leber, Herz, Niere, Muskulatur) Sialinsäureexpression. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit einer früheren Studie von Schauer et al. (1991), der über eine hohe Konzentration von Sialinsäure im Gehirn und eine niedrige Konzentration von Sialinsäuren in der Muskulatur vom Rind berichtete. Zudem gehören die Zellen der Organgruppe mit hohem Sialinsäuregehalt (u.a. Gehirnzellen, Immunzellen) auch zu denjenigen, die bekanntermaßen sehr stark in Zell-Zell- Interaktionsprozesse involviert sind. Im nächsten Schritt konnten wir demonstrieren, dass synthetisch hergestellte Sialinsäure-Vorläufer (z.B. ManNProp) wie der natürliche Zucker (ManNAc) von lebenden Organismen metabolisiert und als modifizierte Sialinsäure in die Zellmembranen verschiedener Organe eingebaut werden. Sie stellen damit ein neues chemisches Werkzeug zur Beeinflussung lebender Systeme dar (Keppler et al. 1995; Schmidt et al. 1998; Schmidt et al. 2000; Horstkorte et al. 2001; Horstkorte et al. 2004; Prescher and Bertozzi 2005). Bekräftigt wird diese Aussage durch die Tatsache, dass wir in der Lage waren, nach einer 45-tägigen Behandlung mit Ac₄ManNProp, bis zu 68% der natürlichen Sialinsäuren durch N-Propanoyl-Neuraminsäure in lebenden Tieren zu ersetzen. Hierdurch ist es möglich in relativ kurzer Zeit spezielle Zelladhäsionsprozesse, Rezeptorinteraktionen oder auch Enzymsysteme an erwünschte Wirkungskonzentrationen zu adaptieren. Neben den pharmakokinetischen Aspekten wurden allerdings auch Beobachtungen gemacht, die eine zukünftige medizinische Anwendung auf den Gebieten der Endokrinologie, Onkologie und Neurologie in Aussicht stellen. So konnten wir die Testosteronkonzentration im Serum, die Polysialylierung von NCAM und sogar die Expression Myelin-assoziiertes Proteins gezielt beeinflussen.

4.1 Pharmakokinetisches Verhalten von ManNProp

1981 wurde von Grünholz et al. zum ersten Mal berichtet, dass ¹⁴C-ManNProp und ¹⁴C-GlcNProp in Leberzellhomogenate eingeführt und dort in entsprechende Sialinsäuren umgesetzt werden können. Vor fünfzehn Jahren konnten Kayser et al. (1992) diese Befunde mit

spezifischeren Methoden (GC/MS) bekräftigen. Sie wiesen radioaktiv markierte neue Sialinsäuren in Zellmembranen nach. In dieser Arbeit konnten wir erstmals demonstrieren, dass es unter der Behandlung mit Ac₄ManProp zu einer Steigerung der Gesamtsialylierung und zu einem signifikanten Austausch der natürlichen Sialinsäuren *in vivo* kommt. Da die meisten Säugetiere, einschließlich Mäuse, im Gegensatz zum Menschen zusätzlich N-Glycolyl-Neuraminsäure exprimieren (Malykh et al. 2001), stellte sich weiterhin die Frage, welche dieser beiden Hauptsialinsäuren ausgetauscht werden kann. Auch diesbezüglich konnten wir erstmals zeigen, dass beide (also sowohl N-Acetyl- als auch N-Glycolyl-Neuraminsäure) in gleichem Maße durch N-Propanoyl-Neuraminsäure ersetzt werden. Ebenfalls zum ersten Mal zeigten wir eine organabhängige Veränderung der exprimierten Gesamtsialinsäure sowohl nach Gabe des natürlichen Vorläufers ManNAc als auch nach Behandlung mit Ac₄ManNProp. In der Skelettmuskulatur, dem Herzen, der Lunge und der Milz beobachteten wir diesbezüglich ein komplexes Veränderungsmuster. So kam es zwar bereits nach einem Tag zu einer starken Zunahme des Sialinsäuregehaltes. Dieser nahm allerdings bis zum 4. Behandlungstag wieder ab, um dann nach 13 Tagen erneut einen Höhepunkt, meist sogar das Maximum zu erreichen. Eine belegbare Erklärung für dieses zyklische Verhalten gibt es leider nicht. Einen möglichen Erklärungsansatz könnte allerdings die Aktivität von Sialidasen bieten. Demnach würde der erste Höhepunkt, welcher durch eine Verstoffwechslung der großen Menge an Vorläufern entsteht, durch die Aktivierung oder auch die Synthesesteigerung zell-spezifischer Sialidasen wieder abgebaut und nach Sättigung der Enzyme erneut genährt werden. Diese Theorie wird auch durch frühere Studien unterstützt, wie z.B. die Untersuchung des Einflusses von ManNAc auf die Sialidasen im Gehirn der Ratte. Hierbei konnte ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen ManNAc-Konzentration und Sialidaseaktivität demonstriert werden (Ghosh et al. 1998). Nicht zuletzt bleibt auch nicht auszuschließen, dass die Aktivität oder Expression von Sialyltransferasen durch die Gabe von ManNAc oder ManNProp beeinflusst wird. Einen bemerkenswerten Befund stellte auch die Tatsache dar, dass die Zunahme der Gesamtsialinsäure im ZNS nicht mit dem Einbau von N-Propanoyl-Neuraminsäure korrelierte (Vergleiche hierzu Abb. 3.6 mit Abb. 3.10), eine Beobachtung, die man auf den ersten Blick mit den Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke erklären könnte. So wäre es gut möglich, dass sie gegen die peracetylierten Vorläufer resistent ist. Dube et al. (2006) argumentierten in einer erst kürzlich veröffentlichten Studie ähnlich. Sie verwendeten peracetyliertes GalNAz und konnten ebenfalls keine integrierten Zucker in den Gehirnmembranen detektieren. Interessant bleibt jedoch die im Kontrast zu den eben beschriebenen Integrationsdefiziten stehende deutliche Zunahme der Gesamtsialylierung in den Membranfraktionen der untersuchten ZNS-Strukturen. Hierfür gibt es

mehrere mögliche Erklärungen. So könnten die verwendeten Vorläufer, wie Ac₄ManNProp, oder auch die N-Propanoyl-Neuraminsäure selbst zu einer Stimulation von Aktivität oder Synthese spezifischer Sialyltransferasen führen. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, dass der Turnover von speziellen Glycoproteinen mit integrierter N-Propanoyl-Neuraminsäure im Gehirn verlängert wird. Eine derartige Wirkung wurde bereits für das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 (Horstkorte et al. 2001) demonstriert. Letztendlich könnten Ac₄ManNProp oder ManNProp die Sialylierung im Gehirn aber auch durch einen noch unbekanntem Mechanismus stimulieren, ohne überhaupt als N-Propanoyl-Neuraminsäure in die Zellmembran integriert zu werden. Jedenfalls scheint die Blut-Hirn-Schranke, allein in Anbetracht der signifikanten Veränderung des Gesamtsialinsäuregehaltes, nicht die Ursache des niedrigen Einbaus von N-Propanoyl-Neuraminsäure zu sein. Die genaue Syntheserate von ManNAc im Gehirn ist bis heute nicht bekannt. Es könnte demnach auch sein, dass die Gabe von Ac₄ManNProp die Synthese von ManNAc stimuliert und damit eine Zunahme von membrangebundenen Sialinsäuren bewirkt. Die über diesen Weg erhöhten endogenen Sialinsäurekonzentrationen würden kompetitiv gegen viel weniger vorhandene N-Propanoyl-Neuraminsäuren antreten und hätten damit eine bessere Chance den Wettbewerb um die Integration in Glycoproteine zu gewinnen.

4.2 Beobachtungen an heterozygoten GNE-Mangel-Mäusen

Aus einer früheren Studie (Schwarzkopf et al. 2002) wussten wir bereits, dass auch nach Ausschaltung eines Allels der GNE die verbleibende GNE-Aktivität ausreicht, um die für die Lebensfähigkeit notwendigen Sialinsäurekonzentrationen bereitzustellen. In weiteren, bislang nicht veröffentlichten Beobachtungen zeigten diese Tiere weder eine verkürzte Lebenszeit noch histologische Unterschiede im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Mit dieser Arbeit können wir detaillierte Informationen bezüglich der organspezifischen Sialylierung aufzeigen. Auch bei den heterozygoten GNE-Mangel-Mäusen fanden wir zwei Gruppen von Organen. Gehirn, Rückenmark, Lunge, Milz, Blutzellen sowie Gl. submandibularis bildeten die erste (hohe Sial-Konzentration), Leber, Niere und Bauchmuskulatur die zweite (niedrige Sial-Konzentrationen) Gruppe. Zu unserer Überraschung bewegten sich die gemessenen membrangebundenen Sialinsäuren allerdings auf einem durchschnittlich etwa 25% niedrigeren Niveau als bei den Wildtyp-Tieren. Das Spektrum reichte wiederum je nach Organ von 40% Reduktion (Leber, Blutzellen, Gl. submandibularis) bis hin zu keiner Veränderung (Niere). Vor allem der Nierenbefund brachte dabei wieder neue Fragen auf. Eine eindeutige Erklärung für die fehlende Reduktion gibt es nicht, wenngleich man zunächst von einer fundamentalen Rolle von Sialoglycoproteinen in der Niere ausgehen mag. Da in der bisherigen Literatur keine detaillierten

Informationen über die organspezifische Sialinsäure-Biosynthese zu finden sind, bleiben letztendlich nur Spekulationen. So kann z.B. speziell in der Niere ein Wiederverwertungsweg existieren, der bei Sialinsäuremangel ein Absinken unter das lebensnotwendige Niveau verhindert. Man könnte also zu dem Schluss kommen, dass der in der Niere gemessene Sialinsäuregehalt dem "Existenzminimum" entspricht. GNE-Mangel-Mäuse könnten demnach ein Tiermodell für die minimal notwendige Konzentration membrangebundener Sialinsäuren darstellen. Die mikro- und makroskopische Organarchitektur blieb in den GNE-Mangel-Tieren gleich. Inwiefern allerdings Auswirkungen auf spezielle endokrine Stoffwechselfvorgänge oder aber auch die Gehirnleistung (insbesondere Lern- und Gedächtnisleistungen) bestehen, muss in zukünftigen Projekten herausgearbeitet werden.

4.3 Polysialylierung von NCAM

Polysialinsäuren bzw. α 2-8-gekoppelte Polysialinsäuresequenzen an den äußeren Ketten N-gekoppelter Oligosaccharide sind ein einzigartiger und funktionell sehr wichtiger Bestandteil des neuronalen Zellhaftungsmoleküls (NCAM) (Finne et al. 1983; Santoni et al. 1988). Ihre Expression beginnt am 8. Tag der Embryonalentwicklung, erreicht das Maximum in der Perinatalphase und beschränkt sich schließlich im (gesunden) erwachsenen Nervensystem auf plastische Regionen (Seki and Arai 1993). Eine Überexpression von Polysialinsäuren findet man allerdings auch bei aggressiven Tumorarten, z.B. beim alveolaren Rhabdomyosarkom, dem undifferenzierten Neuroblastom (Hildebrandt et al. 1998), dem anaplastischen Wilms-Tumor (Roth et al. 1988), dem peripheren T-Zelllymphom (Kern et al. 1992), dem Pankreas-Carcinom (Tezel et al. 2001) und allen neuroendokrinen Lungentumoren (Lantuejoul et al. 1998). Bedenkt man, dass die Modifikation von NCAM mit PSA zu einer funktionellen Umkehr der Adhäsion führt (Sadoul et al. 1983), ist das PSA sehr wahrscheinlich am Metastasierungsprozess dieser Tumoren beteiligt. Zusammenfassend ergibt sich hierdurch ein großes Bedürfnis, den Prozess der vermehrten Expression von Polysialinsäuren und damit den weiteren Adhäsionsverlust zu hemmen. Vor einigen Jahren verwendete die Arbeitsgruppe Jennings in einem *in vitro*-Projekt ManNProp zum Generieren von Polysialinsäure, die N-Propanoyl-Neuraminsäure enthielt (Liu et al. 2000). Später konnte neben C. Bertozzi auch unsere Arbeitsgruppe demonstrieren, dass ManNProp und ManNBut die Polysialylierung *in vitro* durch Hemmung der Polysialyltransferase II negativ beeinflussen (Mahal et al. 2001; Horstkorte et al. 2004). In dieser Arbeit konnten wir erstmals zeigen, dass diese Hemmung nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* stattfindet. Ein sehr erstaunliches Ergebnis unserer Studie stellte auch die ernorme Verminderung der Polysialinsäureexpression im Gehirn nach der Applikation von Ac₄ManNProp dar. Bedenkt man

den bereits zuvor angesprochenen geringen Austausch natürlicher Sialinsäuren gegen N-Propanoyl-Neuraminsäure (nur ca. 1% im Gehirn bei vergleichsweise 68% im Herzen) und die im Kontrast dazu stehende Steigerung der Gesamtsialinsäuren, ist dies eine weitere Bestätigung für das komplexe Verhalten von Sialylierungsvorgängen, v.a. im Gehirn. Festzuhalten bleibt aber auch, dass es sich bei dem verwendeten monoklonalen Antikörper 735 um ein sehr sensibles Messinstrument handelt und Polysialinsäuren, im Vergleich zu den restlichen Sialinsäurestrukturen, eine Minderheit darstellen. Aus diesem Grund widersprechen sich die beschriebenen Ergebnisse nicht. Eine interessante Feststellung war auch, dass zumindest kleine Teile des verabreichten Ac₄ManNProp das Gehirn erreichten und in Polysialinsäuren eingebaut wurden. Hierdurch ist man in der Lage, Ac₄ManNProp in zukünftigen Projekten als Tool zu nutzen, um einerseits die Polysialylierung im Gehirn besser untersuchen oder sogar für Diagnostik sowie Therapie relevante Targets in PSA-haltige Strukturen einbringen zu können. Der Fakt, dass es sich hierbei um nur sehr kleine Mengen handelt, suggeriert zudem, dass bereits sehr kleine Mengen Ac₄ManNProp oder N-Propanoyl-Neuraminsäure im Gehirn ausreichen, um die ST8SiaII zu hemmen. Dass überhaupt Analoga in Polysialinsäuren eingebaut wurden, ist sehr wahrscheinlich auf die Aktivität der ST8SiaIV zurückzuführen. Diesbezüglich ist zu erwähnen, dass zwei Polysialyltransferasen (ST8SiaII und ST8SiaIV) in der Lage sind, NCAM zu polysialylieren. ManNProp hingegen hemmt lediglich die ST8SiaII (Horstkorte et al. 2004), jenes Enzym, welches nach einer Neuordnung des PAX-3-Gens in bestimmten Tumorzellen zu den bereits beschriebenen erhöhten Polysialinsäurewerten führt (Schulte et al. 1997). Nicht vergessen werden darf allerdings die Möglichkeit, dass das positive Signal des verwendeten Antikörpers 13D9 auch auf einer nicht-Polysialinsäurespezifische Bindung beruhte, wie es in einem ähnlichen Zusammenhang bereits in einer früheren Studie berichtet wurde (Liu et al. 2000).

4.4 Anstieg von Serum-Testosteronkonzentration und Spermatogenese

Aufgrund der zunehmenden Aggressivität der Tiere wurde die Testosteronkonzentration im Serum gemessen. Hierbei zeigte sich eine beeindruckende Erhöhung um das Zehnfache gegenüber den Kontrolltieren. Auch im Vergleich mit zuvor publizierten Studien fanden sich lediglich Höchstwerte von 0.5-9 nmol/l (Jones et al. 2003). Aufgrund der sehr hohen Komplexität der Testosteron-Biosynthese ist eine einfache Erklärung vorerst schwierig. Die Regulation der Testosteronbiosynthese und -sekretion wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse reguliert. Im Hypothalamus wird das luteinisierende Hormon Releasing (LHR) -Hormon sezerniert, das die Hypophyse zur Sekretion des LH (oder Gonadoliberin) und des

Follikel-stimulierenden Hormons (FSH) anregt. FSH und LH stimulieren zusammen mit Testosteron die Aktivität der Sertoli-Zellen (Eblen et al. 2001). LH regt die Leydig-Zellen zur Androgensynthese an, wobei seine Sekretion zusätzlich durch die negative Rückkoppelung des Endproduktes kontrolliert wird. Das in den Sertoli-Zellen gebildete Glycoproteinormon der TGF- β -Familie Inhibin B hemmt hingegen die FSH-Sekretion (de Jong and Robertson 1985). Neuerdings wurden zusätzlich Glutamyltripeptidamide der Struktur Glu-X-Pro (X=Gln, Glu, Phe) beschrieben. Sie wurden als Gonadine bezeichnet und hemmen die LH-Freisetzung in einer ähnlichen Weise wie FSH oder Inhibin B (Ruiz-Alcaraz and Del Rio-Garcia 2005). Zudem wurde ebenfalls erst kürzlich ein weiteres inhibitorisches Polypeptid in reifen Leydig-Zellen gefunden, das Ghrelin. Der Ghrelin-Rezeptor wurde in Sertoli- und Leydig-Zellen nachgewiesen (Tena-Sempere 2005), wobei der Gesamtmechanismus im Zusammenspiel mit Leptin für die Regulation der Energiebalance in den Gonaden verantwortlich zu sein scheint (Spicer 2001). Die eigentliche Steroidfreisetzung wird durch Hyperpolarisierung der Sertoli-Zellen stimuliert, die durch einen Calcium-abhängigen Chloridefflux, welcher wiederum unter der Kontrolle von cAMP steht, erzielt wird (Duchatelle and Joffre 1987; Panesar and Chan 2005). Leptin wirkt zusätzlich direkt auf die Leydig-Zellen, indem es die hCG-induzierte Testosteron-Sekretion hemmt (Spicer 2001). Des Weiteren steht die Testosteronbildung unter dem Einfluss der Schilddrüse, indem T₃ die Zahl der LH-Rezeptoren von Leydig-Zellen und die mRNA-Konzentration steroidogener Enzyme bzw. Steroidsynthese-Regulatorproteine, beispielsweise des Steroidogenic-Acute-Regulatory-Protein (StAR), induziert. T₃-Rezeptoren wurden in frühen Keimzellen, Sertoli-, Leydig- und peritubulären Zellen nachgewiesen (Maran 2003). Nach neueren Untersuchungen wurde der altersabhängige Abfall der Testosteronsbiosynthese auch mit der Aktivität der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Zusammenhang gebracht. Sie war in alten Mäusen auf das Drei- bis Vierfache angestiegen, und COX-2-Inhibitoren bewirkten einen Wiederanstieg der abgesunkenen Testosteron-Konzentration (Wang et al. 2005). Außerdem kann die altersabhängige Zunahme des Sexualhormon-bindenden Globulins (SHBG) die Entwicklung eines Testosteronmangels beschleunigen, da SHBG zum Abfall des ungebundenen und damit biologisch aktiven Testosterons führt (Hammes et al. 2005). Neben den erhöhten Testosteronwerten konnten wir auch in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Tannapfel eine beeindruckende Veränderung der Hodenhistologie behandelter Mäuse beobachten. So kam es nach einer 13-tägigen Behandlung zu einer deutlichen Verbreiterung der Keimzellepithelschicht und zu einer klaren Steigerung der Spermatogenese. Auch hier fehlt eine überzeugende Erklärung, da es sich bei der Regulation der Spermatogenese um einen ebenfalls überaus komplexen Vorgang handelt, der durch endokrine und testikulär parakrine/autokrine Faktoren

gesteuert wird. Gonadotropine regeln verschiedene parakrine Faktoren, allen voran die Interleukin-1-Familie und testikulären Hormone. Testikuläre Cytokine und Wachstumsfaktoren (IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ , LIF, Inhibin B, IGF I und II, Vascular-Endothelial-Growth-Factor und Relaxin-like-Growth-Factor) steuern neben der Keimzellentwicklung die Funktion der Sertoli- und Leydig-Zellen. Die Cytokine und Wachstumsfaktoren werden in Immunzellen und in den interstitiellen, Samen-bildenden tubulären Kompartimenten der verschiedenen testikulären Zellen gebildet und sezerniert (Haider 2004; Huleihel and Lunenfeld 2004). Einen ersten Erklärungsansatz erhofften wir uns mit der Analyse des β -Choriongonadotropin (β -CG). Dieses gehört neben dem Luteinisierungshormon (=LH), dem Interstitialzellen-stimulierende Hormon (=ICSH), dem Follikel-stimulierende Hormon (=FSH) und dem Thyreoidea-stimulierende Hormon (=TSH) zu der Familie von Glycoproteinhormonen, die sowohl vom Hypophysenvorderlappen als auch von der Placenta gebildet und sezerniert werden. β -CG ist ein Heterodimer, das aus zwei nicht-kovalent verknüpften Untereinheiten besteht, der unspezifischen α -Untereinheit, die dieser ganzen Hormongruppe gemein ist, und der Hormon-spezifischen β -Untereinheit. Nur LH/CG- α/β -Dimere sind biologisch aktiv. Das CG- β -Protein weist eine 83%ige Identität mit dem LH- β -Protein auf und besitzt zusätzlich 24 Aminosäuren mit vier O-Glycosylierungsstellen. Dieser Strukturunterschied ist vermutlich für die längere Halblebenszeit bzw. biologische Aktivität von β -CG gegenüber LH verantwortlich. Die Glycanstruktur von β -CG wurde von Kobata und Takeuchi (1999) ermittelt. Beide Hormone konkurrieren um denselben Rezeptor, der mit der Aktivierung der Proteinkinase A antwortet (Gharib et al. 1990; Eblen et al. 2001). β -CG stimuliert die Leydig-Zellen der Testes zur Synthese und Sekretion von Testosteron, das für die Spermatogenese essentiell ist. Eine hohe β -CG-Konzentration führt auch in weiblichen Mäusen zu einer Steigerung der Testosteronbildung in den Ovarien (Richards 2005). Da es zum Zeitpunkt unserer Versuche keinen käuflich erwerbbaaren Antikörper gegen den β -CG-Vertreter der Maus (mCgb) gab und die Übereinstimmung mit dem β -hCG (humanes Choriongonadotropin) nur 81,2% betrug, stellte uns die Fa. Pineda einen speziellen Antikörper gegen mCgb her. Dieser konnte nach 120 Tagen Immunisierung verwendet werden und zeigte einen interessanten Befund. Das mCgb von PBS-Tieren mit oberhalb des Verteilungsspektrums liegenden Werten (um 4 nmol/l) stellte sich genauso hoch dar wie bei ManNAc oder ManNProp-Tieren mit oberhalb des Spektrums liegenden Werten (um 50 nmol/l). Die ManNProp-Mäuse mit niedrigem Testosteron (1-5 nmol/l) wiesen hingegen ebenso wenig mCgb auf wie die Kontrollmäuse mit wenig Testosteron (0.5 - 1 nmol). Zusammengefasst könnte dies für die monatliche Schwankung der Testosteronsynthese sprechen. Eine Aufklärung, weshalb die Werte

bei behandelten Tieren 10fach höher liegen, liefert diese Analyse allerdings leider nicht. Es bleibt zu vermuten, dass entweder die Halblebenszeit anderer Glycoproteinomone oder des Transportmoleküls SHBG verlängert wird.

4.5 Verhaltens- und Hirnleistungsänderungen

Die ST8Sia-II ist entscheidend an der PSA-Synthese *in vivo* und damit auch an neurologischen Prozessen beteiligt. Hierzu gehört neben der Modulation axonaler Vernetzungen im Hippocampus auch die Beeinflussung des Erkundungsverhalten und der Angstkonditionierung. Angata et al. konnten anhand entsprechender k.o.-Mäuse demonstrieren, dass die beiden Polysialyltransferase ST8Sia-II und ST8Sia-IV verschiedene Beiträge zu neurologischen Funktionen liefern. In einigen Bereichen der Neurogenese wurde festgestellt, dass die PSA-Expression fast ausschließlich durch die Aktivität der ST8Sia-II gewährleistet wird. In Abwesenheit der ST8Sia-II kam es zu einer signifikanten Verlängerung der infrapyramidalen Moosfaserfaszikel des Hippokampus (Angata et al. 2004). Dass Veränderungen axonaler Verknüpfungen in der infrapyramidalen Moosfaserschicht des Hippokampus Einfluss auf emotionale Verhaltensweisen (z.B. Sorge, Angst) oder das Erkundungsverhalten haben, ist schon seit längerem bekannt (van Daal et al. 1991; Henze et al. 2000). Im „open field test“ zeigten Mäuse mit längeren intra- und infrapyramidalen Moosfaserfaszikeln eine schnellere Gewöhnung an die Umgebung und ein reduziertes Angstverhalten (Crusio 2001). Einen ähnlichen Befund konnten wir in unseren Watermaze-Versuchen demonstrieren. Mäuse, deren ST8Sia-II nach Ac₄ManNProp-Applikation gehemmt wurde, fanden schneller die Plattform, hatten allerdings Schwierigkeiten mit dem Umlernen des Weges nach Umsetzen der Plattform am Tag 4. Diese Beobachtung lässt sich leicht mit einer schnelleren Gewöhnung an eine vorgegebene Umgebung oder auch ein weniger ausgeprägtes "Panikschwimmen" aufgrund einer reduzierten Todesangst interpretieren. Auch in der „Shuttlebox“ schienen die Ac₄ManNProp-Tiere besser und schneller mit der neuen Umgebung zurechtzukommen.

4.6 Analyse Myelin-assoziiertes Proteins

Myelin ist eine spezialisierte Subdomäne der Plasmamembran bei myelinbildenden Zellen (Lemke 1992; Nave and Suter 1997). Seine wesentliche Funktion besteht in der Isolation von einzelnen Axonen. Aufgrund seiner Axon-Umhüllungsarchitektur mit integrierten Ranvier-Schnürringen ermöglicht es zudem die für ein optimal funktionierendes Nervensystem notwendige saltatorische Erregungsleitung. Ein nicht myelinisiertes Axon würde für die gleiche Weiterleitungsgeschwindigkeit den zehnfachen Durchmesser eines myelinisierten Axons

benötigen. Ein weiterer Vorteil der Myelinisierung ist die Herabsetzung des Gesamtionenflusses über den axonalen Membranen und damit die Stabilisierung des extrazellulären Ionenmilieus. Myelin wird von Oligodendrozyten im ZNS und von Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem (PNS) gebildet. Im Gegensatz zu Schwannzellen, die jeweils nur ein Axonsegment myelinisieren, kann ein Oligodendrozyt bis zu 50 Axonsegmente umhüllen. Obwohl Oligodendrozyten und Schwannzellen sowohl morphologisch als auch entwicklungsgeschichtlich unterschiedliche Zellen sind, ist die Struktur und Zusammensetzung des peripheren und zentralen Myelins sehr ähnlich. Der genaue Aufbau wurde durch Raine et al. (1984) sehr gut beschrieben. Hiernach besteht Myelin durch Kompaktierung aus mehreren Subdomänen, welche wiederum mit unterschiedlichen Proteinen angereichert sind (Arroyo and Scherer 2000). Die biochemische Zusammensetzung der Myelinmembran unterscheidet sich von anderen biologischen Membranen (Norton and Cammer 1984; Morell et al. 1994). Allein der Lipidanteil im Myelin ist mit 70 - 80 % im Vergleich zu 35 - 40 % (jeweils Trockengewicht) bei anderen Plasmamembranen besonders hoch. Außerdem unterscheidet sich die Lipidzusammensetzung. In Myelin findet man neben einem hohen Cholesterinanteil vor allem Sphingolipide wie Galactocerebroside und Galactosulfocerebroside. Im Gegensatz dazu sind die meisten anderen Membranen mit Glycerophospholipiden, wie z. B. Phosphatidylcholin angereichert (Pfeiffer et al. 1993; Stoffel and Bosio 1997). Eine weitere Besonderheit der Myelinlipide sind die an die Cerebroside gebundenen Acylketten, die lang (häufig 23 Kohlenstoffatome) und meist gesättigt sind (Agranoff and Hajra 1994). Aufgrund des hohen Lipidanteils ist der Proteinanteil im Myelin relativ gering. Das reife Myelin besitzt im Gegensatz zur oligodendroglialen Plasmamembran nur ein beschränktes Repertoire an charakteristischen Proteinen (Braun 1984; Morell et al. 1994; Campagnoni 1995). 85 % aller Myelinproteine im ZNS bilden die im kompakten Myelin lokalisierten Proteine (Brunner et al. 1989; Griffiths et al. 1998) Myelin Basic Protein (MBP, ca. 35 % aller Myelinproteine) und Proteolipid Protein/DM 20 (PLP, ca. 50 % aller Myelinproteine). 2`3`-cyclic nucleotide 3`phosphohydrolase (CNP) stellt ca. 4 % der Myelinproteine und ist ein basisches Protein. Es kommt in zwei Isoformen (46 und 50 kDa) vor und ist hauptsächlich auf der zytoplasmatischen Seite in nicht kompaktierten Bereichen des Myelins lokalisiert (Braun et al. 1988; Trapp et al. 1988). Myelin-assoziiertes Glycoprotein (MAG) (Salzer et al. 1987), Myelin-Oligodendrozyten-Glycoprotein (MOG) (Lington et al. 1984), Oligodendrozyten-Myelin-Glycoprotein (OMgp) (Mikol and Stefansson 1988) und die 120 kDa Isoform von NCAM (Bhat and Silberberg 1986; Trotter et al. 1989) sind Mitglieder der Ig-Superfamilie und kommen in relativ kleinen Mengen (ca. 1-5 % des Myelinproteins) im Myelin vor. Bemerkenswert war die Beobachtung unterschiedlicher MOG-

und MBP-Signale nach Behandlung mit Ac₄ManNProp. MOG gilt bereits seit längerem als Marker für reife Oligodendrozyten (Scolding et al. 1989; Solly et al. 1996). Die Funktion des Proteins ist noch völlig unklar. Da es von seiner Struktur zu der Ig-Superfamilie gehört, nimmt man an, dass es vor allem als Adhaesionsprotein fungiert (Gardinier et al. 1992). Gut etabliert ist allerdings bereits die Rolle von MOG als Auto-Antigen bei demyelinisierenden Erkrankungen (Johns and Bernard 1999). Erfreulicherweise konnten wir bereits nach einer zweiwöchigen Behandlungsdauer ein deutlich vermindertes Signal des MOG in ZNS-Präparaten verzeichnen. Die genaue Ursache ist noch unklar. Wir können lediglich zwei Hypothesen aufstellen. Zum einen ist es möglich, dass frühere - also nicht reife und damit zur Myelinisierung fähige - Oligodendrozyten bereits ausdifferenzierte Oligodendrozyten verdrängen oder durch z.B. veränderte intrazelluläre Prozesse (siehe Abschnitt 4.6) in einen früheren Differenzierungsgrad überführt werden. Zum anderen könnte aber auch die Einfuhr von Sia-Analoga eine zunehmende Maskierung gegenüber des im Western-Blot verwendeten Antikörpers bewirkt haben. Auch diese Möglichkeit wäre in Anbetracht der strukturellen Verwandtschaft des Antikörper-Paratops mit dem T-Zell-Rezeptor eventuell Autoimmunkrankheiten vermittelnder Immunzellen ein zukunftsträchtiges Phänomen. Den zweiten Unterschied vor und nach Ac₄ManNProp-Behandlung konnten wir bezüglich des MBP demonstrieren. Hierbei handelt es sich um ein zytoplasmatisches, membranassoziertes Protein, das in mindestens fünf Spleißvarianten vorkommt. Das Molekulargewicht liegt zwischen 14 und 21 kDa. Es wird vermutet, dass es an der Kompaktierung der Major-dense-line (entspricht den Zellinnenseiten der gegenüberliegenden Membranschichten mit Zytoplasma) beteiligt ist. In unserer Arbeit konnten wir einen signifikanten Anstieg des Signals nach zweiwöchiger Behandlung verzeichnen. In Zusammenschau mit bereits klinischen Phase-I-Studien, in denen BHT-3009, ein Transkriptionsfaktor, der die MBP-Produktion anregt, verabreicht wird, um die Immunantwort bei einer Multiplen Sklerose zu reduzieren (Bayhill Therapeutics), ist auch dieser Befund ein Ansatzpunkt für zukünftige MS-relevante Untersuchungen. Allem voran sollte dabei der Frage nachgegangen werden, ob es tatsächlich zu einer vermehrten Expression des MBP oder aber zu einer verbesserten Erkennung durch den Antikörper kommt. Der Vollständigkeit halber bleibt schließlich noch die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, dass die beobachteten Veränderungen auch auf einer bereits angesprochenen längeren Halblebenszeit von in Steuerungsprozessen involvierten Glycoproteinen beruhen. Besondere Bedeutung haben aber auch der „ciliary neurotrophic factor“ (CNTF), Neurotrophin-3 (NT-3) und „Insulin like growth factor 1“ (IGF-1) (Price 1994), welche die Apoptose von jungen Oligodendrozyten verhindern. Auch der im Mechanismus noch nicht detailliert beschriebene, sondern lediglich in klinischen Studien

beobachtete stabilere Krankheitsverlauf einer Multiplen Sklerose bei erhöhten Testosteronwerten (Sicotte et al. 2007) kann, aufgrund der in unseren Untersuchungen ebenfalls festgestellten Testosteronerhöhungen, für die beobachteten Befunde mitverantwortlich sein. Unterstützt wird diese Theorie durch Experimente von Dalal et. al. Sie zeigten, dass T-Lymphozyten weiblicher Mäuse, denen Dihydrotestosteron-Pellets eingepflanzt wurden, signifikant höhere Konzentrationen des antiinflammatorischen Cytokins IL-10 freisetzen und hierdurch die Ausbildung einer EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) erschwert wurde (Dalal et al. 1997). Wie dem auch sei. Dass Sia-Analoga die Potenz haben Myelinisierungsprozesse zu beeinflussen, zeigten bereits Collins et al. (2000). Sie verwendeten N-Glycolylmannosamin als Vorläufer und demonstrierten die Umwandlung von N-Acetyl-Neuraminsäure zu N-Glycolyl-Neuraminsäure *in vitro*. Hierdurch ergab sich eine Hemmung der Bindung von MAG (Myelin-associated Glycoprotein) an neuronale Zellen.

4.7 Phosphorylierungszustand von Proteinen in Oli-neu-Zellen

Inwiefern die zuvor beschriebenen Befunde mit einer eventuellen Änderung des Phosphorylierungszustandes cytosolischer Proteine und Kernproteine nach Modifikation mit O-GlcNAc oder sogar O-GlcProp in Verbindung stehen, bleibt zunächst nur zu vermuten. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass die O-GlcNAc-Modifikation eine Art "Anti-Phosphorylierung" darstellt, da die gleichen Bindungsstellen an den entsprechend "ein- oder auszuschaltenden" Enzymen verwendet werden. Immerhin sind bislang weit über 100 Proteine in Zellkern und Zytoplasma bekannt, die auf diese Weise beeinflusst werden können (Hart et al. 1989; Wells et al. 2003). Und tatsächlich, in unseren *in vitro*-Versuchen an Oli-neu-Zellen zeigte sich nach ManNAc- oder ManNProp-Behandlung ein deutlicher Rückgang der phosphorylierten Proteine. Eine nähere Identifizierung der einzelnen Proteine war leider aufgrund zu kleiner Proteinmengen noch nicht möglich und bleibt künftigen Untersuchungen vorbehalten.

5 Zusammenfassung

Sialinsäuren spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Regeneration und Pathogenese verschiedener Krankheitsbilder. Die Modifikation zellulärer Sialinsäuren mittels Vorläuferanaloge wird Biochemical-Engineering genannt. Sie ermöglicht die funktionelle Untersuchung der N-Acyl-Seitenkette im Hinblick auf das Expressions-, Adhäsions-, Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Zelle. In dieser Arbeit wurden erstmals, neben der Verteilung natürlicher Sialinsäuren, die substanz- und zeitabhängigen Veränderungen nach Applikation natürlicher oder biochemisch modifizierter Sia-Vorläufer *in vivo* analysiert. Hierbei ergaben sich deutliche Hinweise darauf, in welchen Organen ein besonders hoher Sia-Stoffwechsel stattfindet und welche biologischen Abläufe auch *in vivo* gezielt beeinflusst werden können. In Anbetracht der Tatsache, dass Sialinsäuren eine entscheidende Rolle bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen spielen, ist dies ein großer Informationsgewinn für zukünftige Projekte. Zudem stellen Befunde wie z.B. der bis zu 68% reichende Austausch natürlicher Sialinsäuren nach nur 45 Tagen oder die im Rahmen unserer Nebenwirkungssuche durchgeführten und als unauffällig bewerteten (immun-) histochemischen Untersuchungen eine Weiterentwicklung zu potentiell pharmakologischen Anwendungen in Aussicht. Neben umfangreichen pharmakokinetischen Daten, die auch heterozygote GNE-Mangel-Mäuse berücksichtigen, wurden Ansätze für mögliche klinische Anwendungen dargelegt. So konnten wir z.B. demonstrieren, dass die Applikation von N-Propanoylmannosamin zu einer verminderten Polysialylierung des NCAM und folglich zu einer Reduzierung des metastatischen Potentials führt. Dies könnte die Grundlage für eine neue Therapieoption bei bösartigen Tumoren wie dem alveolaren Rhabdomyosarkom, dem undifferenzierten Neuroblastom, dem anaplastischen Wilms-Tumor, dem peripheren T-Zelllymphom, dem Pankreas-Carcinom sowie allen endokrinen Lungentumoren darstellen. Auch aus den Bereichen der Endokrinologie und Neurologie ergaben sich beeindruckende Beobachtungen. Nach nur wenigen Behandlungstagen konnten wir signifikant erhöhte Testosteronkonzentrationen bei gleichzeitig verbreiterter Keimzellepithelschicht und erhöhter Spermatogenese registrieren. Diese Befunde bieten neben der direkten Anwendungsmöglichkeit bei Patienten mit angeborenem oder erworbenem Testosteronmangel die Basis für eine komplett neue Beeinflussungsmöglichkeit von (patho-) physiologischen Prozessen, an denen Glykoproteine beteiligt sind. Über ähnliche Mechanismen könnten schon in naher Zukunft die Steuerung von Peptidhormon- oder Transportprotein-Halbwertszeiten sowie die gezielte Veränderung von Rezeptorsensitivitäten möglich sein.

In zahlreichen Verhaltenstest ergaben sich zudem interessante Hinweise auf ein schnelleres Auffassungsvermögen bei gleichzeitig verminderter Umlerngeschwindigkeit. Hierdurch wurden Ansätze zur Weiterentwicklung therapeutischer Möglichkeiten gegen Erkrankungen, die mit Störungen der synaptischen Plastizität einhergehen, bereitgestellt. Zuletzt analysierten wir Myelin-assoziierte Proteine (MOG, MBP) auf Veränderungen. In Zusammenschau mit der derzeitigen Pathogenese-Theorie ergaben sich hierbei ebenfalls hoffnungsvolle Befunde, die die Grundlage für ein neues, nebenwirkungsarmes Therapiekonzept der Multiplen Sklerose darstellen könnten. Die in diesem Zusammenhang erstmals deutlich gemachte verminderte Phosphorylierung zellulärer Proteine in Oligodendrozyten nach ManNAc- und ManNProp-Gabe bildet zudem die Basis für ein verbessertes Verständnis der Zellkerneinbindung in den Biosyntheseweg der Sialinsäuren. Zukünftige Projekte, die eine Identifizierung der beeinflussten Proteine liefern, werden es somit ermöglichen, den Einfluss der Sialinsäurevorläufer auf Signaltransduktions-prozesse besser verstehen und ggf. kontrolliert modulieren zu können.

6 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen:

Daniel Gagiannis, Reinhart Gossrau, Werner Reutter, Martin Zimmermann-Kordmann and Rüdiger Horstkorte

Engineering the sialic acid in organs of mice using N-propanoylmannosamine

BBA – Biochimica et Biophysica Acta 2006

Daniel Gagiannis*, André Orthmann*, Ilona Danßmann, Martina Schwarzkopf, Wenke Weidemann and Rüdiger Horstkorte

Reduced sialylation status in UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE)-deficient mice.

Glycoconjugate Journal 2007

Kaya Bork*, **Daniel Gagiannis***, André Orthmann*, Wenke Weidemann, Maria Kontou, Werner Reutter, Rüdiger Horstkorte

Experimental approaches to interfere with the polysialylation of the neural cell adhesion molecule *in vitro* and *in vivo*.

Journal of Neurochemistry 2007

Martin Zimmermann-Kordmann, Ines Repschläger, Rose-Maria Förster, **Daniel Röthgens**, Rüdiger Horstkorte, Jens Darnedde, Rudolf Tauber, Werner Reutter

Biochemical glycoengineering of sialic acids: Influences on N-glycans

Proceedings (poster or lecture-abstract) of the annual fall meeting, German Society for Biochemistry & Molecular Biology (GBM), Berlin/Potsdam, Germany, Sept. 18-21, 2005

Daniel Gagiannis

Biochemie in Frage und Antwort

Elsevier, 1. Auflage 2003, 2. Auflage 2006

* Die Beiträge dieser Autoren waren gleichwertig.

7 Danksagung

Bei Herrn **Prof. Dr. Werner Reutter** möchte ich mich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit, seine Ideen, die großzügige Unterstützung und die unzähligen, sehr fruchtenden Gespräche rund um das Thema Glycobiologie bedanken.

Im gleichen Maße danke ich **Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte** für die fachlich und menschlich sehr gute Betreuung, Förderung und Motivation während der gesamten Zeit.

Herrn **Prof. Dr. Reinhart Gossrau** danke ich ebenfalls für seine tiefgreifende Unterstützung. Er hat nicht nur durch unsere gemeinsamen Tierexperimente und enorm zeitaufwendigen histologischen sowie (immun-)histochemischen Untersuchungen, sondern auch durch zahlreiche freundschaftliche Gespräche großen Anteil an dieser Arbeit geleistet.

Bei Herrn **Dr. Martin Zimmermann-Kordmann** und **Ines Repschläger** bedanke ich mich für die umfangreichen HPLC-Messungen und wissenschaftlichen Gespräche.

Bei Herrn **Dr. Christoph Kannicht** bedanke ich mich für die Einführung in die Massenspektroskopie und 2D-Gelelektrophorese sowie seine Hilfe bei diffizilen Fragestellungen.

Bei **Prof. Dr. Rudolf Tauber** und **Dr. Frank Perschel** (Institut für klinische Chemie, Charité) bedanke ich mich für die zahlreichen Messungen der Testosteronkonzentrationen.

Bei **PD Dr. Dirk Montag** (Leibnitz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg) bedanke ich mich für die Durchführung der aufwendigen Verhaltenstests.

Bei Frau **Prof. Dr. Tannapfel** bedanke ich mich für die Untersuchungen der Mäuse-Hoden.

Für die gute Zusammenarbeit, fröhliche Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft danke ich Frau Kern, André, Kaya, Wenke, Bettina, Sabine, Ilona, Werner, Diana, Annette, Nadja, Markus, Darius, Kerstin, Lothar, Verena, Kaya, Tabea, Claudine und allen anderen der AG Reutter.

Diese Arbeit erhielt finanzielle Unterstützung von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Hertie-Stiftung, der Sonnenfeld-Stiftung und den Fonds der Chemischen Industrie.

8 Literaturverzeichnis

Acheson, A., J. L. Sunshine, et al. (1991). "NCAM polysialic acid can regulate both cell-cell and cell-substrate interactions." J Cell Biol **114**(1): 143-53.

Agranoff, B. W. and A. K. Hajra (1994). "Neural membranes: Lipids." Basic Neurochemistry, 5th edition (eds. G.J. Siegel et al.), Raven Press, New York, USA: 97-116.

Ahrens, P. B. and H. Ankel (1987). "The role of asparagine-linked carbohydrate in natural killer cell-mediated cytolysis." J Biol Chem **262**(16): 7575-9.

Allen, M. B. and D. G. Walker (1980). "Kinetic characterization of N-acetyl-D-glucosamine kinase from rat liver and kidney." Biochem J **185**(3): 577-82.

Alviano, C. S., L. R. Travassos, et al. (1999). "Sialic acids in fungi: a minireview." Glycoconj J **16**(9): 545-54.

Angata, K., J. M. Long, et al. (2004). "Sialyltransferase ST8Sia-II assembles a subset of polysialic acid that directs hippocampal axonal targeting and promotes fear behavior." J Biol Chem **279**(31): 32603-13.

Angata, K., M. Suzuki, et al. (1998). "Differential and cooperative polysialylation of the neural cell adhesion molecule by two polysialyltransferases, PST and STX." J Biol Chem **273**(43): 28524-32.

Angata, T. and A. Varki (2002). "Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective." Chem Rev **102**(2): 439-69.

Arroyo, E. J. and S. S. Scherer (2000). "On the molecular architecture of myelinated fibers." Histochem Cell Biol **113**(1): 1-18.

Ashwell, G. and J. Harford (1982). "Carbohydrate-specific receptors of the liver." Annu Rev Biochem **51**: 531-54.

Barry, G. T. (1959). "Detection of sialic acid in various Escherichia coli strains and in other species of bacteria." Nature **183**(4654): 117-8.

Beavis, R. C. and B. T. Chait (1996). "Matrix-assisted laser desorption ionization mass-spectrometry of proteins." Methods Enzymol **270**: 519-51.

Becker, C. G., A. Artola, et al. (1996). "The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation." J Neurosci Res **45**(2): 143-52.

Beecken, W. D., T. Engl, et al. (2005). "Valproic acid modulates NCAM polysialylation and polysialyltransferase mRNA expression in human tumor cells." Int Immunopharmacol **5**(4): 757-69.

Bhat, S. and D. H. Silberberg (1986). "Oligodendrocyte cell adhesion molecules are related to neural cell adhesion molecule (N-CAM)." J Neurosci **6**(11): 3348-54.

Bhavanandan, V. P. (1991). "Cancer-associated mucins and mucin-type glycoproteins." Glycobiology **1**(5): 493-503.

Blaheta, R. A. and J. Cinatl, Jr. (2002). "Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug." Med Res Rev **22**(5): 492-511.

Blaheta, R. A., M. Michaelis, et al. (2005). "Evolving anticancer drug valproic acid: insights into the mechanism and clinical studies." Med Res Rev **25**(4): 383-97.

Blaheta, R. A., H. Nau, et al. (2002). "Valproate and valproate-analogues: potent tools to fight against cancer." Curr Med Chem **9**(15): 1417-33.

Bork, K., W. Reutter, et al. (2005). "The intracellular concentration of sialic acid regulates the polysialylation of the neural cell adhesion molecule." FEBS Lett **579**(22): 5079-83.

Braun, P. E. (1984). "Molecular organization of myelin." Myelin, 2nd edition (ed P. Morell), Plenum Press, New York, USA: 97-116.

Braun, P. E., F. Sandillon, et al. (1988). "Immunocytochemical localization by electron microscopy of 2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in developing oligodendrocytes of normal and mutant brain." J Neurosci **8**(8): 3057-66.

- Bremer, E. G., J. Schlessinger, et al. (1986). "Ganglioside-mediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 on tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor." J Biol Chem **261**(5): 2434-40.
- Bresalier, R. S., R. W. Rockwell, et al. (1990). "Cell surface sialoprotein alterations in metastatic murine colon cancer cell lines selected in an animal model for colon cancer metastasis." Cancer Res **50**(4): 1299-307.
- Broschat, K. O., C. Gorka, et al. (2002). "Kinetic characterization of human glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase I: potent feedback inhibition by glucosamine 6-phosphate." J Biol Chem **277**(17): 14764-70.
- Brossmer, R., B. Bohn, et al. (1977). "Modification of tumour cells by covalent attachment of N-acetyl-D-neuraminic acid to the cell surface." Eur J Cancer **13**(10): 1151-3.
- Brunner, C., H. Lassmann, et al. (1989). "Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats." J Neurochem **52**(1): 296-304.
- Burg, M. A., W. Halfter, et al. (1995). "Analysis of proteoglycan expression in developing chicken brain: characterization of a heparan sulfate proteoglycan that interacts with the neural cell adhesion molecule." J Neurosci Res **41**(1): 49-64.
- Büttner, B., C. Kannicht, et al. (2002). "Biochemical engineering of cell surface sialic acids stimulates axonal growth." J Neurosci **22**(20): 8869-75.
- Campagnoni, A. T. (1995). "Molecular biology of myelination." Neuroglia (eds. H. Kettenmann und B. Ransom), Oxford University Press, New York, USA: 555-570.
- Cardini, C. E. and L. F. Leloir (1957). "Enzymatic formation of acetylgalactosamine." J Biol Chem **225**(1): 317-24.
- Carter, R. J., L. A. Lione, et al. (1999). "Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation." J Neurosci **19**(8): 3248-57.

Colli, W. (1993). "Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*." Faseb J **7**(13): 1257-64.

Collins, B. E., T. J. Fralich, et al. (2000). "Conversion of cellular sialic acid expression from N-acetyl- to N-glycolylneuraminic acid using a synthetic precursor, N-glycolylmannosamine pentaacetate: inhibition of myelin-associated glycoprotein binding to neural cells." Glycobiology **10**(1): 11-20.

Comb, D. G. and S. Roseman (1958). "Enzymic synthesis of N-acetyl-D-mannosamine." Biochim Biophys Acta **29**(3): 653-4.

Corfield, A. P. and R. Schauer (1982). "Occurrence of sialic acids " Springer, Wien, New York: 5-50.

Cremer, H., G. Chazal, et al. (1998). "Long-term but not short-term plasticity at mossy fiber synapses is impaired in neural cell adhesion molecule-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(22): 13242-7.

Cremer, H., R. Lange, et al. (1994). "Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning." Nature **367**(6462): 455-9.

Crocker, P. R. and A. Varki (2001). "Siglecs in the immune system." Immunology **103**(2): 137-45.

Crusio, W. E. (2001). "Genetic dissection of mouse exploratory behaviour." Behav Brain Res **125**(1-2): 127-32.

Cunningham, B. A., J. J. Hemperly, et al. (1987). "Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing." Science **236**(4803): 799-806.

Dalal, M., S. Kim, et al. (1997). "Testosterone therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces a T helper 2 bias in the autoantigen-specific T lymphocyte response." J Immunol **159**(1): 3-6.

Datta, A. (1971). "Studies on hog spleen N-acetylglucosamine kinase. II. Allosteric regulation of the activity of N-acetylglucosamine kinase." Arch Biochem Biophys **142**(2): 645-50.

David, L., J. M. Nesland, et al. (1993). "CDw75 antigen expression in human gastric carcinoma and adjacent mucosa." Cancer **72**(5): 1522-7.

de Jong, F. H. and D. M. Robertson (1985). "Inhibin: 1985 update on action and purification." Mol Cell Endocrinol **42**(2): 95-103.

De Luca, G., S. Rindi, et al. (1978). "Enzymatic formation of UDP-N-acetylgalactosamine in epiphyseal-plate cartilage." Connect Tissue Res **6**(2): 83-8.

Dennis, J. W. and S. Laferte (1985). "Recognition of asparagine-linked oligosaccharides on murine tumor cells by natural killer cells." Cancer Res **45**(12 Pt 1): 6034-40.

Dodd, J., S. B. Morton, et al. (1988). "Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons." Neuron **1**(2): 105-16.

Doyle, E., P. M. Nolan, et al. (1992). "Hippocampal NCAM180 transiently increases sialylation during the acquisition and consolidation of a passive avoidance response in the adult rat." J Neurosci Res **31**(3): 513-23.

Doyle, E., P. M. Nolan, et al. (1992). "Intraventricular infusions of anti-neural cell adhesion molecules in a discrete posttraining period impair consolidation of a passive avoidance response in the rat." J Neurochem **59**(4): 1570-3.

Dreyfuss, A. I., J. R. Clark, et al. (1992). "Lipid-associated sialic acid, squamous cell carcinoma antigen, carcinoembryonic antigen, and lactic dehydrogenase levels as tumor markers in squamous cell carcinoma of the head and neck." Cancer **70**(10): 2499-503.

Dube, D. H. and C. R. Bertozzi (2003). "Metabolic oligosaccharide engineering as a tool for glycobiology." Curr Opin Chem Biol **7**(5): 616-25.

Dube, D. H., J. A. Prescher, et al. (2006). "Probing mucin-type O-linked glycosylation in living animals." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(13): 4819-24.

- Duchatelle, P. and M. Joffre (1987). "Ca-dependent-chloride and potassium currents in rat Leydig cells." FEBS Lett **217**(1): 11-5.
- Eblen, A., S. Bao, et al. (2001). "The presence of functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human sperm." J Clin Endocrinol Metab **86**(6): 2643-8.
- Eckhardt, M., O. Bukalo, et al. (2000). "Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SiaIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity." J Neurosci **20**(14): 5234-44.
- Eckhardt, M., M. Muhlenhoff, et al. (1996). "Expression cloning of the Golgi CMP-sialic acid transporter." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 7572-6.
- Eckhardt, M., M. Muhlenhoff, et al. (1995). "Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1." Nature **373**(6516): 715-8.
- Effertz, K., S. Hinderlich, et al. (1999). "Selective loss of either the epimerase or kinase activity of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase due to site-directed mutagenesis based on sequence alignments." J Biol Chem **274**(40): 28771-8.
- Egrie, J. C. and J. K. Browne (2001). "Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP)." Nephrol Dial Transplant **16 Suppl 3**: 3-13.
- Emig, S., D. Schmalz, et al. (1995). "The nuclear pore complex protein p62 is one of several sialic acid-containing proteins of the nuclear envelope." J Biol Chem **270**(23): 13787-93.
- Fahr, C. and R. Schauer (2001). "Detection of sialic acids and gangliosides with special reference to 9-O-acetylated species in basalomas and normal human skin." J Invest Dermatol **116**(2): 254-60.
- Fazeli, M. S., K. Breen, et al. (1994). "Increase in extracellular NCAM and amyloid precursor protein following induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of anaesthetized rats." Neurosci Lett **169**(1-2): 77-80.

Finne, J. (1982). "Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain." J Biol Chem **257**(20): 11966-70.

Finne, J., U. Finne, et al. (1983). "Occurrence of alpha 2-8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule." Biochem Biophys Res Commun **112**(2): 482-7.

Fischer, F. and G. Egg (1990). "[N-acetylneuraminic acid (sialic acid) as a tumor marker in head and neck cancers]." Hno **38**(10): 361-3.

Fogel, M., P. Altevogt, et al. (1983). "Metastatic potential severely altered by changes in tumor cell adhesiveness and cell-surface sialylation." J Exp Med **157**(1): 371-6.

Foley, A. G., B. P. Hartz, et al. (2000). "A synthetic peptide ligand of neural cell adhesion molecule (NCAM) IgI domain prevents NCAM internalization and disrupts passive avoidance learning." J Neurochem **74**(6): 2607-13.

Friedlander, D. R., P. Milev, et al. (1994). "The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth." J Cell Biol **125**(3): 669-80.

Fujimoto, I., J. L. Bruses, et al. (2001). "Regulation of cell adhesion by polysialic acid. Effects on cadherin, immunoglobulin cell adhesion molecule, and integrin function and independence from neural cell adhesion molecule binding or signaling activity." J Biol Chem **276**(34): 31745-51.

Gal, B., M. J. Ruano, et al. (1997). "Developmental changes in UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase activity of rat and guinea-pig liver." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **118**(1): 13-5.

Gardinier, M. V., P. Amiguet, et al. (1992). "Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a unique member of the immunoglobulin superfamily." J Neurosci Res **33**(1): 177-87.

Ghaderi, D., H. M. Strauss, et al. (2007). "Evidence for Dynamic Interplay of Different Oligomeric States of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine Kinase by Biophysical Methods." J Mol Biol **369**(3): 746-58.

Gharib, S. D., M. E. Wierman, et al. (1990). "Molecular biology of the pituitary gonadotropins." Endocr Rev **11**(1): 177-99.

Ghosh, P., I. Ender, et al. (1998). "Long-term ethanol consumption selectively impairs ganglioside pathway in rat brain." Alcohol Clin Exp Res **22**(6): 1220-6.

Ghosh, S. and S. Roseman (1961). "Enzymatic phosphorylation of N-acetyl-D-mannosamine." Proc Natl Acad Sci U S A **47**: 955-8.

Gossrau, R. and T. Günther (1993). "Spurenelemente und Salicylateffekte. Histochemische und biochemische Untersuchungen." R. Karte, J. Fanghänel, R., Gossrau (Eds.), Teratologie: Grundlagen, Methoden und Klinik, de Gruyter Berlin, New York.

Griffiths, I., M. Klugmann, et al. (1998). "Current concepts of PLP and its role in the nervous system." Microsc Res Tech **41**(5): 344-58.

Gross, H. J. and R. Brossmer (1995). "Enzymatic transfer of sialic acids modified at C-5 employing four different sialyltransferases." Glycoconj J **12**(6): 739-46.

Grünholz, H. J., E. Harms, et al. (1981). "Inhibition of in vitro biosynthesis of N-acetylneuraminic acid by N-acyl- and N-alkyl-2-amino-2-deoxyhexoses." Carbohydr Res **96**(2): 259-70.

Haider, S. G. (2004). "Cell biology of Leydig cells in the testis." Int Rev Cytol **233**: 181-241.

Hakomori, S. (1989). "Biochemical basis and clinical application of tumor-associated carbohydrate antigens: current trends and future perspectives." Gan To Kagaku Ryoho **16**(3 Pt 2): 715-31.

Hakomori, S. (2000). "Traveling for the glycosphingolipid path." Glycoconj J **17**(7-9): 627-47.

Hammes, A., T. K. Andreassen, et al. (2005). "Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids." Cell **122**(5): 751-62.

Hanai, N., T. Dohi, et al. (1988). "A novel ganglioside, de-N-acetyl-GM3 (II3NeuNH₂LacCer), acting as a strong promoter for epidermal growth factor receptor kinase and as a stimulator for cell growth." J Biol Chem **263**(13): 6296-301.

Harduin-Lepers, A., M. A. Recchi, et al. (1995). "1994, the year of sialyltransferases." Glycobiology **5**(8): 741-58.

Harms, E., W. Kreisel, et al. (1973). "Biosynthesis of N-acetylneuraminic acid in Morris hepatomas." Eur J Biochem **32**(2): 254-62.

Hart, G. W., R. S. Haltiwanger, et al. (1989). "Nucleoplasmic and cytoplasmic glycoproteins." Ciba Found Symp **145**: 102-12, discussion 112-8.

Hartnell, A., J. Steel, et al. (2001). "Characterization of human sialoadhesin, a sialic acid binding receptor expressed by resident and inflammatory macrophage populations." Blood **97**(1): 288-96.

Haverkamp, J., J. M. Beau, et al. (1979). "Improved synthesis of CMP-sialates using enzymes from frog liver and equine submandibular gland." Hoppe Seylers Z Physiol Chem **360**(2): 159-66.

Henze, D. A., N. N. Urban, et al. (2000). "The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review." Neuroscience **98**(3): 407-27.

Herrler, G., R. Rott, et al. (1985). "The receptor-destroying enzyme of influenza C virus is neuraminidase-O-acetylase." Embo J **4**(6): 1503-6.

Herrmann, M., C. W. von der Lieth, et al. (1997). "Consequences of a subtle sialic acid modification on the murine polyomavirus receptor." J Virol **71**(8): 5922-31.

Higashi, H., Y. Hirabayashi, et al. (1985). "Characterization of N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides as tumor-associated Hanganutziu-Deicher antigen in human colon cancer." Cancer Res **45**(8): 3796-802.

Hildebrandt, H., C. Becker, et al. (1998). "Polysialic acid on the neural cell adhesion molecule correlates with expression of polysialyltransferases and promotes neuroblastoma cell growth." Cancer Res **58**(4): 779-84.

Hildebrandt, H., C. Becker, et al. (1998). "Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development." J Neurochem **71**(6): 2339-48.

Hinderlich, S., R. Stäsche, et al. (1997). "A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase." J Biol Chem **272**(39): 24313-8.

Hoffman, S., C. M. Chuong, et al. (1984). "Evolutionary conservation of key structures and binding functions of neural cell adhesion molecules." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(21): 6881-5.

Hoffman, S., B. C. Sorkin, et al. (1982). "Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membranes." J Biol Chem **257**(13): 7720-9.

Horstkorte, R., H. Y. Lee, et al. (2001). "Biochemical engineering of the side chain of sialic acids increases the biological stability of the highly sialylated cell adhesion molecule CEACAM1." Biochem Biophys Res Commun **283**(1): 31-5.

Horstkorte, R., M. Muhlenhoff, et al. (2004). "Selective inhibition of polysialyltransferase ST8SiaII by unnatural sialic acids." Exp Cell Res **298**(1): 268-74.

Horstkorte, R., S. Nohring, et al. (2000). "Protein kinase C phosphorylates and regulates UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase." FEBS Lett **470**(3): 315-8.

Horstkorte, R., S. Nohring, et al. (1999). "Tissue expression and amino acid sequence of murine UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase." Eur J Biochem **260**(3): 923-7.

Huleihel, M. and E. Lunenfeld (2004). "Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors." Asian J Androl **6**(3): 259-68.

- Ito, T., J. N. Couceiro, et al. (1998). "Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential." J Virol **72**(9): 7367-73.
- Johns, T. G. and C. C. A. Bernard (1999). "The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein." J. Neurochem. **72**: 1-9.
- Jones, M. B., H. Teng, et al. (2004). "Characterization of the cellular uptake and metabolic conversion of acetylated N-acetylmannosamine (ManNAc) analogues to sialic acids." Biotechnol Bioeng **85**(4): 394-405.
- Jones, R. D., P. J. Pugh, et al. (2003). "Altered circulating hormone levels, endothelial function and vascular reactivity in the testicular feminised mouse." Eur J Endocrinol **148**(1): 111-20.
- Jourdian, G. W., A. L. Swanson, et al. (1964). "Isolation of Sialic Acid 9-Phosphatase from Human Erythrocytes." J Biol Chem **239**: PC2714-6.
- Kageshita, T., S. Hirai, et al. (1995). "Association between sialyl Lewis(a) expression and tumor progression in melanoma." Cancer Res **55**(8): 1748-51.
- Kapron-Bras, C. M. and D. G. Trasler (1988). "Histological comparison of the effects of the splotch gene and retinoic acid on the closure of the mouse neural tube." Teratology **37**(4): 389-99.
- Kawai, T., A. Kato, et al. (1991). "Quantitative determination of N-glycolylneuraminic acid expression in human cancerous tissues and avian lymphoma cell lines as a tumor-associated sialic acid by gas chromatography-mass spectrometry." Cancer Res **51**(4): 1242-6.
- Kayser, H., R. Zeitler, et al. (1992). "Biosynthesis of a nonphysiological sialic acid in different rat organs, using N-propanoyl-D-hexosamines as precursors." J Biol Chem **267**(24): 16934-8.
- Kean, E. L. (1969). "Sialic acid activating enzyme in ocular tissue." Exp Eye Res **8**(1): 44-54.
- Kean, E. L. (1970). "Nuclear cytidine 5'-monophosphosialic acid synthetase." J Biol Chem **245**(9): 2301-8.

Kean, E. L. (1991). "Sialic acid activation." Glycobiology **1**(5): 441-7.

Kelm, S. and R. Schauer (1997). "Sialic acids in molecular and cellular interactions." Int Rev Cytol **175**: 137-240.

Keppler, O. T., M. Herrmann, et al. (1998). "Elongation of the N-acyl side chain of sialic acids in MDCK II cells inhibits influenza A virus infection." Biochem Biophys Res Commun **253**(2): 437-42.

Keppler, O. T., M. E. Peter, et al. (1999). "Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus." Glycobiology **9**(6): 557-69.

Keppler, O. T., P. Stehling, et al. (1995). "Biosynthetic modulation of sialic acid-dependent virus-receptor interactions of two primate polyoma viruses." J Biol Chem **270**(3): 1308-14.

Kern, W. F., C. M. Spier, et al. (1992). "Neural cell adhesion molecule-positive peripheral T-cell lymphoma: a rare variant with a propensity for unusual sites of involvement." Blood **79**(9): 2432-7.

Kikuchi, K., H. Kikuchi, et al. (1971). "Activities of sialic acid-synthesizing enzymes in rat liver and rat and mouse tumors." Biochim Biophys Acta **252**(2): 357-68.

Kikuchi, K. and S. Tsuiki (1973). "Purification and properties of UDP-N-acetylglucosamine 2'-epimerase from rat liver." Biochim Biophys Acta **327**(1): 193-206.

Kircheis, R., L. Kircheis, et al. (1996). "Selective lysis of early embryonic cells by the alternative pathway of complement--a possible mechanism for programmed cell death in embryogenesis." In Vivo **10**(4): 389-403.

Kiss, J. Z., E. Troncoso, et al. (2001). "The role of neural cell adhesion molecules in plasticity and repair." Brain Res Brain Res Rev **36**(2-3): 175-84.

Kitazume-Kawaguchi, S., S. Kabata, et al. (2001). "Differential biosynthesis of polysialic or disialic acid Structure by ST8Sia II and ST8Sia IV." J Biol Chem **276**(19): 15696-703.

- Kluge, A., G. Reuter, et al. (1992). "Interaction of rat peritoneal macrophages with homologous sialidase-treated thrombocytes in vitro: biochemical and morphological studies. Detection of N-(O-acetyl)glycolylneuraminic acid." Eur J Cell Biol **59**(1): 12-20.
- Kobata, A. and M. Takeuchi (1999). "Structure, pathology and function of the N-linked sugar chains of human chorionic gonadotropin." Biochim Biophys Acta **1455**(2-3): 315-26.
- Kolter, T. and K. Sandhoff (1997). "Sialic acids--why always alpha-linked?" Glycobiology **7**(7): vii-ix.
- Kornfeld, S., R. Kornfeld, et al. (1964). "The Feedback Control of Sugar Nucleotide Biosynthesis in Liver." Proc Natl Acad Sci U S A **52**: 371-9.
- Kundig, W., S. Ghosh, et al. (1966). "The sialic acids. VII. N-acyl-D-mannosamine kinase from rat liver." J Biol Chem **241**(23): 5619-26.
- Lantuejoul, S., D. Moro, et al. (1998). "Neural cell adhesion molecules (NCAM) and NCAM-PSA expression in neuroendocrine lung tumors." Am J Surg Pathol **22**(10): 1267-76.
- Lasky, L. A. (1995). "Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response." Annu Rev Biochem **64**: 113-39.
- Lee, J. H., T. J. Baker, et al. (1999). "Engineering novel cell surface receptors for virus-mediated gene transfer." J Biol Chem **274**(31): 21878-84.
- Lemieux, G. A. and C. R. Bertozzi (2001). "Modulating cell surface immunoreactivity by metabolic induction of unnatural carbohydrate antigens." Chem Biol **8**(3): 265-75.
- Lemke, G. (1992). "Myelin and Myelination." Molecular Neurobiology (ed. Zach W. Hall). Sinauer Associates, Inc. Sunderland MA, USA: 281-309.
- Linnington, C., M. Webb, et al. (1984). "A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody." J. Neuroimmunol. **6**: 387-396.

- Liu, T., Z. Guo, et al. (2000). "Biochemical engineering of surface alpha 2-8 polysialic acid for immunotargeting tumor cells." J Biol Chem **275**(42): 32832-6.
- Lojda, Z., R. Gossrau, et al. (1979). "Enzyme Histochemistry." A laboratory manual, Springer, Berlin.
- Luchansky, S. J., K. J. Yarema, et al. (2003). "GlcNAc 2-epimerase can serve a catabolic role in sialic acid metabolism." J Biol Chem **278**(10): 8035-42.
- Lucka, L., M. Krause, et al. (1999). "Primary structure and expression analysis of human UDP-N-acetyl-glucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase, the bifunctional enzyme in neuraminic acid biosynthesis." FEBS Lett **454**(3): 341-4.
- Mahal, L. K., N. W. Charter, et al. (2001). "A small-molecule modulator of poly-alpha 2,8-sialic acid expression on cultured neurons and tumor cells." Science **294**(5541): 380-1.
- Mahal, L. K., K. J. Yarema, et al. (1997). "Engineering chemical reactivity on cell surfaces through oligosaccharide biosynthesis." Science **276**(5315): 1125-8.
- Malykh, Y. N., B. Krisch, et al. (1999). "The presence of N-acetylneuraminic acid in Malpighian tubules of larvae of the cicada *Philaenus spumarius*." Glycoconj J **16**(11): 731-9.
- Malykh, Y. N., R. Schauer, et al. (2001). "N-Glycolylneuraminic acid in human tumours." Biochimie **83**(7): 623-34.
- Mancini, G. M., H. R. de Jonge, et al. (1989). "Characterization of a proton-driven carrier for sialic acid in the lysosomal membrane. Evidence for a group-specific transport system for acidic monosaccharides." J Biol Chem **264**(26): 15247-54.
- Manzi, A. E., A. Dell, et al. (1990). "Studies of naturally occurring modifications of sialic acids by fast-atom bombardment-mass spectrometry. Analysis of positional isomers by periodate cleavage." J Biol Chem **265**(14): 8094-107.
- Maran, R. R. (2003). "Thyroid hormones: their role in testicular steroidogenesis." Arch Androl **49**(5): 375-88.

Marcus, D. M. (1984). "A review of the immunogenic and immuno-modulatory properties of glycosphingolipids." Mol Immunol **21**(11): 1083-91.

Mayanil, C. S., D. George, et al. (2000). "Overexpression of murine Pax3 increases NCAM polysialylation in a human medulloblastoma cell line." J Biol Chem **275**(30): 23259-66.

McGhie, A. and J. Chapman (1961). "Disorders of attention and perception in early schizophrenia." Br J Med Psychol **34**: 103-16.

Mikol, D. D. and K. Stefansson (1988). "A phosphatidylinositol-linked peanut agglutinin-binding glycoprotein in central nervous system myelin and on oligodendrocytes." J Cell Biol **106**(4): 1273-9.

Miller-Podraza, H., J. Bergstrom, et al. (1997). "Recognition of glycoconjugates by *Helicobacter pylori*. Comparison of two sialic acid-dependent specificities based on haemagglutination and binding to human erythrocyte glycoconjugates." Glycoconj J **14**(4): 467-71.

Moase, C. E. and D. G. Trasler (1990). "Delayed neural crest cell emigration from Sp and Spd mouse neural tube explants." Teratology **42**(2): 171-82.

Moase, C. E. and D. G. Trasler (1991). "N-CAM alterations in splotch neural tube defect mouse embryos." Development **113**(3): 1049-58.

Monto, A. S., D. P. Robinson, et al. (1999). "Zanamivir in the prevention of influenza among healthy adults: a randomized controlled trial." Jama **282**(1): 31-5.

Morell, P., R. H. Quarles, et al. (1994). "Neural membranes: myelin formation, structure and biochemistry." Basic Neurochemistry, 5th edition (eds. G.J. Siegel et al.), Raven Press, New York, USA: 118-143.

Moscoso, L. M., H. Cremer, et al. (1998). "Organization and reorganization of neuromuscular junctions in mice lacking neural cell adhesion molecule, tenascin-C, or fibroblast growth factor-5." J Neurosci **18**(4): 1465-77.

Mühlenhoff, M., M. Eckhardt, et al. (1998). "Polysialic acid: three-dimensional structure, biosynthesis and function." Curr Opin Struct Biol **8**(5): 558-64.

Mühlenhoff, M., A. Manegold, et al. (2001). "The impact of N-glycosylation on the functions of polysialyltransferases." J Biol Chem **276**(36): 34066-73.

Nakayama, J., M. N. Fukuda, et al. (1995). "Expression cloning of a human polysialyltransferase that forms the polysialylated neural cell adhesion molecule present in embryonic brain." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(15): 7031-5.

Nave, K. A. and U. Suter (1997). "Störungen der Myelinbildung." Klinische Neurobiologie (ed. Herdegen T. et al.), Spektrum Akademischer Verlag: 101-128.

Neale, S. A. and D. G. Trasler (1994). "Early sialylation on N-CAM in splotch neural tube defect mouse embryos." Teratology **50**(2): 118-24.

Norton, W. T. and W. Cammer (1984). "Isolation and characterization of myelin." Myelin, 2nd edition (ed P. Morell). Plenum Press, New York, USA: 147-195.

O'Connell, A. W., G. B. Fox, et al. (1997). "Spatial learning activates neural cell adhesion molecule polysialylation in a corticohippocampal pathway within the medial temporal lobe." J Neurochem **68**(6): 2538-46.

Ofek, I. and N. Sharon (1990). "Adhesins as lectins: specificity and role in infection." Curr Top Microbiol Immunol **151**: 91-113.

Olden, K., J. B. Parent, et al. (1982). "Carbohydrate moieties of glycoproteins. A re-evaluation of their function." Biochim Biophys Acta **650**(4): 209-32.

Ong, E., J. Nakayama, et al. (1998). "Developmental regulation of polysialic acid synthesis in mouse directed by two polysialyltransferases, PST and STX." Glycobiology **8**(4): 415-24.

Owens, G. C., G. M. Edelman, et al. (1987). "Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene: alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(1): 294-8.

Panesar, N. S. and K. W. Chan (2005). "Chloride efflux in unstimulated Leydig cells causes autonomous cAMP production and stimulatory/inhibitory steroidogenesis with an efflux inhibitor." Steroids **70**(9): 652-9.

Pappin, D. J. (2003). "Peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF mass spectrometry." Methods Mol Biol **211**: 211-9.

Parker, J. M., D. Guo, et al. (1986). "New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites." Biochemistry **25**(19): 5425-32.

Pastuszak, I., J. O'Donnell, et al. (1996). "Identification of the GalNAc kinase amino acid sequence." J Biol Chem **271**(39): 23653-6.

Paulson, J. C., J. Weinstein, et al. (1989). "Tissue-specific expression of sialyltransferases." J Biol Chem **264**(19): 10931-4.

Pfeiffer, S. E., A. E. Warrington, et al. (1993). "The oligodendrocyte and its many cellular processes." Trends Cell Biol **3**(6): 191-7.

Phillips, G. R., L. A. Krushel, et al. (1997). "Developmental expression of two rat sialyltransferases that modify the neural cell adhesion molecule, N-CAM." Brain Res Dev Brain Res **102**(2): 143-55.

Pilatte, Y., J. Bignon, et al. (1993). "Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: pathophysiological implications of sialidases in immunity." Glycobiology **3**(3): 201-18.

Piller, F., M. H. Hanlon, et al. (1983). "Co-purification and characterization of UDP-glucose 4-epimerase and UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase from porcine submaxillary glands." J Biol Chem **258**(17): 10774-8.

Prescher, J. A. and C. R. Bertozzi (2005). "Chemistry in living systems." Nat Chem Biol **1**(1): 13-21.

Prescher, J. A., D. H. Dube, et al. (2004). "Chemical remodelling of cell surfaces in living animals." Nature **430**(7002): 873-7.

Price, J. (1994). "Glial cell lineage and development." Curr Opin Neurobiol **4**(5): 680-6.

Raine, C. S. (1984). "Morphology of myelin and myelination." Myelin, 2nd edition (ed. P. Morell), Plenum Press, New York, USA: 1-50.

Rens-Domiano, S. and T. Reisine (1991). "Structural analysis and functional role of the carbohydrate component of somatostatin receptors." J Biol Chem **266**(30): 20094-102.

Reuter, G., R. Pfeil, et al. (1983). "Identification of new sialic acids derived from glycoprotein of bovine submandibular gland." Eur J Biochem **134**(1): 139-43.

Reutter, W., W. Kreisel, et al. (1970). "Defekt der UDP-N-Acetyl-D-glucosamin-2-Epimerase in Hepatomen minimaler Deviation der Ratte." Hoppe Seylers Z Physiol Chem **351**: 1320.

Richards, J. S. (2005). "Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization." Mol Cell Endocrinol **234**(1-2): 75-9.

Richards, R. L., J. Moss, et al. (1979). "Cholera toxin: a bacterial lectin." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(4): 1673-6.

Rolf, B., M. Bastmeyer, et al. (2002). "Pathfinding errors of corticospinal axons in neural cell adhesion molecule-deficient mice." J Neurosci **22**(19): 8357-62.

Roneis, R. (1968). "Mikroskopische Technik." **16. Auflage, Oldenburg, München, Wien.**

Roth, J., A. Kempf, et al. (1992). "Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*." Science **256**(5057): 673-5.

Roth, J., C. Zuber, et al. (1988). "Presence of the long chain form of polysialic acid of the neural cell adhesion molecule in Wilms' tumor. Identification of a cell adhesion molecule as an oncodevelopmental antigen and implications for tumor histogenesis." Am J Pathol **133**(2): 227-40.

Ruiz-Alcaraz, A. J. and J. Del Rio-Garcia (2005). "Gonadins, a novel family of glutamyl-tripeptide amides present in the testis with activity in the hypophyseal-gonadal axis." Regul Pept **129**(1-3): 93-101.

Rutishauser, U., A. Acheson, et al. (1988). "The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions." Science **240**(4848): 53-7.

Rutishauser, U., J. P. Thiery, et al. (1976). "Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(2): 577-81.

Sadoul, R., M. Hirn, et al. (1983). "Adult and embryonic mouse neural cell adhesion molecules have different binding properties." Nature **304**(5924): 347-9.

Saito, M., H. Kitamura, et al. (2001). "Occurrence of gangliosides in the common squid and pacific octopus among protostomia." Biochim Biophys Acta **1511**(2): 271-80.

Salzer, J. L., W. P. Holmes, et al. (1987). "The amino acid sequences of the myelin-associated glycoproteins: homology to the immunoglobulin gene superfamily." J Cell Biol **104**(4): 957-65.

Santoni, M. J., C. Goridis, et al. (1988). "Molecular modelling of the immunoglobulin-like domains of the neural cell adhesion molecule (NCAM): implications for the positioning of functionally important sugar side chains." J Neurosci Res **20**(3): 304-10.

Sarkar, A. K., T. A. Fritz, et al. (1995). "Disaccharide uptake and priming in animal cells: inhibition of sialyl Lewis X by acetylated Gal beta 1-->4GlcNAc beta-O-naphthalenemethanol." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(8): 3323-7.

Sawada, R., S. Tsuboi, et al. (1994). "Differential E-selectin-dependent adhesion efficiency in sublines of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials." J Biol Chem **269**(2): 1425-31.

Schachner, M. and U. Bartsch (2000). "Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG (siglec-4a) in formation and maintenance of myelin." Glia **29**(2): 154-65.

Schachter, H. (2000). "The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches." Glycoconj J **17**(7-9): 465-83.

Schauer, R. (2000). "Achievements and challenges of sialic acid research." Glycoconj J **17**(7-9): 485-99.

Schauer, R. (2004). "Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man." Zoology (Jena) **107**(1): 49-64.

Schauer, R., S. Kelm, et al. (1995). "Biochemistry and role of sialic acids." Biology of sialic acids (Rosenberg, A., Plenum Press, New York): 7-67.

Schauer, R., H. J. Schoop, et al. (1968). "[On biosynthesis of the glycolyl groups of N-glycolylneuraminic acid. Oxidative conversion of N-acetyl groups to glycolyl groups]." Hoppe Seylers Z Physiol Chem **349**(5): 645-52.

Schauer, R., S. Stoll, et al. (1991). "Differences in the amount of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acid, as well as O-acylated sialic acids, of fetal and adult bovine tissues." Carbohydr Res **213**: 353-9.

Scheidegger, E. P., L. R. Sternberg, et al. (1995). "A human STX cDNA confers polysialic acid expression in mammalian cells." J Biol Chem **270**(39): 22685-8.

Schengrund, C. L., B. R. DasGupta, et al. (1991). "Binding of botulinum and tetanus neurotoxins to ganglioside GT1b and derivatives thereof." J Neurochem **57**(3): 1024-32.

Schlepper-Schäfer, J., V. Kolb-Bachofen, et al. (1980). "Analysis of lectin-dependent recognition of desialylated erythrocytes by Kupffer cells." Biochem J **186**(3): 827-31.

Schmidt, C., C. Ohlemeyer, et al. (2000). "Incorporation of N-propanoylneuraminic acid leads to calcium oscillations in oligodendrocytes upon the application of GABA." FEBS Lett **478**(3): 276-80.

Schmidt, C., P. Stehling, et al. (1998). "Biochemical engineering of neural cell surfaces by the synthetic N-propanoyl-substituted neuraminic acid precursor." J Biol Chem **273**(30): 19146-52.

Schuch, U., M. J. Lohse, et al. (1989). "Neural cell adhesion molecules influence second messenger systems." Neuron **3**(1): 13-20.

Schüler, C. (1997). "Sialinsäureanaloga – Neue Modulatoren zellbiologischer Funktionen von humanen Immun- und Tumorzellen." Dissertation, Fachbereich Biologie, Freie Universität Berlin.

Schulte, T. W., J. A. Toretsky, et al. (1997). "Expression of PAX3 in Ewing's sarcoma family of tumors." Biochem Mol Med **60**(2): 121-6.

Schwarzkopf, M., K. P. Knobloch, et al. (2002). "Sialylation is essential for early development in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5267-70.

Scolding, N. J., S. Frith, et al. (1989). "Myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG) is a surface marker of oligodendrocyte maturation." J Neuroimmunol **22**(3): 169-76.

Seki, T. and Y. Arai (1993). "Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system." Neurosci Res **17**(4): 265-90.

Seki, T. and U. Rutishauser (1998). "Removal of polysialic acid-neural cell adhesion molecule induces aberrant mossy fiber innervation and ectopic synaptogenesis in the hippocampus." J Neurosci **18**(10): 3757-66.

Shen, H., M. Watanabe, et al. (2001). "Genetic deletions of NCAM and PSA impair circadian function in the mouse." Physiol Behav **73**(1-2): 185-93.

Shimamura, M., N. Shibuya, et al. (1994). "Repulsive contribution of surface sialic acid residues to cell adhesion to substratum." Biochem Mol Biol Int **33**(5): 871-8.

Sicotte, N. L., B. S. Giesser, et al. (2007). "Testosterone treatment in multiple sclerosis: a pilot study." Arch Neurol **64**(5): 683-8.

Sillanaukee, P., M. Ponnio, et al. (1999). "Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders." Eur J Clin Invest **29**(5): 413-25.

Sjoberg, E. R., A. E. Manzi, et al. (1992). "Structural and immunological characterization of O-acetylated GD2. Evidence that GD2 is an acceptor for ganglioside O-acetyltransferase in human melanoma cells." J Biol Chem **267**(23): 16200-11.

Solly, S. K., J. L. Thomas, et al. (1996). "Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG) expression is associated with myelin deposition." Glia **18**(1): 39-48.

Sommar, K. M. and D. B. Ellis (1972). "Uridine diphosphate N-acetyl-D-glucosamine-2-epimerase from rat liver. I. Catalytic and regulatory properties." Biochim Biophys Acta **268**(2): 581-9.

Spicer, L. J. (2001). "Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction." Domest Anim Endocrinol **21**(4): 251-70.

Stäsche, R., S. Hinderlich, et al. (1997). "A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Molecular cloning and functional expression of UDP-N-acetyl-glucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase." J Biol Chem **272**(39): 24319-24.

Stewart, C. and R. Morris (1993). "The watermaze: a practical approach." Behavioural neuroscience: 107-122.

Stoffel, W. and A. Bosio (1997). "Myelin glycolipids and their functions." Curr Opin Neurobiol. **7**: 654-661.

Stork, O., H. Welzl, et al. (1997). "Increased intermale aggression and neuroendocrine response in mice deficient for the neural cell adhesion molecule (NCAM)." Eur J Neurosci **9**(6): 1117-25.

Stork, O., H. Welzl, et al. (1999). "Anxiety and increased 5-HT_{1A} receptor response in NCAM null mutant mice." J Neurobiol **40**(3): 343-55.

Strominger, J. L. and M. S. Smith (1959). "Uridine diphosphoacetylglucosamine pyrophosphorylase." J Biol Chem **234**(7): 1822-7.

- Suzuki, O., Y. Nozawa, et al. (2002). "UDP-GlcNAc2-epimerase regulates cell surface sialylation and cell adhesion to extracellular matrix in Burkitt's lymphoma." Int J Oncol **20**(5): 1005-11.
- Suzuki, Y., T. Ito, et al. (2000). "Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses." J Virol **74**(24): 11825-31.
- Szumilo, T., Y. Zeng, et al. (1996). "Purification to homogeneity and properties of UDP-GlcNAc (GalNAc) pyrophosphorylase." J Biol Chem **271**(22): 13147-54.
- Takeda, A. (1987). "Sialylation patterns of lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) differ between T and B lymphocytes." Eur J Immunol **17**(2): 281-6.
- Tanaka, F., Y. Otake, et al. (2000). "Expression of polysialic acid and STX, a human polysialyltransferase, is correlated with tumor progression in non-small cell lung cancer." Cancer Res **60**(11): 3072-80.
- Tedder, T. F., J. Tuscano, et al. (1997). "CD22, a B lymphocyte-specific adhesion molecule that regulates antigen receptor signaling." Annu Rev Immunol **15**: 481-504.
- Tena-Sempere, M. (2005). "Ghrelin: novel regulator of gonadal function." J Endocrinol Invest **28**(5 Suppl): 26-9.
- Tezel, E., Y. Kawase, et al. (2001). "Expression of neural cell adhesion molecule in pancreatic cancer." Pancreas **22**(2): 122-5.
- Theodosis, D. T., G. Rougon, et al. (1991). "Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: polysialylated neural cell adhesion molecule in the hypothalamo-neurohypophysial system." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(13): 5494-8.
- Thurin, J., M. Herlyn, et al. (1985). "Proton NMR and fast-atom bombardment mass spectrometry analysis of the melanoma-associated ganglioside 9-O-acetyl-GD3." J Biol Chem **260**(27): 14556-63.

- Tomasiewicz, H., K. Ono, et al. (1993). "Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system." Neuron **11**(6): 1163-74.
- Tomlinson, S., L. C. Pontes de Carvalho, et al. (1994). "Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement." J Immunol **153**(7): 3141-7.
- Tourian, A., M. Callahan, et al. (1983). "L-glutamine D-fructose-6-P aminotransferase regulation by glucose-6-P and UDP-N-acetylglucosamine." Neurochem Res **8**(12): 1589-95.
- Trapp, B. D., L. Bernier, et al. (1988). "Cellular and subcellular distribution of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and its mRNA in the rat central nervous system." J Neurochem **51**(3): 859-68.
- Trotter, J., D. Bitter-Suermann, et al. (1989). "Differentiation-regulated loss of the polysialylated embryonic form and expression of the different polypeptides of the neural cell adhesion molecule by cultured oligodendrocytes and myelin." J Neurosci Res **22**(4): 369-83.
- van Daal, J. H., P. J. Herbergs, et al. (1991). "A genetic-correlational study of hippocampal structural variation and variation in exploratory activities of mice." Behav Brain Res **43**(1): 57-64.
- Van den Steen, P., P. M. Rudd, et al. (1998). "Concepts and principles of O-linked glycosylation." Crit Rev Biochem Mol Biol **33**(3): 151-208.
- Van Rinsum, J., W. Van Dijk, et al. (1983). "Subcellular localization and tissue distribution of sialic acid precursor-forming enzymes." Biochem J **210**(1): 21-8.
- Varki, A. (1992). "Diversity in the sialic acids." Glycobiology **2**(1): 25-40.
- Varki, A. (1993). "Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct." Glycobiology **3**(2): 97-130.
- Varki, A. (1997). "Selectin ligands: will the real ones please stand up?" J Clin Invest **100**(11 Suppl): S31-5.

Varki, A. (2006). "Nothing in glycobiology makes sense, except in the light of evolution." Cell **126**(5): 841-5.

Varki, A. and T. K. Altheide (2005). "Comparing the human and chimpanzee genomes: searching for needles in a haystack." Genome Res **15**(12): 1746-58.

Von Bohlen Und Halbach, F., J. Taylor, et al. (1992). "Cell Type-specific Effects of the Neural Adhesion Molecules L1 and N-CAM on Diverse Second Messenger Systems." Eur J Neurosci **4**(10): 896-909.

von Itzstein, M., W. Y. Wu, et al. (1993). "Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication." Nature **363**(6428): 418-23.

Wang, X., C. L. Shen, et al. (2005). "Cyclooxygenase-2 regulation of the age-related decline in testosterone biosynthesis." Endocrinology **146**(10): 4202-8.

Warren, L. and H. Felsenfeld (1961). "N-Acetylmannosamine-6-phosphate and N-acetylneuraminic acid-9-phosphate as intermediates in sialic acid biosynthesis." Biochem Biophys Res Commun **5**: 185-90.

Wasley, L. C., G. Timony, et al. (1991). "The importance of N- and O-linked oligosaccharides for the biosynthesis and in vitro and in vivo biologic activities of erythropoietin." Blood **77**(12): 2624-32.

Wells, L., S. A. Whelan, et al. (2003). "O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification." Biochem Biophys Res Commun **302**(3): 435-41.

Wieser, J. R., A. Heisner, et al. (1996). "In vivo modulated N-acyl side chain of N-acetylneuraminic acid modulates the cell contact-dependent inhibition of growth." FEBS Lett **395**(2-3): 170-3.

Xin, Y., J. M. Lasker, et al. (1991). "Isoelectric focusing/western blotting: a novel and practical method for quantitation of carbohydrate-deficient transferrin in alcoholics." Alcohol Clin Exp Res **15**(5): 814-21.

Yamashita, K., K. Fukushima, et al. (1995). "Expression of Sia alpha 2-->6Gal beta 1-->4GlcNAc residues on sugar chains of glycoproteins including carcinoembryonic antigens in human colon adenocarcinoma: applications of *Trichosanthes japonica* agglutinin I for early diagnosis." Cancer Res **55**(8): 1675-9.

Yarema, K. J., L. K. Mahal, et al. (1998). "Metabolic delivery of ketone groups to sialic acid residues. Application To cell surface glycoform engineering." J Biol Chem **273**(47): 31168-79.

Yoshida, Y., N. Kojima, et al. (1995). "Molecular cloning and characterization of a third type of N-glycan alpha 2,8-sialyltransferase from mouse lung." J Biochem (Tokyo) **118**(3): 658-64.

Yuyama, Y., K. Yoshimatsu, et al. (1993). "Postnatal change of pig intestinal ganglioside bound by *Escherichia coli* with K99 fimbriae." J Biochem (Tokyo) **113**(4): 488-92.

Zhou, Q., S. Hakomori, et al. (1994). "GM3 directly inhibits tyrosine phosphorylation and de-N-acetyl-GM3 directly enhances serine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, independently of receptor-receptor interaction." J Biol Chem **269**(3): 1959-65.

Erklärung

„Ich, Daniel Gagiannis, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:
„Biochemische *in vivo* - Modulation von Sialoglycokonjugaten und deren biologische
Konsequenzen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel
benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer
Arbeiten dargestellt habe.“