

I Einleitung

Alle lebenden Zellen sind von einer Plasmamembran umgeben, die durch ihre Struktur und Permeabilitätseigenschaften eine Barriere gegen die Außenwelt darstellt, zugleich aber auch den kontrollierten Stoffaustausch mit ihr ermöglicht. Membranen sind sehr komplexe Gebilde mit einer Vielzahl unterschiedlicher Funktionen. Sie sind an zahlreichen Stoffwechselprozessen beteiligt, eng mit Energieumwandlungsprozessen wie Photosynthese und Phosphorylierung verknüpft, spielen eine Rolle bei der Aufnahme von und bei der Reaktion auf äußere Signale, sind an Bewegungsvorgängen, Wachstum und Zellteilungen beteiligt und kontrollieren den Informationsfluß zwischen den Zellen und ihrer Umgebung. Die strukturelle Grundlage aller zellulären Membranen sind Lipiddoppelschichten, die aus Phosphoglyceriden, Sphingolipiden und Cholesterin bestehen. In die Lipiddoppelschichten sind Membranproteine eingelagert. Integrale Membranproteine durchspannen mit Transmembran-Helices die Lipiddoppelschicht einfach oder mehrfach, wohingegen periphere Membranproteine über Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Lipiddoppelschicht verbunden sind (Abb. 1).

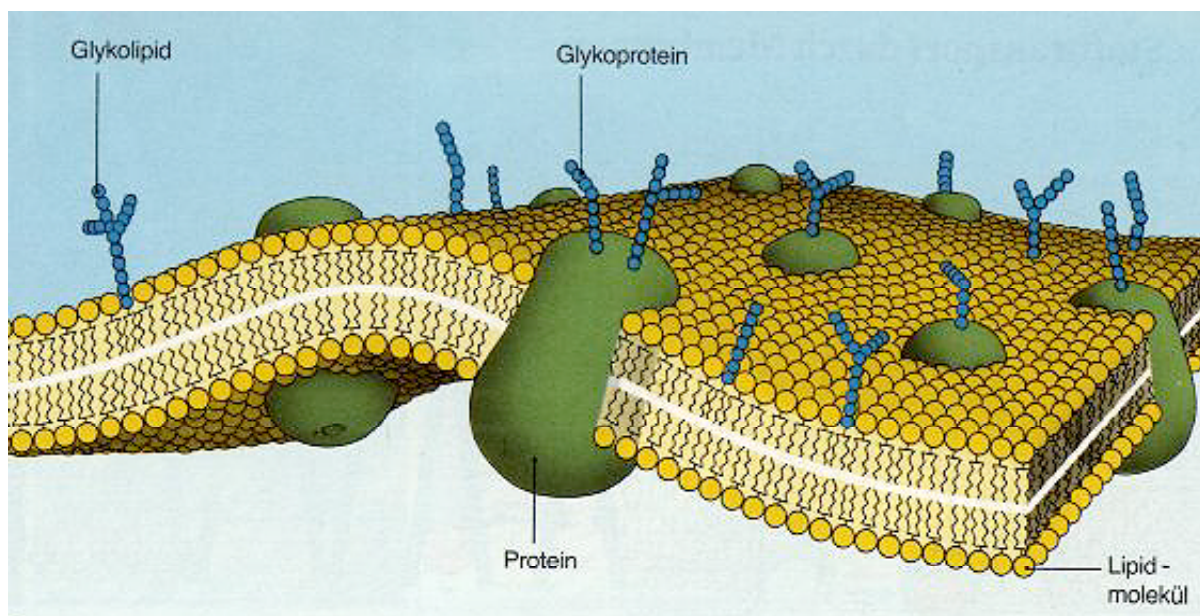


Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer zellulären Plasmamembran. Sie besteht aus einer etwa 6 nm dicken Doppelschicht von Lipidmolekülen. In dieser Lipiddoppelschicht sind integrale Membranproteine eingelagert oder periphere Membranproteine mit ihr assoziiert. Membranproteine können Kohlenhydratketten tragen.

Lipide und alle Membranproteine tragen kovalent verknüpfte, oft verzweigte Kohlenhydratketten, die immer nach außen gerichtet sind. Der Kohlenhydratanteil

Einleitung

der Glycoproteine kann bis zu 85% betragen. Diese Glycoproteine und Glycolipide bilden zusammen mit Proteoglycanen eine Art zusätzlicher Zellhülle, die Glycokalix (Abb. 2). Sie vermittelt oft die Interaktion zwischen Biomolekülen bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten. Viele Glykokonjugate sind auch Rezeptoren für Signalmoleküle. Die Forschungen über Glycane und glycanhaltige Moleküle sind in den letzten Jahren unter dem Begriff Glycomics zunehmend in den Mittelpunkt gerückt. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Grundlagenforschung, in der Lebensmitteltechnologie und in der pharmazeutischen Industrie. Sie bilden eine neue Basis für die Entwicklung von Therapeutika und die Verbesserung von diagnostischen Verfahren. Die Sialinsäure als terminale Komponente dieser Oligosaccharidstrukturen ist dabei ein herausragendes Zielmolekül.

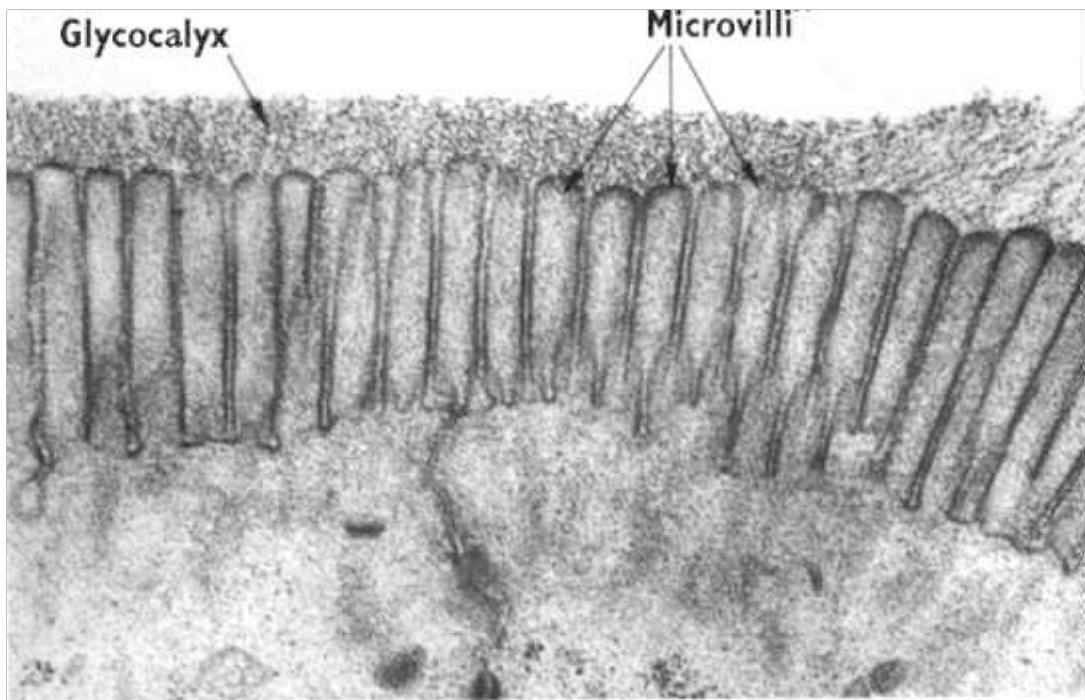


Abbildung 2: Die Glycokalix eukaryontischer Zellen. Die Glycokalix lässt sich im Elektronenmikroskop darstellen, ist bis zu 140 nm dick und besteht aus dicht gepackten Oligosaccharidketten.

1.1. Struktur der Sialinsäuren

Die Sialinsäuren sind eine Familie von sauren Aminoazuckern, deren Grundgerüst aus neun Kohlenstoffatomen besteht (Abb. 3). Die C-2-Position ist stets carboxyliert, während die C-5-Position eine Aminogruppe trägt. Gewöhnlich wird die Aminogruppe acetyliert, so daß der häufigste Vertreter der Sialinsäuren entsteht, die *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac). Diese ist biosynthetischer Vorläufer für nahezu alle der 50 natürlich vorkommenden Sialinsäuren (Angata und Varki, 2002). Die

unsubstituierte Form, die Neuraminsäure, tritt in der Natur nur äußerst selten auf (Manzi *et al.*, 1990). Sialinsäuren bilden in Lösung durch intramolekulare Kondensation spontan einen Pyranosering zwischen C-2 und C-6, so daß ein Halbacetal entsteht. In Glykokonjugaten findet man Sialinsäuren in der α -Konformation. Eine Ausnahme bildet der aktivierte Nucleotidzucker der Sialinsäure, CMP-Neu5Ac, in dem das anomere Kohlenstoffatom β -Konformation aufweist (Kolter und Sandhoff, 1997).

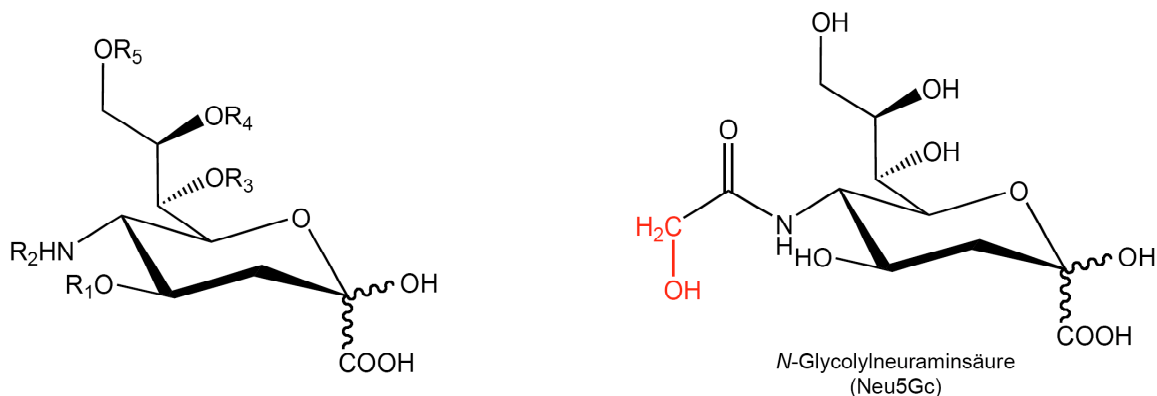


Abbildung 3: Struktur von Sialinsäuren. Sialinsäuren sind N-acylierte ($R_2 =$ Acetyl- oder Glycolylgruppen) Derivate der Neuraminsäure mit Acetyl-, Lactoyl-, Methyl-, Sulfonyl- und Phosphonylgruppen als mögliche O-Substituenten (R_1 , R_3 , R_4 , R_5). Bei Neu5Ac, der häufigsten Sialinsäure, liegen alle Hydroxylfunktionen unmodifiziert vor. Bei physiologischem pH-Wert ist die Carboxylatgruppe deprotoniert. N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc): Die Acetylgruppe (rot) wird oxidiert.

Die große Vielfalt der Sialinsäuren entsteht durch die Art der Aminosubstituenten, sowie Anzahl, Position und Kombination von Hydroxylsubstituenten an den Positionen C-4, C-7, C-8 und C-9 durch Acetyl-, Lactoyl-, Sulfonyl-, Phosphonyl- oder Methylgruppen (Schauer *et al.*, 1995). Sie erhalten diese Modifikationen im *trans*-Golgi-Netzwerk nach ihrer Bindung an das Oligosaccharid. Als Substituenten der Aminogruppe ist neben der Acetyl- auch die Glycolylgruppe beschrieben (Varki, 1992), die zur Bildung der N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) führt. Die Oxidation der Acetylgruppe von CMP-Neu5Ac zur Glycolylgruppe erfolgt im Cytosol (Shaw und Schauer, 1988). In humanem Gewebe fehlt jedoch die Neu5Gc. Dies basiert auf einer Mutation im CMP-Neu5Ac-Hydroxylase-Gen (Irie *et al.*, 1998). Das Fehlen der Neu5Gc in humanem Gewebe ist damit der bisher einzige bekannte molekulare Unterschied zwischen Mensch und Schimpansen (Gagneux *et al.*, 2005). Lediglich in fötalem Gewebe und in einigen Tumoren konnte die höchstwahrscheinlich aus exogenen Quellen stammende und inkorporierte Neu5Gc nachgewiesen werden

Einleitung

(Tangvoranuntakul *et al.*, 2003). Da humane embryonale Stammzellen heutzutage mit Neu5Gc-haltigen Seren anderer Säugetiere auf einer Schicht von Maus-Feederzellen kultiviert werden, sind sie gleich zwei Neu5Gc-Quellen ausgesetzt. Sie nehmen Neu5Gc aus dem Medium und über die Feederzellen auf, bauen sie in die Glycanketten ein und präsentieren diese Sialinsäure schließlich auf ihrer Zelloberfläche (Martin *et al.*, 2005). Im adulten humanen Organismus wirkt Neu5Gc jedoch antigen (Kawai *et al.*, 1991; Kean, 1991), wodurch das therapeutische Klonen, welches das Ersetzen von malignem Gewebe durch Nachzüchtung aus Stammzellen anstrebt, mit der heutigen Generation von Stammzellen Gefahren in sich birgt (Martin *et al.*, 2005). Zur kompletten Eliminierung der antigenen Neu5Gc müssten demnach neue embryonale Stammzelllinien etabliert werden, die ausschließlich auf humanen Feederzellen mit humanem Serum kultiviert werden.

Die Vielzahl der natürlichen Sialinsäuren wurde durch die Verwendung neuer synthetischer Sialinsäurevorläufer beträchtlich vermehrt. Diese Mannosamin-Analoga (Abb. 4) werden in der *N*-Acylseitenkette chemisch modifiziert. Zellen werden mit diesen Sialinsäurevorläufern behandelt. Die modifizierten Sialinsäurevorläufer werden dann durch die Enzyme der Sialinsäurebiosynthese zu Sialinsäuren metabolisiert und durch Sialyltransferasen in Glycokonjugate eingebaut (Hinderlich *et al.*, 2005). Die biologische Bedeutung der Sialinsäuren und ihrer *N*-Acylseitenkette kann durch dieses neue biochemische Verfahren genauer erfaßt werden. Keppler *et al.* (1995) zeigten, daß Zellen, die mit millimolaren Konzentrationen der Analoga behandelt wurden, einen hohen Anteil modifizierter Sialinsäuren auf der Oberfläche präsentierten. Die Analoga der Sialinsäuren oder Mannosamine müssen dazu zuerst in das Cytosol der Zellen gelangen. Die millimolaren Konzentrationen, die erforderlich sind, um nennenswerte Mengen der Analoga einzubauen, deuten darauf hin, daß die Zucker durch Endocytose aufgenommen werden. Bardor *et al.* (2005) konnten zeigen, daß exogenes Neu5Gc über Endocytose ins Lysosom gelangt und von dort über unspezifischen Transport ins Cytosol exportiert wird. Dies ist ein erstes Beispiel dafür, daß kleine Moleküle über spezifischen lysosomalen Transport in die Zelle gelangen. Mannosamin-Derivate wie ManNGc überbrücken durch passive Diffusion die Plasmamembran und werden im Cytosol zu Sialinsäuren umgesetzt. Collins *et al.* (2000) zeigten, indem sie die Hydrophobizität der Zuckeranaloga durch Acetylierung der Hydroxylgruppe erhöhten, daß ebenfalls eine Diffusion durch die

Plasmamembran stattfindet. Sie schließen daraus, daß acetylierte Zucker durch Diffusion, nicht-acetylierte Zucker durch Endocytose in die Zelle gelangen.

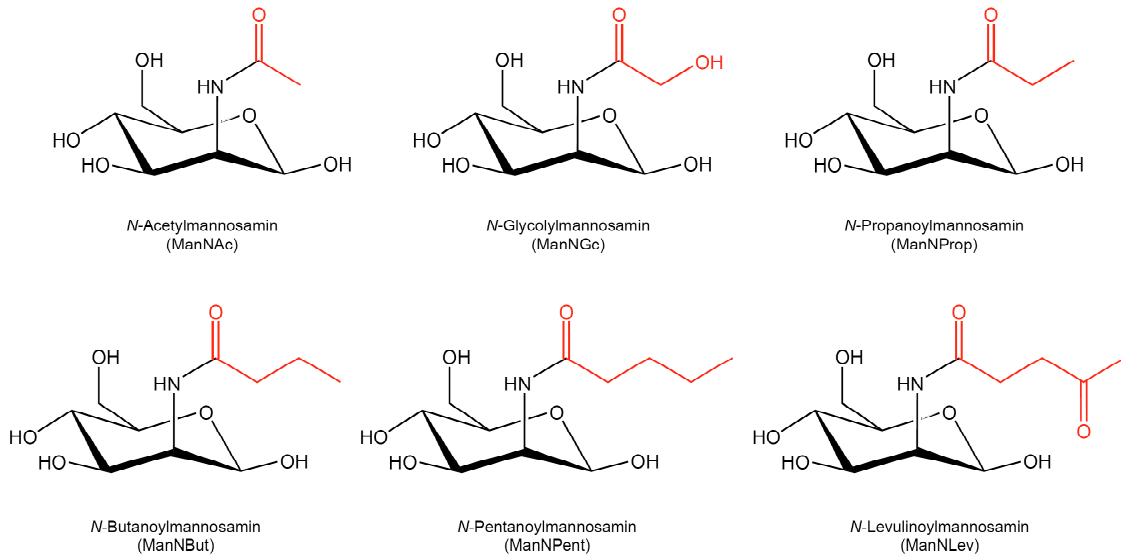


Abbildung 4: Synthetische metabolische Sialinsäurevorläufer. Strukturen unnatürlicher Mannosaminderivate, die in Glycokonjugate eingebaut werden können. Die biologische Bedeutung der Sialinsäuren kann durch dieses biochemische Verfahren genauer untersucht werden.

Die am häufigsten eingesetzten Analoga zur Modulation der Struktur von Sialinsäuren sind die Mannosamine mit verlängerten oder modifizierten *N*-Acylseitenketten (Abb. 4). Die *N*-Acylseitenkette wird von den Enzymen des Sialinsäurestoffwechsels und vom CMP-Neu5Ac-Transporter nicht erkannt und spielt somit keine Rolle bei der Substratbindung. Werden die Seitenketten der Mannosaminderivate aber zu lang oder zu sperrig, können sie grundsätzlich nicht mehr metabolisiert werden. Dies wurde für Analoga mit sechs oder mehr Kohlenstoffatomen in den Seitenketten gezeigt (Jacobs *et al.*, 2001). Dagegen scheint die Aminogruppe des Zuckers sehr wichtig zu sein. Wird sie durch eine Methylengruppe substituiert, lässt sich generell keine Metabolisierung mehr nachweisen.

Der Schlüsselschritt bei der Metabolisierung scheint die Phosphorylierung der Analoga zu sein. Die ManNAc-Kinase kann Mannosaminderivate mit längeren Seitenketten nicht phosphorylieren. Diese Phosphorylierung muß durch eine andere Kinase erfolgen. Hinderlich *et al.* (2005) konnten nachweisen, daß es sich dabei um die GlcNAc-Kinase handelt. Die Einbauraten von Mannosaminanaloga in membrangebundene Sialinsäuren verschiedener Zelllinien ist unterschiedlich stark (Keppler *et al.*, 2001). Der entscheidende Faktor scheint dabei die endogene

Einleitung

ManNAc-Synthese der Zellen zu sein. ManNAc konkurriert mit den Analoga bei der Metabolisierung durch die verschiedenen Enzyme.

1.2. Vorkommen von Sialinsäuren

Sialinsäuren sind essentielle Bestandteile von Glycokonjugaten. In der Stammgruppe der Deuterostomia (Neumünder) konnten die Sialinsäuren bei den Stämmen Hemichordata (Kiemenlochtiere), Echinodermata (Stachelhäuter) und Chordata (Chordatiere) nachgewiesen werden (Corfield, 1982). Die Echinodermata sind der erste Abzweig des Evolutionsbaumes (Abb. 5), bei dem in den meisten Geweben eines Tieres Sialinsäuren zu finden waren. Urochordata (Manteltiere) besitzen keine Sialinsäuren, obwohl sie sich später als die Echinodermata entwickelt haben. Für die Cephalochordata (Schädellose) und Vertebrata (Wirbeltiere), zu denen auch der Mensch gehört, konnte eine große Vielfalt an Sialinsäuren nachgewiesen werden. Die Mehrheit der isolierten und analysierten Kohlenhydrate stammt aus der Klasse der Mammalia (Säugetiere). Es gibt keine Säugetier-Spezies, bei denen keine Sialinsäuren gefunden wurden. Bei anderen Spezies sind sie dagegen eher die Ausnahme. In dem Evolutionszweig der Amphibien wurde in Gehirn, Haut, Muskel, Eier und Blut von Fröschen die Anwesenheit von Sialinsäuren gezeigt (Corfield, 1982). Die Reptilien wurden noch nicht systematisch auf das Vorkommen von Sialinsäuren untersucht. Die wenigen Spezies, die untersucht wurden, wie z. B. Schildkröten, wiesen Sialinsäuren auf. Kürzlich wurden auch sialylierte Glycolipide im Gewebe von Tintenfischen entdeckt (Saito *et al.*, 2001).

In der Deuterostomia-Linie kommen alle Varianten der O-Modifikation vor (Angata und Varki, 2002). Wirbeltiere besitzen in der Regel nur O-acetylierte und eventuell noch O-lactoylierte Sialinsäuren. Hinsichtlich der Vielfalt an Sialinsäuren können sich die einzelnen Arten jedoch stark unterscheiden. So konnten in der Speicheldrüse des Rindes 14 verschiedene Sialinsäuren identifiziert werden (Reuter *et al.*, 1983). Humanes Gewebe dagegen enthält nur drei verschiedene Typen von Sialinsäuren, die Neu5Ac, die 9-O-acetylierte Neu5Ac und die 9-O-lactosylierte Neu5Ac. Das Vorkommen der einzelnen Sialinsäuren wird von den Aktivitäten zahlreicher spezifischer Sialyltransferasen bestimmt (Paulson *et al.*, 1989; Basu *et al.*, 1995). Die Verteilung der Sialinsäuren ist dabei spezies-, organ-, und ontogenesespezifisch (Varki, 1993).

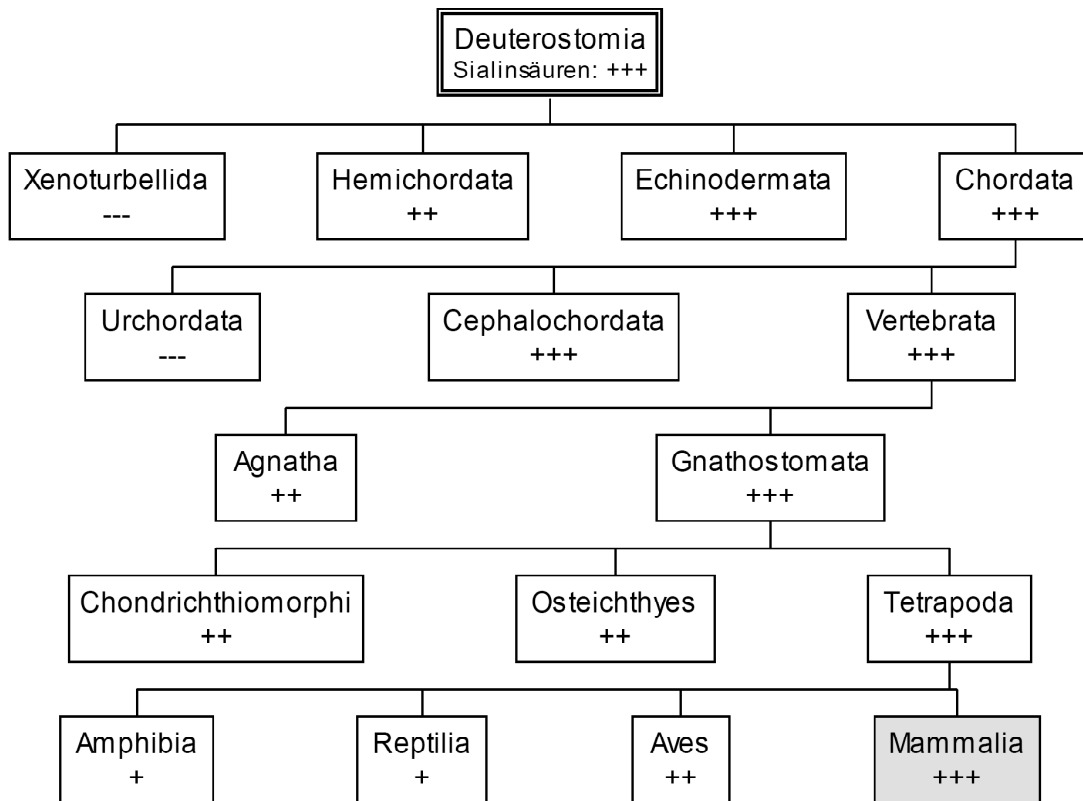


Abbildung 5: Systematik der Deuterostomia oder Neumünder und ihre Vorkommen an Sialinsäuren. „+++“: sehr hohe Vielfalt an Sialinsäuren; „++“: hohe Vielfalt an Sialinsäuren; „+“: in einzelnen Spezies nachweisbar; „---“: in keiner Spezies nachweisbar (nach: Corfield, 1982). Alle Mammalia-Spezies (grau unterlegt) besitzen Sialinsäuren.

In der Stammgruppe der Protostomia (Urmünder) besitzt die Mehrheit dieser Organismen keine Sialinsäuren. Im Unterstamm der Crustacea (Krebstiere) und der Tracheata (Tracheentiere) konnten sie jedoch nachgewiesen werden. Die Insekten exprimieren in bestimmten Entwicklungsstadien Sialinsäuren. Mit immun-histologischen Nachweisen, Western-Blot-Analysen und Massenspektroskopie konnten Roth *et al.* (1992) Neu5Ac und das α 2-8-verknüpfte Neu5Ac-Homopolymer Polysialinsäure (PSA) in *Drosophila melanogaster* nachweisen. Während Neu5Ac bei der Entwicklung von *Drosophila melanogaster* vom Blastoderm bis zum dritten Larvalstadium vorkommt, ist die Expression von PSA streng reguliert und findet ausschließlich in den Embryonen statt. Das Sialinsäurederivat Neu5Gc7,9Ac₂ wurde sogar im dritten Larvalstadium der *Galleria mellonella* gefunden (Malykh *et al.*, 1999). Sialinsäuren konnten eindeutig in einigen Protozoen (Einzeller) wie Bakterien und niederen Eukaryoten gefunden werden (Angata und Varki, 2002). 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

Einleitung

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.

Sowohl bei Pilzen als auch bei Hefen konnten Sialinsäuren nachgewiesen werden. Das Vorkommen von Sialinsäuren bei Hefen ist jedoch umstritten. Es gibt experimentelle Daten, die darauf hinweisen, daß sich Sialinsäuren auf der Zelloberfläche definierter Stämme befinden. So haben Alviano *et al.* (1999) und Jones *et al.* (1995) die Anwesenheit von Sialinsäuren in *Candida albicans* indirekt nachgewiesen. Die Behandlung von drei isolierten Glycoproteinen mit Sialidase führte zu einer offensichtlichen Abnahme der molekularen Masse bei zwei von ihnen. Sehr umstritten ist der Nachweis von Sialinsäuren bei Pflanzen. Shah *et al.* (2003) spekulieren, daß das Genom von *Arabidopsis thaliana* vermeintliche Gene für CMP-Neu5Ac-Transporter und Sialyltransferasen beinhaltet und *A. thaliana* damit in der Lage ist, Proteine zu sialylieren. Sie zeigten, daß Suspensionszellen von *A. thaliana* sialylierte Glycoproteine exprimieren. Es wurden *A. thaliana*-Suspensionszellen aufgearbeitet und über ein Gemisch immobilisierter Lektine (SNA-1, MAA), die spezifisch für Neu5Ac α 2-3Gal- bzw. Neu5Ac α 2-6Gal-Strukturen sind, aufgereinigt. Mittels Western-Blot-Analysen über biotinylierte Lektine konnten sowohl im Extrakt als auch in der aufgereinigten Fraktion sialylierte Glycoproteine nachgewiesen werden. Séveno *et al.* (2004) zweifeln diese Ergebnisse an. Sie glauben, daß die verwendete Methode unter bestimmten Bedingungen falsch-positive Ergebnisse liefert, da diese Western-Blot-Signale nicht spezifisch für Sialinsäuren sein können. Nach einer Sialidase-Behandlung der Proben erhielten sie die gleichen Western-Blot-Signale.

1.3. Sialylierte Oligosaccharidstrukturen

1.3.1. Glycoproteine

Glycoproteine sind in der Natur ubiquitär und kommen vom Archaeobakterium bis zum Menschen vor. Die Glycosylierung ist die häufigste posttranslationale Modifikation und bestimmt maßgeblich die strukturellen und regulatorischen Eigenschaften von Proteinen. Die gebundenen Kohlenhydrate variieren von Monosacchariden über Di- und Oligosaccharide bis zu Polysacchariden. Mindestens 50% aller Säugerproteine sind glycosyliert, wobei die Funktion dieser Glycosylierungen nicht immer verstanden wird (Apweiler *et al.*, 1999). Glycoproteine wurden innerhalb der Zelle sowohl im

Einleitung

Der variable Strukturteil läßt sich in drei Klassen unterteilen (Schachter, 2000). Oligomannose-Glycane besitzen neben der Kernstruktur nur noch α 1-2- und α 1-6-verzweigte Mannosereste. Hefen können zum Beispiel Oligomannoseketten mit bis zu 200 Mannosen produzieren. Die Oligosaccharide des komplexen Typs besitzen zusätzlich *N*-Acetyllactosamineinheiten, bestehend aus GlcNAc und Galactosen, Fucosen und Sialinsäuren. Die Sialinsäuren sind an das nicht-reduzierende Ende der Oligosaccharide des komplexen Typs in α 2-3- oder α 2-6-Stellung gebunden. Eine Sonderform der Sialylierung stellt die Polysialylierung von N-Glycanen des neuralen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) dar. Polysialinsäure besteht aus einer linearen Kette von bis zu 200 α 2-8-verknüpften Sialinsäuren (Mühlenhoff *et al.*, 1998). Der hybride Typ stellt eine Mischform aus mannosereichem und komplexem Typ dar. Die Kernstruktur kann auch einen Xylose-Rest tragen, was allerdings einen Sonderfall der N-Glycane darstellt (Sharon und Lis, 1997). Häufig enthalten Glycoproteine auch Sulfatreste, die normalerweise an Galactose, GlcNAc oder GalNAc gebunden sind. Die Struktur der O-Glycane ist sehr viel heterogener als die von N-Glycanen (van den Steen *et al.*, 1998; Peter-Katalinic, 2005), so daß man von keiner einheitlichen Nomenklatur reden kann. In Glycoproteinen wurde eine große Vielfalt von O-glycosidischen Bindungen zwischen Kohlenhydraten und Proteinen gefunden (Sharon und Lis, 1997). Es gibt verschiedene Formen der O-Glycosylierung (Abb. 6). Bei Zelloberflächen- und extrazellulären Proteinen ist die am häufigsten vorkommende die α -Verknüpfung von GalNAc mit der Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin. Im Gegensatz zur N-Glycosylierung gibt es hier 8 verschiedene Kernstrukturen (Peter-Katalinic, 2005). Eukaryontische nucleäre und cytoplasmatische Proteine haben O-GlcNAc als häufigsten Glycosylierungstyp. O-GlcNAc kann mit Serin oder Threonin β -verknüpft sein (Wells und Hart, 2003). Diese Proteine, wie z. B. Tumorsuppressoren, Cytoskelettproteine oder Transkriptions-faktoren sind involviert in der Regulation des Zellzyklus und bei Zellwachstum und -differenzierung. Weiterhin gibt es die O-Fucosylierung, die O-Mannosylierung, die O-Glucosylierung, die Phosphoglycosylierung und die O-Glycosaminoglycan-Typ-Glycosylierung. Die O-Fucosylierung ist eine ungewöhnliche posttranslationale Modifikation. Hier ist die Fucose ebenfalls β -glycosidisch mit einem Serin oder Threonin in der Konsensussequenz Gly-Gly-Ser/Thr verknüpft. Bei Proteinen, die eine wichtige Rolle bei physiologischen Prozessen, wie Blutgerinnung, Signaltransduktion und Metastasierung spielen, konnte diese O-Fucosylierung

gezeigt werden, wobei ihre Funktion noch unklar ist. Diese Modifikation konnte in den EGF-Domänen einiger Blutgerinnungs- und fibrinogen Proteine (Harris und Spellman, 1993), sowie im humanen Notch 1-Protein nachgewiesen werden (Moloney *et al.*, 2000). Notch 1 ist ein Zelloberflächenrezeptor, der in Entwicklungsprozessen, wie Neurogenese und Angiogenese seine Funktion findet. Die Konsensussequenz der O-Fucose-Verknüpfung ist Cys-X-X-Gly-Gly-Ser/Thr-Cys. Hier kommt die Fucose nicht terminal vor, wie es in anderen Proteinen der Fall ist, sondern sie ist Teil des Tetrasaccharids Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Fuc α 1-O-Ser/Thr. Es gibt eine zweite, untypische Form der O-Glycosylierung im Notch 1-Protein. Glucose ist β -glycosidisch mit Serin verknüpft und Teil eines Di- oder Trisaccharids. Die Konsensussequenz dafür ist Cys-X-Ser-X-Pro-Cys. Eine weitere untypische, für Hefen aber typische Proteinmodifikation, ist die O-Mannosylierung, bei der die Mannose α -glycosidisch mit Serin oder Threonin verknüpft ist. Das konnte bei Hefeproteinen aus der Zellwand, bei Pilzen und auch im Rattengehirn gezeigt werden (Leitao *et al.*, 2003; Chai *et al.*, 1999). Die O-Mannosylierung ist auch in einer begrenzten Anzahl von Säuger-Glycoproteinen des Gehirns, der Nerven und der Skelettmuskeln vorhanden (Endo, 2004). Das am besten bekannte O-mannosylierte Säuger-Glycoprotein ist das α -Dystroglycan. Über α -Dystroglycan-Laminin-Verbindungen wird das Cytoskelett von Muskelzellen mit der extrazellulären Matrix verbunden und dient somit der Strukturstabilisierung der Sarkolemma während der Kontraktionszyklen (Michele und Campbell, 2003). Das sialylierte O-mannosylierte Oligosaccharid des α -Dystroglycan (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-O-Ser/Thr) scheint essentiell für die Interaktionen mit Laminin und anderen extrazellulären Liganden zu sein (Michele und Campbell, 2003; Winder, 2001). Eine veränderte Glycosylierung des α -Dystroglycans, z. B. durch Mutation, und die dadurch gestörte Interaktion der Muskelzelle mit extrazellulären Matrixproteinen (Michele *et al.*, 2002), ist pathologischer Hintergrund einiger kongenitaler Muskeldystrophien, wie z. B. „Fukujama´s congenital muscular dystrophy“ (Hayashi *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 1998), „Muscle-Eye-Brain-Disease“ (Yoshida *et al.*, 2001; Michele *et al.*, 2002) oder „Walker-Warburg-Syndrom“ (Michele *et al.*, 2002; Beltran-Valero de Bernabe *et al.*, 2002).

1.4. Biologische Funktion von Sialinsäuren

Sialinsäuren tragen entscheidend zur Strukturvielfalt von Glycokonjugaten bei. Deshalb können zahlreiche biologische Funktionen mit Sialinsäuren in Verbindung gebracht werden. Durch ihre physikalischen Eigenschaften, wie ihre Ladung und ihre räumliche Ausdehnung, wirken Sialinsäuren direkt auf ihre Umgebung ein. Sialinsäuren können biologisch aktive Strukturen maskieren und so die Erkennung dieser Strukturen verhindern (Kelm und Schauer, 1997). Andererseits kann die Strukturvielfalt der gebundenen Sialinsäuren auch von den entsprechenden Bindungspartnern zur spezifischen Erkennung genutzt werden (Lasky, 1995). Die negative Ladung der Sialinsäuren sorgt für die Abstoßung der Zellen untereinander oder von Zellen und der extrazellulären Matrix (Shimamura *et al.*, 1994). Im Folgenden 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 für Entzündungsreaktionen, malignes Zellwachstum oder Metastasierung. Die terminale Position von Sialinsäuren in Glycokonjugaten und die daraus folgende hohe Exposition auf den Oberflächen von Zellen führt zur Beteiligung dieser Zucker an vielen Adhäsionsvorgängen. Oftmals können Zell-adhäsionsmoleküle ihre Bindungspartner nur an den spezifischen Sialylstrukturen erkennen. Für die Vermittlung dieser Adhäsionsvorgänge sind spezifische sialinsäurebindende Lektine wichtig. Die zwei bekanntesten Familien sind die Selektine und die Siglecs („sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins“). Die Sialinsäuren sind die Schlüsselkomponenten der Selektinliganden. Selektine sind eine Rezeptorfamilie, die auf Leukocyten, Endothelzellen und Thrombocyten exprimiert werden. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei Prozessen wie der angeborenen, unspezifischen Immunantwort und Blutgerinnung (Varki, 2007). Sie sind an der Interaktion von Leukocyten mit Endothelzellen beteiligt, indem sie das sogenannte „Rolling“, daß die Einwanderung (Migration) der Leukocyten in aktiviertes Gefäßendothel initiiert (Lasky, 1995), vermitteln. Die Selektine werden zum einen konstitutiv auf verschiedenen Typen von Leukocyten (L-Selektin) exprimiert. Zum anderen werden sie nicht konstitutiv auf Endothelzellen (E- und P-

Einleitung

Selektin) exprimiert (Abb. 8). Für die Expression ist eine transkriptionelle Induktion durch entzündungsfördernder Stimuli erforderlich (Varki, 2007). Thrombocyten haben in ihren Granula P-Selektin gespeichert (Johnston *et al.*, 1989), welches ebenso aufgrund von verschiedenen Stimulis auf der Zelloberfläche mobilisiert werden kann. Selektine binden calciumabhängig Tetrasaccharidstrukturen vom Typ Sialyl-Lewis^x (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal) oder Sialyl-Lewis^a (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal). Für eine optimierte Bindung von L- und P-Selektinen sind zusätzliche sulfatierte Sialyl-Lewis^x-Strukturen nötig (Varki, 2007). Die anschließende Invasion der Leukocyten in das Epithel wird von Integrinen und Molekülen der Immunglobulinsuperfamilie vermittelt. Die Intensität der Adhäsion wird dabei vom Sialinsäuregehalt der Bindungspartner moduliert, wobei geringer sialylierte Strukturen eine stärkere Adhäsion zur Folge haben (Takeda, 1987).

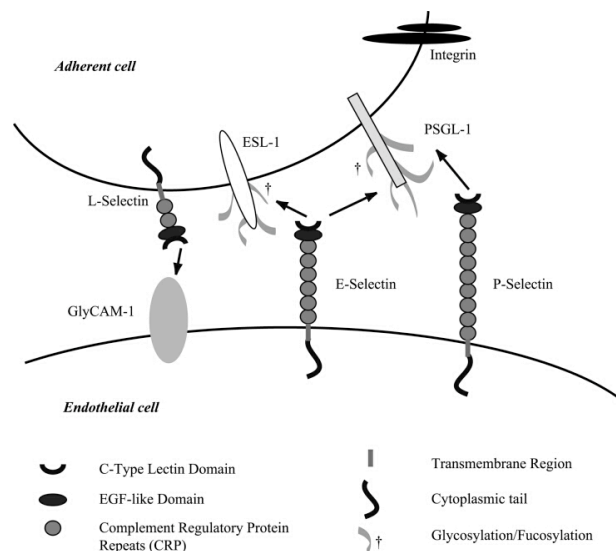


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Selektine und ihrer Liganden. Selektine sind eine Rezeptorfamilie, die auf Leukocyten, Endothelzellen und Thrombocyten exprimiert werden. Alle Selektine enthalten eine konservierte Kohlenhydraterkennungsregion.

Selektine spielen eine weniger prominente, aber wichtige Rolle bei der Metastasierung hämatogener Carcinome. Die Sialyl-Lewis^a- und Sialyl-Lewis^x-Strukturen wurden ursprünglich als Antigene beschrieben (Fukushima *et al.*, 1984). Coloncarcinom- und Melanomzellen exprimieren sie verstärkt auf ihren Zelloberflächen. Die erhöhte Invasivität dieser Tumorzellen ist auf eine gesteigerte selektinvermittelte Adhäsion der Krebszellen zurückzuführen (Kageshita *et al.*, 1995). Untersuchungen zeigen, daß das E-Selektin aktivierter Endothelzellen Carcinomzellen binden kann. Weiterhin imitieren zirkulierende Carcinom-Zellen mit sulfatierten, sialylierten Mucin-Strukturen natürliche Selektin-Liganden, die von

L- und P-Selektinen erkannt und gebunden werden (Borsig *et al.*, 2002; Laubli *et al.*, 2006). Dadurch kommt es zu einer Interaktion mit den Leukocyten bzw. Thrombocyten, die ein Überleben und Streuen dieser bösartigen Zellen nach ihrem Eintritt in den Blutstrom erleichtern. Die Zugabe von Heparin, einem L- und P-Selektin-Antagonist, zeigt eine merkliche Abnahme der Metastasierung in Mausmodellen (Zacharski *et al.*, 1998).

Siglecs sind die größte Familie sialinsäurebindender Lektine in Säugetieren. Sequenzanalysen und Strukturanalysen von Siglec-1 und Siglec-7 führten zu einer genauen Beschreibung der Bindung der Sialinsäuren an die terminale Bindungsdomäne der Siglecs (Zaccai *et al.*, 2007). Diese N-terminale Bindungsdomäne hat die Form eines β -Sandwichs, gebildet aus β -Faltblättern und ähnelt strukturell der variablen Domäne von Immunglobulinen (Abb. 9). Die Bindung erfolgt zum einen über die Carboxylgruppe der Sialinsäure, die eine Salzbrücke mit der Guanidingruppierung des Arginin-97 eingeht. Zum anderen gehen die C4-Hydroxylgruppe, sowie die Hydroxylgruppen der C7-C9-Seitenkette Wasserstoffbrückenbindungen mit der Carbonylgruppe des Serin-103 bzw. mit der Amid- und Carbonylgruppe des Leucin-107 ein; das Stickstoffatom der Sialinsäure geht eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Carbonylgruppe des Arginin-105 ein. Hydrophobe Interaktionen sind auch zu beobachten.

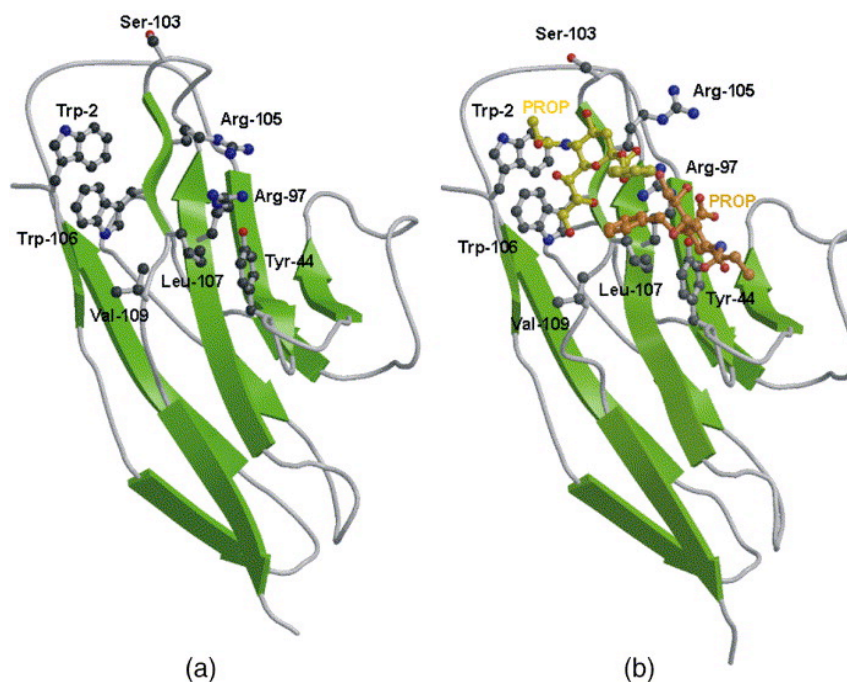


Abbildung 9: N-terminale Bindungsdomäne des Siglec-1 (Sialoadhäsin). (a) Siglec-1 im Komplex mit α 2-3-Sialyllactose. (b) Siglec-1 im Komplex mit 2'-Benzyl-Neu5NProp. Die β -Faltblätter sind grün dargestellt. Die an der Bindung der Sialinsäuren beteiligten Seitenketten des Proteins sind grau dargestellt (Zaccai *et al.*, 2007).

Einleitung

Die Siglecs weisen weiterhin eine unterschiedliche Anzahl (1-16) von Domänen, ähnlich der C2-Domäne von Immunglobulinen, einen Transmembranteil und einen cytoplasmatischen Schwanz auf (Abb.10). Man unterteilt die Siglecs in zwei evolutionär unterschiedliche Kategorien: Siglec-1 (Sialoadhäsine), Siglec-2 (CD22), Siglec-4 (Myelin-assoziiertes Glycoprotein; MAG) und das neu entdeckte Siglec-15, welche innerhalb der Säugetiere konserviert sind (Crocker *et al.*, 2007). Zu der anderen Gruppe gehören die CD33-verwandten Siglecs. Sie weisen im cytoplasmatischen Schwanz ein Tyrosin-basiertes Signalmotiv (ITIM-like) auf. Zu ihren Aufgaben gehören die Regulation von Immunantworten und das Erkennen von Sialinsäure-exprimierenden Pathogenen.

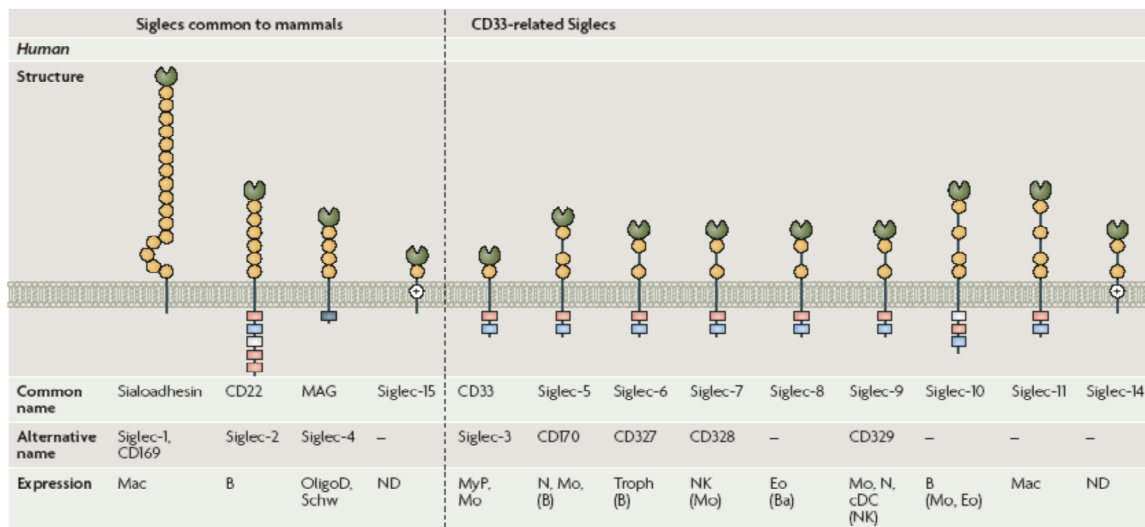


Abbildung 10: Proteinfamilie der humanen Siglecs. Die Siglecs (sialic acid-binding immunglobuline superfamily lectins) sind Typ-1 Membranproteine, die eine N-terminale Immunglobulin-domäne besitzen, über die die Erkennung der Sialinsäuren verläuft (nach: Crocker *et al.*, 2007).

Beim Menschen sind 13 verschiedene Siglecs gefunden worden (Abb. 10), wovon die meisten sich auf den Zellen, die für die angeborene und adaptive Immunantwort verantwortlich sind, befinden. Einige wenige, aber seit längerem bekannte Vertreter sind intensiver untersucht worden: Siglec-1/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). Eine Siglec1-defiziente Maus ist lebensfähig, fertil und zeigt keine Entwicklungsabnormitäten. In der Milz und in den Lymphknoten waren jedoch die cytotoxischen T-Zellen (CD8) leicht erhöht und die B-Lymphocyten (CD45R/B220) leicht erniedrigt (Oetke *et al.*, 2006). Siglec-2 ist ein negativer Modulator der Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors und an der homophilen Interaktion von

B-Zellen beteiligt (Poe *et al.*, 2004). Es binden ausschließlich α 2-6-gebundene Sialinsäuren (Tedder *et al.*, 1997). Siglec-4 (MAG), das am höchst konservierte Siglec, ist auf Neuroglia-Zellen zu finden und dient der Aufrechterhaltung der Struktur der Myelinscheide (Schachner und Bartsch, 2000). Die Interaktion von MAG mit Gangliosiden ist verantwortlich für die Inhibition des Axonenwachstums im adulten zentralen Nervensystem. Yang *et al.* (2006) beobachteten, daß es nach Verletzungen des ZNS zu Unterbrechungen der Inhibition kommen kann, woraus eine verstärkte Nervenregeneration resultiert.

Das Adhäsionsverhalten eines anderen Zelladhäsionsmoleküls, des NCAM, wird direkt durch Sialinsäuren moduliert. NCAM vermittelt homophile und heterophile Zell-Zell-Interaktionen. In embryonalen Zellen ist ein Großteil der NCAM-Moleküle polysialyliert. Aufgrund ihrer negativen Ladung und ihrer räumlichen Ausdehnung erlauben diese Polysialinsäureketten nur schwache Interaktionen zwischen den Zellen. Im Laufe der Ontogenese verkürzen sich die Polysialinsäureketten, so daß es zu einer verstärkten Adhäsion zwischen den Nervenzellen im adulten Organismus kommt (Brusés und Rutishauser, 2001).

Vor kurzem konnte auch gezeigt werden, daß Sialinsäuren bei der Interaktion zwischen Spermatozoen und der Zona pellucida auch hier eine wichtige Rolle spielen (Velásquez *et al.*, 2007). Die Zona pellucida besitzt einen sehr hohen Anteil an Glycoproteinen, bei denen die Oligosaccharidstrukturen terminale α 2-3 verknüpfte Sialinsäuren besitzen. Die Entfernung der Sialinsäuren mittels einer Neuraminidase bzw. die Blockierung der Liganden durch das Sialinsäure-spezifische Lektin MAA führten zu keiner Bindung der Spermatozoen an die Zona pellucida und damit zu keinem Eindringen in die Oocyten. Die Zugabe von Neuraminidase-Inhibitoren führte wiederum zu einer Zunahme der Bindung von Spermatozoen an die Zona pellucida und zu einem erhöhten Eindringen in die Oocyten. Velasquez *et al.* (2007) schlußfolgerten, daß es ein sialinsäurebindendes Protein in der Plasmamembran der Spermatozoen geben muß.

1.4.2. Sialinsäuren als Erkennungsdeterminanten für Pathogene

Sialinsäuren werden nicht nur von endogenen Lektinen eines multizellulären Organismus als Bindungspartner auf ihren Zielzellen genutzt, sie sind auch wesentliche Bestandteile hochspezifischer Bindungsrezeptoren für Pathogene, wie Viren, Bakterien und Parasiten, und Toxine. So besitzen Viren Hämagglutinine,

Einleitung

sialinsäurebindende Lektine. Das am besten untersuchte Protein dieser Klasse ist das Hämagglutinin des Influenza A-Virus. Über diesen Rezeptor erkennen Influenza A-Viren Neu5Ac- α 2-6-Gal-Strukturen (Keppler *et al.*, 1998), Influenza B-Viren erkennen dagegen Neu5Ac- α 2-3-Gal-Strukturen. Eine 9-O-Acetylierung der Neu5Ac verhindert die Bindung von Influenza A und B an ihre Zielzelle (Varki und Varki, 2007). Das Hämagglutinin der Influenza C-Viren erkennt nicht nur spezifisch Neu5,9Ac₂-Strukturen (Zimmer *et al.*, 1994), zusätzlich deacetyliert es die gebundene Sialinsäure des Wirtsorganismus durch eine 9-O-Acetyl-Esteraseaktivität (Herrler *et al.*, 1985).

Versuche mit biochemisch modifizierten *N*-Acetylneuraminsäuren zeigten, daß die Bindung von Viren an ihre Rezeptoren auf der Zelloberfläche beeinflusst werden kann. Das Hämagglutinin des Influenza A-Virus bindet spezifisch die *N*-Acetylgruppe der Sialinsäuren. Durch die modifizierten *N*-Acylseitenketten der Sialinsäuren konnte die Infektion von Zellen mit Influenza A-Viren stark reduziert werden (Keppler *et al.*, 1998). Analog dazu konnte auch die Infektion mit B-lymphotropen Papovaviren (Keppler *et al.*, 1995) und murinen Polyomaviren (Herrmann *et al.*, 1997) reduziert werden. Es scheint also bestimmte synthetische Sialinsäuren zu geben, die die Virus-Rezeptor-Interaktion, etwa durch verstärkte hydrophobe Wechselwirkungen, beeinflussen können. Die modifizierten *N*-Acylseitenketten der Zielzellen hatten auch zur Folge, daß sich die Permissivität der Zellen für den humanen Polyomavirus BK durch die Expression von *N*-Propanoylneuraminsäure und *N*-Butanoylneuraminsäure auf der Zelloberfläche erhöht. Dagegen inhibierten längere Seitenketten die Infektion (Keppler *et al.*, 1995).

Die Spezifität der Influenza-Viren für bestimmte Sialinsäuretypen hängt von der Sialylierung der Wirtszelle, z. B. Mensch, Huhn oder Schwein, ab (Suzuki *et al.*, 2000). Das für den Menschen pathogene Virus erkennt Neu5Ac α 2-6Gal-Reste wohingegen das für das Pferd pathogene Virus Neu5Ac α 2-3Gal-Reste erkennt. Bei räumlicher Nähe zwischen Mensch und Tier oder Tieren untereinander kann es zu Kreuzinfektionen von Influenza A-Viren der verschiedenen Wirtsorganismen kommen. Das Virus kann die Artengrenze zum Menschen somit dauerhaft überspringen, wie es bei dem aktuellen Vogelgrippe-Stamm Influenza A/H5N1 befürchtet wird. Durch horizontalen Gentransfer zwischen verschiedenen Virusspezies innerhalb einer Wirtszelle kann sich ein neuer Virusstamm entwickeln, der die Eigenschaften verschiedener Stämme vereint. Diese Viren sind dann an die

Sialylierung humaner Zellen angepasst und können so zu saisonalen Epidemien führen (Ito *et al.*, 1998). Der Vogelgrippe-Stamm ist ein hoch pathogener, aviärer Subtyp des Influenza A-Virus (A/H5N1). Er gehört zu der Familie der Orthomyxoviren und damit zu den membranumhüllten Einzel(-)-Strang-RNA-Viren [ss(-)RNA]. Das Virusgenom dieses Subtyps codiert, wie alle anderen Influenzaviren auch, für zehn virale Proteine, darunter Hämagglutinin (H) und Neuraminidase (N), sowie Matrix (M)-, Polymerase (P)- und Nichtstrukturproteine (NS). Es wurden bis heute 16 H- und 9 N- Isoformen nachgewiesen. Im Falle des Virus A/H5N1, werden die fünfte Isoform des Hämagglutinins (H5) und die erste Isoform der Neuraminidase (N1) auf der Viruszelloberfläche exprimiert. Die Neuraminidase spaltet die endständigen Neu5Ac-Reste von den Oligosaccharidketten der Glycoproteine ab, was die Freisetzung von Tochterviren aus den infizierten Zellen bewirkt.

Obenauer *et al.* (2006) konnten bei einer im größeren Maßstab angelegten Sequenzanalyse aviärer Influenzaviren zeigen, daß das C-terminale, variable Ende des Nichtstrukturproteins 1 (NS1) über die Schwere eines Infektionsverlaufes entscheidet. Im C-Terminus fanden Obenauer *et al.* (2006) den bis dahin unerkannten PDZ-Domänen-Ligand (PL). Beim Menschen bindet dieser Ligand besonders effektiv die PDZ-Domäne, eine Proteininteraktionsdomäne, die sequenzspezifisch an kurze C-terminale Peptide bindet. In infizierten Zellen kommt es dann wegen der Interaktion von PL und PDZ zu einer veränderten Signaltransduktion, die zu einer Überstimulation des Immunsystems führt und damit zu einer exzessiven Sekretion von Cytokinen, speziell Interleukin-6 (Chan *et al.*, 2005). Dies bewirkt eine Zerstörung des Lungengewebes, einen schweren toxischen Schock und letztendlich Multiorganversagen. Ein Impfstoff gegen Influenza A/H5N1 ist derzeit noch in der Entwicklung. In der Frühphase der Infektion können die wirkungsvollen Neuraminidase-Inhibitoren Relenza® und Tamiflu® eingesetzt werden.

Die sialinsäurebindenden Lektine von pathogenen Bakterien werden Adhäsine genannt und vermitteln die Bindung des Mikroorganismus an die Wirtszelle (Ofek und Sharon, 1990). Die Expression der Adhäsine erfolgt oft stammspezifisch und reguliert so die Infektion definierter Gewebe. *Helicobacter pylori* besitzt zwei Adhäsine, die selektiv an Ganglioside oder Glycoproteine binden (Miller-Podraza *et al.*, 1997). Das Adhäsine von *E. coli* K99 bindet spezifisch Neu5Gc, die 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

Einleitung

Sialinsäuren binden. So binden die Toxine der Cholera-, Botulinus- und Tetanuserreger an spezifische sialylierte Ganglioside ihrer Wirtszellen und werden anschließend durch rezeptorvermittelte Endocytose aufgenommen (Richards *et al.*, 1979; Schengrund *et al.*, 1991).

1.4.3. Sialinsäuren als Masken antigener Determinanten

Sialinsäuren können antigene Determinanten maskieren und so die Erkennung durch das Immunsystem verhindern. *Trypanosoma cruzi*, der Erreger der Chagaskrankheit, bindet an Sialinsäuren von Glycokonjugaten auf der Oberfläche der Wirtszellen. Die Transsialidase des Erregers, die die Sialidase- und Sialyltransferase-Aktivität in sich vereinigt, transferiert anschließend 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 (Schauer, 1985). Wird die schützende Zona pellucida von Blastocysten entfernt, so werden sie innerhalb kürzester Zeit durch das Komplementsystem erkannt und lysiert. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) weisen nur eine schwache Sialylierung auf. Nach Differenzierung erhöht sich der Sialinsäuregehalt und sie werden unempfindlich gegenüber der Komplement-vermittelten Lyse (Kircheis *et al.*, 1996). Sialinsäuren können aber auch selbst immunologische Reaktionen auslösen, wie einige Blutgruppenantigene, die durch spezifische Sialylstrukturen gekennzeichnet sind und nach Sialidasebehandlung ihre Antigenität verlieren (Pilatte *et al.*, 1993).

1.4.4. Einfluß von Sialinsäuren auf Struktur und Funktion von Glycokonjugaten

Die Präsenz von Sialinsäuren ist wichtig für die biologische Funktion einiger Glycoproteine. So führt die Desialylierung des Somatostatinrezeptors zu einer Konformationsänderung und damit zu einer deutlich schlechteren Ligandenbindung (Rens-Domiano und Reisine, 1991). Die Asialoform des Nukleoporins p62, das den aktiven Proteintransport vom Cytosol in den Zellkern unterstützt, ist weniger aktiv als die Sialoform (Emig *et al.*, 1995). Eine ähnliche Beobachtung wurde für das Hormon Erythropoietin gemacht (Wasley *et al.*, 1991). Erythropoietin ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für die Bildung von Erythrocyten während der Hämatopoese. Hierbei beruht die verringerte biologische Aktivität des Asialoproteins allerdings auf

einer reduzierten Halblebenszeit im Blut (Egrie und Brown, 2001). Biotechnologisch hergestelltes Erythropoietin wird auch als Therapeutikum verwendet. Die meisten biotechnologisch hergestellten rekombinanten Proteine sind Glycoproteine, unter denen Erythropoietin eine herausragende Stellung einnimmt. Es wird zum einen bei Patienten eingesetzt, bei denen die Blutbildung oft tumorbedingt gestört ist. Zum anderen ist bei Patienten, die infolge von Nierenversagen auf die Dialyse angewiesen sind, häufig auch die Bildung von Erythropoietin gestört, so daß sie gegen die daraus resultierende Blutarmut behandelt werden müssen. Aggressive Chemotherapiezyklen sind meist ebenfalls mit der Hemmung der Blutzellbildung verknüpft und bedürfen der Erythropoietin-Therapie. Daneben erwarb sich Erythropoietin aufgrund zahlreicher Dopingskandale insbesondere im Radsport den zweifelhaften Ruf als „Radfahrerdroge“.

In vielen Fällen schützen Sialinsäuren Proteine vor dem Abbau, vermutlich durch sterische Hinderung proteolytischer Aktivitäten. Der Acetylcholinrezeptor mit Sialinsäuren als Degradationsschutz liefert eines der am besten untersuchten Beispiele (Olden *et al.*, 1982). Die Zirkulationszeit von Blutzellen wird ebenfalls durch deren Gehalt an terminalen Sialinsäuren reguliert. Erythrocyten und Thrombocyten verlieren bei der Alterung ihre sialinsäurehaltigen Strukturen und werden dann von Makrophagen erkannt und phagozytiert (Schlepper-Schäfer *et al.*, 1980; Kluge *et al.*, 1992). Auf welche Weise die Zellen ihre sialinsäurehaltigen Strukturen verlieren, ist bis heute nicht geklärt. Ähnliches nimmt man auch bei Serumglycoproteinen und Antigen-Antikörper-Komplexen an, die nach Verlust ihrer terminalen Sialinsäuren durch den Asialoglycoproteinrezeptor der Leber erkannt, endocytiert und abgebaut werden (Ashwell und Harford, 1982). Neuere Arbeiten deuten aber darauf hin, daß der Asialoglycoproteinrezeptor eher ein Sialoglycoproteinrezeptor ist. Park *et al.* (2005) konnten zeigen, daß BSA, welches eine endständige α 2-6-verknüpfte Sialinsäure besitzt, vom Rezeptor relativ schnell gebunden und abgebaut wird. Weiterhin zeigten sie, daß der Rezeptor Oligosaccharide mit der terminalen Sequenz Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc bindet, wohingegen Oligosaccharide mit der terminalen Sequenz Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc nicht gebunden werden. Daraus kann geschlossen werden, daß Glycoproteine mit terminalen Neu5Ac α 2-6GalNAc- bzw. Neu5Ac α 2-6Gal-Resten die endogenen Liganden des Sialoglycoproteinrezeptor sind. Der Rezeptor reguliert auf diesem Wege die Konzentration an Serumglycoproteinen.

Einleitung

Das Gangliosid G_{M3} kann durch seine Sialinsäure direkt die Proliferation von Zellen beeinflussen. G_{M3} hemmt die Tyrosinphosphorylierung des Epidermal-Growth-Factor-Rezeptors und dadurch das Zellwachstum (Bremer *et al.*, 1986). Durch Deacetylierung der Sialinsäure des G_{M3} wird diese Hemmung aufgehoben (Hanai *et al.*, 1988). Gleichzeitig wird zusätzlich die Serinphosphorylierung des Epidermal-Growth-Factor-Rezeptors gefördert. Deshalb wird das G_{M3} mit deacetylierter Sialinsäure als Second-Messenger bei der Stimulierung des Zellwachstums diskutiert (Zhou *et al.*, 1994).

1.4.5. Sialinsäuren und Carcinome

Zahlreiche Tumore besitzen eine erhöhte Sialinsäurekonzentration auf ihren Oberflächen, was mit einer erhöhten Malignität in Verbindung gebracht wird (Hakomori, 1989; Bhavanandan, 1991). 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). Zellen des Wilms-Tumors exprimieren sogar Polysialinsäure auf ihren Zelloberflächen (Roth *et al.*, 1988). Dabei ergibt sich ein interessanter therapeutischer Ansatz. Ein generierter Antikörper gegen Poly-Neu5Prop erkennt nach ManNProp-Behandlung Polysialinsäure-exprimierende Zellen (Liu *et al.*, 2000; Pon *et al.*, 2007). Auf diese Weise könnten gezielt an den Antikörper gekoppelte Anti-Tumor-Agentien zu den Tumorzellen gebracht werden. Sialinsäuren, die an der *N*-Acylseitenkette eine Levulinoylgruppe tragen, können chemoselektiv ebenfalls mit Anti-Tumor-Agentien gekoppelt werden (Lemieux und Bertozzi, 2001). Zwei Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode sind die Bindung von Kontrastmitteln an Zielzellen (Lemieux und Bertozzi, 1999) und die Bindung Adenovirus-spezifischer Antikörper auf Zelloberflächen zum verbesserten Gentransfer (Lee *et al.*, 1999).

Viele Krebszellen maskieren ihre antigenen Determinanten mit Sialinsäuren, ähnlich wie zahlreiche Pathogene, und entziehen sich so der immunologischen Überwachung (Dennis und Laferte, 1985). Erst nach Entfernung der Sialinsäuren durch Sialidasebehandlung können sie von natürlichen Killerzellen erkannt und lysiert werden (Ahrens und Ankel, 1987). Auch bei Gangliosiden können maligne Transformationen den Gehalt der gebundenen Sialinsäuren quantitativ und qualitativ stark verändern. Die Ganglioside G_{D2} und G_{D3} in Melanomen enthalten deutlich höhere Anteile an Neu5,9Ac₂ (Thurin *et al.*, 1985; Sjoberg *et al.*, 1992). In Darm- und

Lungencarcinomen ist vermehrt Neu5Gc im Gangliosid G_{M3} vorhanden (Higashi, 1990). Bestimmte Typen von Gangliosiden, die von Tumorzellen exprimiert werden, insbesondere solche, die viel Sialinsäuren tragen, haben einen hemmenden Effekt auf die Proliferation von Zellen der Immunantwort. Dieser Aspekt ist hinsichtlich der immunsuppressiven Wirkung von Krebszellen bemerkenswert (Marcus, 1984). Auf der anderen Seite führt, wie bereits beschrieben, eine Deacetylierung von Sialinsäuren des G_{M3} zu einer Proliferationssteigerung (Hanai *et al.*, 1988).

In vielen Tumorarten konnte ein erhöhter Gesamtsialinsäuregehalt und/oder lipidgebundener Sialinsäuregehalt nachgewiesen werden (Sillanauke *et al.*, 1999). Die differentielle Sialylierung wird von der Tumordiagnostik genutzt, indem sie tumorspezifische Sialylstrukturen als Marker verwendet (Bhavanandan, 1991; Dreyfuss *et al.*, 1992; David *et al.*, 1993; Yamashita *et al.*, 1995). Beispielsweise ist Neu5,9Ac₂ ein Tumormarker für Hautkrebs (Fahr und Schauer, 2001). Darüber hinaus wird auch der Serumspiegel von Sialinsäuren zur Verlaufskontrolle während der Tumorprogression genutzt (Fischer und Egg, 1990). Auch verschiedene Glycoproteine des Serums, deren Expression bei bestimmten Tumoren erhöht ist, sind diagnostisch wertvoll.

1.5. Aminosuckerstoffwechsel

1.5.1. Biosynthese von UDP-GlcNAc

Für die Synthese von Glykokonjugaten ist ein intakter Aminosuckerstoffwechsel notwendig. Eine zentrale Rolle fällt dabei dem UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) zu. UDP-GlcNAc ist nicht nur wichtig für die Synthese der Oligosaccharidketten von N-Glycanen, O-Glycanen und Glycolipiden, sondern wird auch für die Herstellung von Proteoglycanen und GPI-Ankern verwendet. Auch für die Modifikation von cytosolischen Proteinen und Kernproteinen mit O-GlcNAc, einer regulatorischen Modifikation ähnlich der Phosphorylierung, wird UDP-GlcNAc als Donor benutzt (Wells und Hart, 2003). Aus UDP-GlcNAc wird außerdem UDP-GalNAc gebildet, ein weiterer Nucleotidzucker für die Synthese von Glykokonjugaten. Schließlich ist UDP-GlcNAc essentielles Ausgangssubstrat für die Biosynthese von Sialinsäuren.

Die *de novo*-Biosynthese von UDP-GlcNAc zweigt am Fructose-6-Phosphat von der Glycolyse ab. Aus Fructose-6-Phosphat wird in vier enzymatischen Schritten UDP-GlcNAc gebildet (Abb. 11). Das Schlüsselenzym der UDP-GlcNAc-Biosynthese ist

Einleitung

die Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Aminotransferase (EC 2.6.1.16). Sie katalysiert die Aminierung von Fructose-6-Phosphat am C-2 mittels Glutamin und leitet die Abzweigung des Aminozuckerstoffwechsels von der Glycolyse ein. Der zweite Schritt wird durch die Glucosamin-6-Phosphat-N-Acetyltransferase (EC 2.3.1.4) katalysiert. Sie acetyliert Glucosamin-6-Phosphat an der Aminogruppe durch Acetyl-CoA. Anschließend wird das entstandene GlcNAc-6-Phosphat reversibel von der GlcNAc-Phosphat-Mutase (EC 2.7.5.2) in GlcNAc-1-Phosphat umgewandelt. Der letzte Schritt auf dem Weg zum UDP-GlcNAc ist die Kondensation von GlcNAc-1-Phosphat und UTP unter Abspaltung von Pyrophosphat. Diese Reaktion wird durch die UDP-GlcNAc-Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.23) katalysiert.

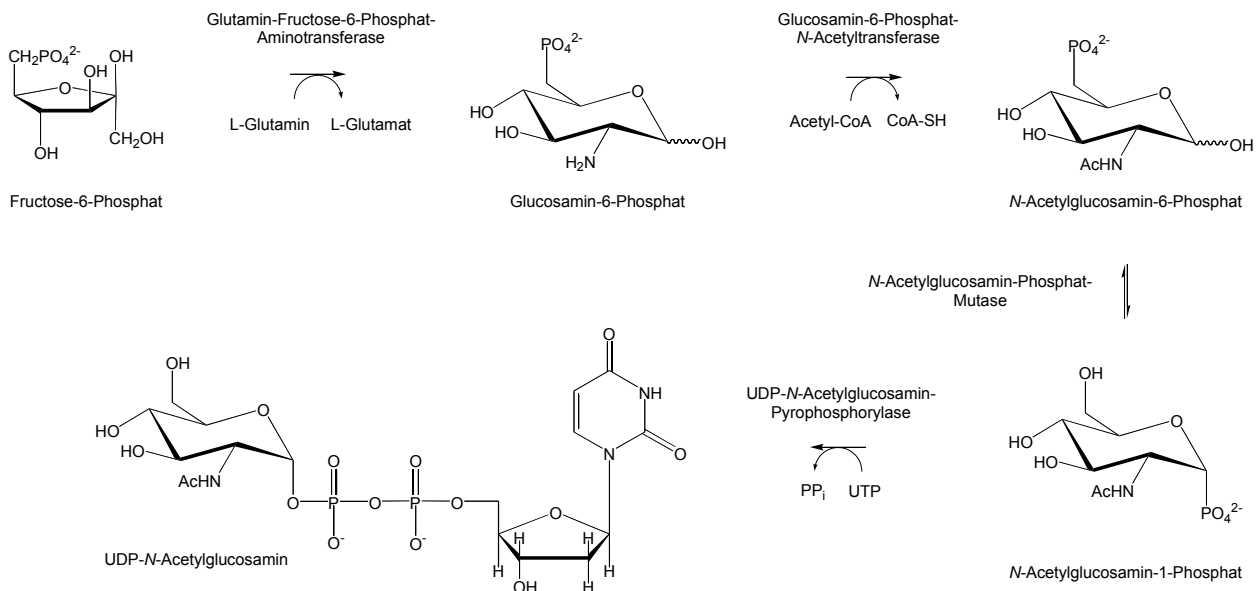


Abbildung 11: Biosynthese von UDP-GlcNAc in Säugetierzellen. Fructose-6-Phosphat ist der Ausgangspunkt für die Biosynthese der Aminozucker Glucosamin, GlcNAc, ManNAc und Neu5Ac.

1.5.2. Biosynthese von Sialinsäuren

CMP-Neu5Ac ist das Vorläufermolekül für die Biosynthese aller Sialinsäuren. Es wird in fünf enzymatischen Schritten aus UDP-GlcNAc gebildet (Abb. 12). Die ersten beiden Schritte der Sialinsäurebiosynthese, die irreversible Epimerisierung in C-2-Position von UDP-GlcNAc zu ManNAc und die anschließende Phosphorylierung in C-6-Position, werden von dem bifunktionellen Enzym UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase, (GNE, EC 5.1.3.14/2.7.1.60) katalysiert (Hinderlich *et al.*, 1997; Stäsche *et al.*, 1997). Das entstandene ManNAc-6-Phosphat reagiert anschließend in einer Aldolkondensation mit dem Enolation, das aus Phosphoenolpyruvat nach

Phosphatabspaltung entsteht, 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 die erst kürzlich identifizierte Neu5Ac-9-Phosphat-Phosphatase (E.C. 3.1.3.29) abgespalten werden (Maliekal *et al.*, 2006). Im letzten Schritt der Sialinsäurebiosynthese wird über die CMP-Neu5Ac-Synthetase (CSAS; E.C. 2.7.7.43) Neu5Ac unter Abspaltung von Pyrophosphat durch CTP aktiviert, wobei CMP-Neu5Ac entsteht. Im Gegensatz zu den anderen Enzymen der *de novo*-Biosynthese von CMP-Neu5Ac, die alle im Cytosol zu finden sind, ist die CSAS im Zellkern lokalisiert (Kean, 1969; Kean, 1970). Bei *Drosophila melanogaster* wiederum ist die CSAS im Golgi-Kompartiment lokalisiert. Wird die N-terminale Signalsequenz des humanen Proteins auf das *Drosophila*-Protein übertragen, so wird die chimäre CSAS in den Kern transportiert, was mit einem totalen Verlust der Enzymaktivität einhergeht (Viswanathan *et al.*, 2006). Die Lokalisierung der CSAS-Orthologen in verschiedenen intrazellulären Kompartimenten innerhalb der Eukaryonten ist eines der wenigen Beispiele für Protein-Targeting und macht die divergente Evolution des Sialinsäurestoffwechsels deutlich. Obwohl die Kernlokalisierung der humanen CSAS lange bekannt ist, ist die Funktion von CMP-Neu5Ac im Kern noch unklar.

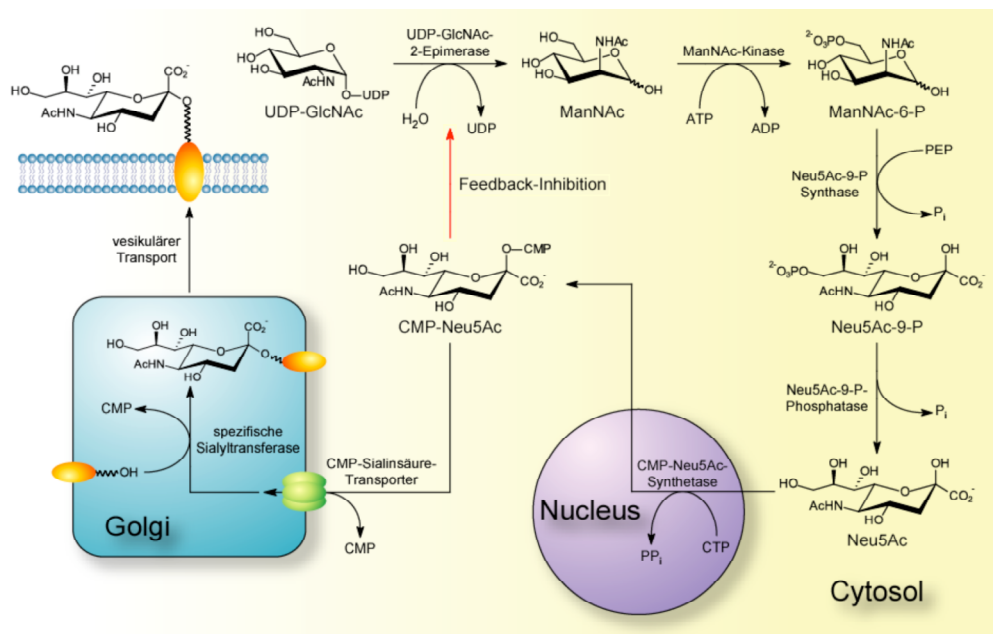


Abbildung 12: Sialinsäurebiosynthese in Säugetierzellen.

Nach der Aktivierung der Neu5Ac im Zellkern wird CMP-Neu5Ac durch die Kernporen hindurch in das Cytosol freigesetzt. Durch einen Antiport von CMP und

Einleitung

CMP-Neu5Ac gelangt der Nucleotidzucker in den Golgi-Apparat (Eckardt *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 Glycolipiden übertragen (Harduin-Lepers *et al.*, 1995). Die fertig prozessierten Proteine und Lipide werden anschließend von speziellen Transfervesikeln zu ihren Bestimmungsorten gebracht.

1.6. Das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese

Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (GNE) ist ein bifunktionelles Enzym und katalysiert die ersten beiden Schritte der Sialinsäurebiosynthese. Die Enzymaktivitäten wurden früher unabhängig voneinander beschrieben. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase wurde von Cardini und Leloir (1957) entdeckt, die von ihr katalysierte Reaktion von Comb und Roseman (1958) erstmals korrekt beschrieben. Die ManNAc-Kinase wurde unabhängig von Gosh und Roseman (1961) bzw. Warren und Felsenfeld (1961) nachgewiesen. Später konnte gezeigt werden, daß sowohl die subzelluläre Lokalisation als auch die Gewebeverteilung der beiden Enzyme identisch ist (Van Rinsum *et al.*, 1983). Die Expression der beiden Enzymaktivitäten auf einem Polypeptid und die damit verbundene Bifunktionalität konnte 1997 in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (Hinderlich *et al.*, 1997; Stäsche *et al.*, 1997).

Trotz ihrer Bedeutung für den Stoffwechsel der Sialinsäuren konnten die UDP-GlcNAc-2-Epimerase (Spivak und Roseman, 1966; Sommar und Ellis, 1972a; Kikuchi und Tsuiki, 1973) bzw. ManNAc-Kinase (Kundig *et al.*, 1966) lange Zeit aus verschiedenen Quellen nur partiell angereichert werden und verhielten sich instabil. Erst 1997 gelang es, eine stabile und homogene Fraktion aus Rattenleber zu gewinnen. Dieses Enzym wurde sowohl als Hexamer als auch als Dimer aus 75 kDa-Untereinheiten mit unterschiedlichen Enzymaktivitäten beschrieben (Hinderlich *et al.*, 1997). Kornfeld *et al.* (1964) zeigten, daß dieses Enzym außerdem einer strengen Feedback-Inhibierung durch CMP-Neu5Ac unterliegt (Abb. 12). Bei einer CMP-Neu5Ac-Konzentration von 60 µM zeigt das Enzym keine Aktivität mehr. Zusätzlich wird das Enzym durch die Proteinkinase C phosphoryliert, was zu einem Anstieg der Epimerase-Aktivität 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. Damit kommt

der UDP-GlcNAc-2-Epimerase die zentrale regulatorische Rolle für die Sialinsäure-Biosynthese zu. Die Aktivität der ManNAc-Kinase unterliegt keinen besonderen Regulationsmechanismen.

Die Expression der GNE 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 Sekretion von Serumglycoproteinen im Hepatomgewebe und damit einen geringeren Bedarf an Neu5Ac zurückzuführen. Die GNE-Expression wird ebenso ontogenetisch reguliert. Während fötale Leber von Ratte (Kikuchi *et al.*, 1971) und Meerschweinchen (Gal *et al.*, 1997) eine relativ geringe Expression des Proteins aufweist, steigt diese kontinuierlich während der frühen Entwicklungsphase, erreicht etwa zwei Wochen nach der Geburt einen Höhepunkt und pendelt sich dann auf ein etwas niedrigeres Niveau ein. Die essentielle Stellung dieses bifunktionellen Enzyms für die Ontogenese wird durch das frühe Absterben GNE-defizienter Mäuseembryonen unterstrichen (Schwarzkopf *et al.*, 2002). Wird die GNE durch gezielte Mutagenese in der Maus ausgeschaltet, sterben die Embryonen spätestens am Tag 8,5 der Embryonalentwicklung. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Sialinsäuren für die Embryonalentwicklung essentiell sind. Die Expression der GNE wird wahrscheinlich auch epigenetisch durch DNA-Methylierung reguliert (Oetke *et al.*, 2003; Giordanengo *et al.*, 2004).

Die zentrale Rolle der GNE 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 Siglec-2, die Interaktion des P-Selektins mit seinen Liganden (Keppler *et al.*, 1999) oder auch die Reduktion der Zell-Matrix-Interaktion (Suzuki *et al.*, 2002).

Die GNE wurde bisher aus Ratte (Stäsche *et al.*, 1997), Maus (Horstkorte *et al.*, 1999) und Mensch (Lucka *et al.*, 1999) kloniert. 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

Einleitung

Domäne zu beeinflussen (Effertz *et al.*, 1999). Um die Funktion der GNE näher zu untersuchen, wurden in weiteren Arbeiten Deletionsmutanten generiert (Blume *et al.*, 2004a). Die N-terminale Deletion von lediglich 39 Aminosäuren führte zu einem kompletten Verlust der Epimeraseaktivität. Deletionen am C-terminalen Ende resultierten, abhängig von der Größe der Deletion, in einer Reduktion oder ebenso zu einem Verlust der Kinaseaktivität. Die Ergebnisse zeigten, daß zwischen Struktur des bifunktionalen Enzyms, der Quartärstruktur und der Epimerase- bzw. Kinaseaktivität ein sehr enger Zusammenhang besteht.

Der Reaktionsmechanismus der UDP-GlcNAc-2-Epimerase ist relativ gut untersucht (Tanner, 2002) und beginnt mit der E1-ähnlichen Reaktion von UDP-GlcNAc zum intermediären Zwischenprodukt 2-Acetamidoglucal. Dies erfolgt in einer *anti*-Eliminierung von UDP und des nicht-aziden Protons am C-2. Die Elimination des Protons am C-2 wird durch eine Base stark begünstigt. Die Existenz von 2-Acetamidoglucal wurde bereits 1972 postuliert und von Sommar und Ellis (1972) im Urin von Sialurie-Patienten nachgewiesen. Im zweiten Schritt wird das Intermediat 2-Acetamidoglucal durch säurekatalysierte *syn*-Addition von Wasser zu ManNAc umgesetzt. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase benötigt im Gegensatz zu anderen Epimerasen, z. B. der UDP-GalNAc-4-Epimerase, für ihre katalytische Aktivität keinen Cofaktor. Kürzlich konnte durch Sättigungstransferdifferenz-NMR-Untersuchungen das Bindungsepitop des Substrates UDP-GlcNAc identifiziert werden (Blume *et al.*, 2004b). Der UDP-Teil liegt näher an der Proteinoberfläche als der Aminozucker. Desweiteren bindet das Produkt der Epimerase-Reaktion, UDP, besser an die GNE als das Substrat UDP-GlcNAc, was auf eine kompetitive Inhibition der Enzymaktivität hindeutet.

Der Reaktionsmechanismus der ManNAc-Kinase ist bislang nicht untersucht worden, jedoch geht man von einem den homologen Zuckerkinasen ähnlichen Mechanismus aus. Die Übertragung des γ -Phosphats vom ATP auf die Hydroxylgruppe am C-6 des Zuckers findet über einen trigonal-bipyramidalen Zwischenzustand statt und verursacht dadurch eine Inversion der Konfiguration am Phosphat (Lowe und Potter, 1981; Pollard-Knight *et al.*, 1982).

1.7. GNE-Isoformen

Unter Isoformen oder Isotypen versteht man, daß in denselben oder auch verschiedenen Geweben unterschiedliche Formen desselben Proteins bzw. Enzyms

existieren. Sie katalysieren dieselbe Reaktion, unterscheiden sich aber in ihrer Aminosäuresequenz, ihrer unterschiedlichen Aktivität und ihrer Sensitivität gegenüber Effektoren. Eine ganze Reihe von Enzymen liegt in einer Vielzahl von Isoformen vor, wobei die Gründe dafür weniger klar sind. Isoformen eines einzigen Enzyms können nachhaltig den Stoffwechselcharakter von Zellen prägen und zu ihrer Vielfalt und funktionellen Spezialisierung beitragen. Isoformen können unterschiedlichen Ursprungs sein. Sie können zum einen von unterschiedlichen Genen bzw. Chromosomen codiert sein. Zu nennen wäre hier das Beispiel der Hexokinasen. Die Hexokinasen kommen in vier Isoformen vor, wobei die Hexokinasen I - III gewebsspezifisch und die Hexokinase IV, auch bekannt als Glucokinase, spezifisch in Hepatocyten und den β -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas exprimiert werden. Oftmals sind aber auch RNA-Spleißvarianten für Isoformen verantwortlich. Für die Hexokinase I gibt es fünf verschiedene RNA-Spleißvarianten (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucore&id=15991828>).

Das ursprünglich beschriebene GNE-Gen besteht aus 13 Exons. Watts *et al.* (2003) identifizierten ein weiteres 5'-Exon (89 bp), daß sie Exon A1 nannten. Bei Untersuchungen von humanen GNE-Transkripten konnten sie vier verschiedene Spleißvarianten entdecken (Abb. 13). Spleißvariante I setzt sich aus den Exons 1-13 zusammen, während bei Spleißvariante IV das Exon 1 fehlt. Bei den Spleißvarianten II und III ist das Exon A1 mit dem Exon 2 bzw. dem Exon 3 fusioniert. Kürzlich wurde in verschiedenen Geweben (Skelettmuskel, Plazenta, Gehirn und Herzmuskel) die Expression einer weiteren Spleißvariante entdeckt, bei der das Exon 4 fehlt (Tomimitsu *et al.*, 2004).

Einleitung

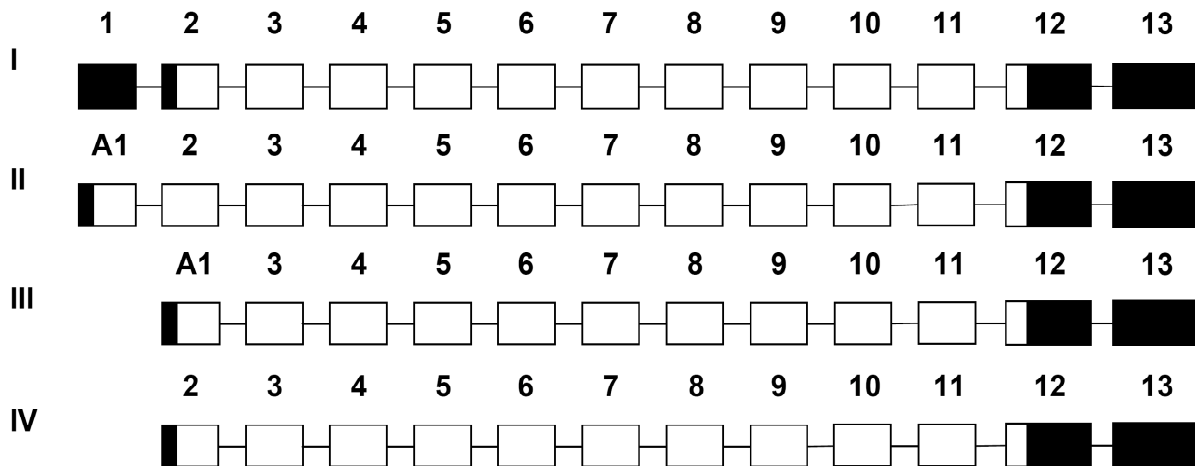


Abbildung 13: Schematische Darstellung der humanen GNE-Exonstruktur der GNE-Spleißvarianten nach Watts *et al.* (2003). Weiße Boxen stellen die codierenden Regionen dar, schwarze Boxen die nicht-codierenden Regionen.

1.8. Pathobiochemie der GNE

1.8.1. Sialurie

Sialurie ist eine sehr seltene Stoffwechselkrankheit, die durch große Mengen (mehrere Gramm pro Tag) freier Neu5Ac im Urin charakterisiert ist. Die Patienten leiden an Entwicklungsstörungen und Lebervergrößerung (Ferreira *et al.*, 1999; Enns *et al.*, 2001). Die molekulare Ursache der Sialurie ist ein Defekt der Feedback-Inhibition der UDP-GlcNAc-2-Epimerase durch CMP-Neu5Ac mit der Folge einer unkontrollierten Produktion von Neu5Ac (Weiss *et al.*, 1989; Seppala *et al.*, 1991). Die bisher untersuchten Patienten weisen Punktmutationen von Arginin-263 bzw. Arginin-266 (Abb. 16) in der GNE auf (Seppala *et al.*, 1999). Die Mutationen treten heterozygot auf, der Gendefekt ist daher dominant (Leroy *et al.*, 2001). Neben den Mutationen in den Sialurie-Patienten fanden Yarema *et al.* (2001) Punktmutationen weiterer sieben Aminosäuren der GNE in Subklonen von Jurkat-Zellen, die ebenfalls den Sialurie-Phänotyp aufwiesen. Diese Mutationen legen die Lokalisation der CMP-Neu5Ac-Bindungsstelle zwischen den Aminosäuren 249 und 275 nahe.

1.8.2. Erbliche Einschlußkörperchenmyopathie

Zwischen der Skelettmuskulatur, dem Bindegewebe und dem Nervensystem bestehen enge morphologische und funktionelle Beziehungen. Krankheiten, die primär die Skelettmuskulatur befallen, werden als Muskeldystrophien oder Myopathien bezeichnet. Die Erregungsübertragung von einer motorischen

Nervenfaser auf die quergestreifte Skelettmuskulatur erfolgt an einer besonders differenzierten Kontaktstelle, der motorischen Endplatte. Muskelerkrankungen, die durch eine Schädigung der den Muskel versorgenden motorischen Nervenzellen entstehen, werden als neurogene oder neuromuskuläre Muskelatrophien bezeichnet. Ihre Klassifikation wird nach genetischen, klinischen und morphologischen Kriterien durchgeführt. Myopathien sind zum einen genetisch determinierte (hereditäre), progressiv verlaufende, zum anderen erworbene Systemerkrankungen der Muskulatur (Abb. 14). Die erworbenen Myopathien können verschiedene Ursachen haben. Entzündliche Myopathien (Myositiden) können autoimmunologische (immunogene) Gründe haben. Klinisch-morphologisch zählt man zu den Autoimmun-Myositiden die Polymyositis, Dermatomyositis und die Einschlusskörperchenmyositis (IBM). Myositiden können auch erblich bedingt sein.

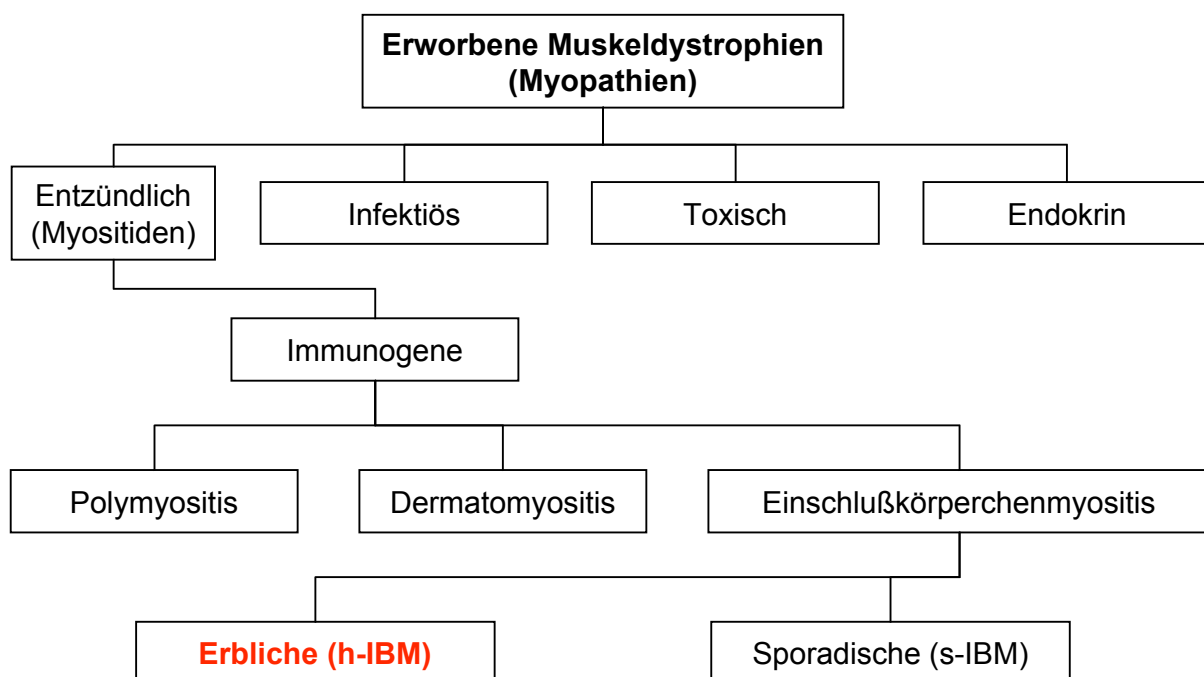


Abbildung 14: Klassifikation der wichtigsten Muskelkrankheiten. Die erbliche Einschlusskörperchenmyopathie (h-IBM) gehört zu den immunogenen Myositiden (nach: Classen, M., Diehl, V., Kochsiek, K.; Innere Medizin; 1994; 3. Auflage).

Ausgehend von der Einschlusskörperchenmyositis, die erstmals 1971 erwähnt (Yunis und Samaha) und 1978 als Krankheitsbild beschrieben wurde (Carpenter *et al.*), unterscheidet man eine erbliche (hereditäre Inclusion-Body-Myopathie, h-IBM) und eine sporadische (s-IBM) Krankheitsform, die aufgrund einiger gemeinsamer histologischer Merkmale unter einem Krankheitsbegriff zusammengefaßt werden. Die h-IBM faßt eine heterogene Gruppe vakuolärer Myopathien zusammen, die rezessiv

Einleitung

oder dominant vererbt werden. Leitsymptom der h-IBM-Patienten ist eine langsam fortschreitende zunächst distale, dann auch proximale Muskelschwäche, die in asymmetrischer Anordnung auftritt. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung breiten sich atrophische Muskelveränderungen und damit die Muskelschwäche auf Arme und Beine aus (Argov und Yarom, 1984). Charakteristischerweise ist der M. quadriceps auch im fortgeschrittenem Krankheitsstadium zumeist von diesen makroskopischen Veränderungen ausgenommen. Im Gegensatz zu anderen Myopathien treten bei h-IBM typischerweise keine Hautveränderungen, Myokardschädigungen oder Myalgien auf (Müller-Felber, 2003). Patienten klagen vielmehr über ein schmerzloses Schwächegefühl der Skelettmuskulatur. Histologisches Merkmal der Einschlusskörperchenmyositis sind Muskelfasern mit „rimmed vacuoles“ und eosinophilen, cytoplasmatischen Einschlüssen (Abb. 15). Diese enthalten Proteine, wie Ubiquitin, β -Amyloid-Protein- und Vorläuferprotein, Apolipoprotein E, α -1-Antichymotrypsin, Presenilin-1, hyperphosphoryliertes Tau und Prionprotein (Askanas und Engel, 1995; Askanas *et al.*, 1998), die sich auch in neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer finden lassen. Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten filamentäre Einschlüsse („inclusion bodies“) von 15-18 nm Länge im Zellkern und im Cytoplasma (Nonaka *et al.*, 1999), die der Krankheit ihren Namen gaben (Abb. 15). Lotz *et al.* (1989) konnten die „rimmed vacuoles“, die vor allem in atrophischen Muskelfasern vorkommen, als autophagische Vakuolen identifizieren.

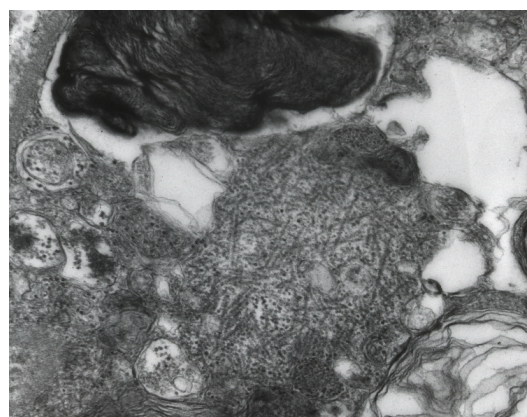
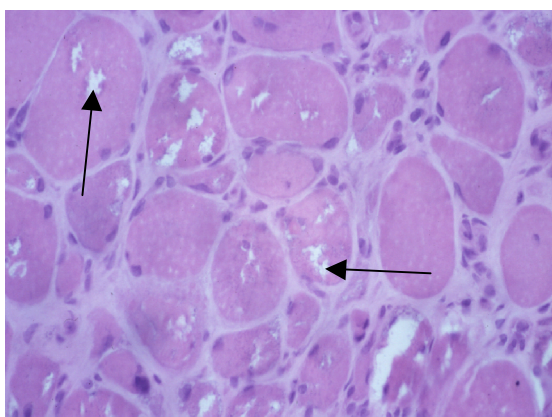


Abbildung 15: Links: Muskelquerschnitt eines h-IBM-Patienten, mit „rimmed vacuoles“ und hyper- bzw. atrophischen Muskelfasern. **Rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme der „inclusion bodies“**. Diese filamentären Einschlüsse befinden sich in Zellkern und Cytoplasma. Sie sind 15 -18 nm lang.

Der h-IBM-Prototyp, die sogenannte „quadriceps sparing“-Variante, wird autosomal rezessiv vererbt und wurde bereits 1984 bei persischen Juden beschrieben (Argov

und Yarom, 1984). Das verantwortliche Gen wurde 1997 zunächst zu Chromosom 9p1-q1 kartiert (Argov *et al.*, 1997) und konnte 1999 auf Chromosom 9p12-13 lokalisiert werden (Eisenberg *et al.*, 1999). Mit Hilfe von Sequenzanalysen wurden Punktmutationen des GNE-Gens als krankheitsverursachend identifiziert (Eisenberg *et al.*, 2001). Die bis heute mehr als 40 weltweit ermittelten Mutationen in h-IBM-Patienten verteilen sich über das gesamte Protein (Abb. 16). Es sind sowohl Epimerase- als auch Kinasedomäne des bifunktionellen Enzyms betroffen (Eisenberg *et al.*, 2003). Neben einfachen Punktmutationen wurden auch Rasterschub- und Deletationsmutationen gefunden, die allerdings nur heterozygot vorkommen (Nishino *et al.*, 2002). Sowohl rekombinant exprimierte Proteine der h-IBM-Mutanten (Noguchi *et al.*, 2004; Hinderlich *et al.*, 2004) als auch Muskelzellen von h-IBM-Patienten (Salama *et al.*, 2005) zeigen eine verringerte Enzymaktivität. Dies hat zur Folge, daß betroffene Zellen partiell hyposialyliert sein können (Noguchi *et al.*, 2004; Huizing *et al.*, 2004). Bis heute ist jedoch unklar, ob der Pathomechanismus in direktem Zusammenhang mit der Biosynthese der Sialinsäuren oder mit einer der zahlreichen biologischen Funktionen der Sialinsäuren steht.

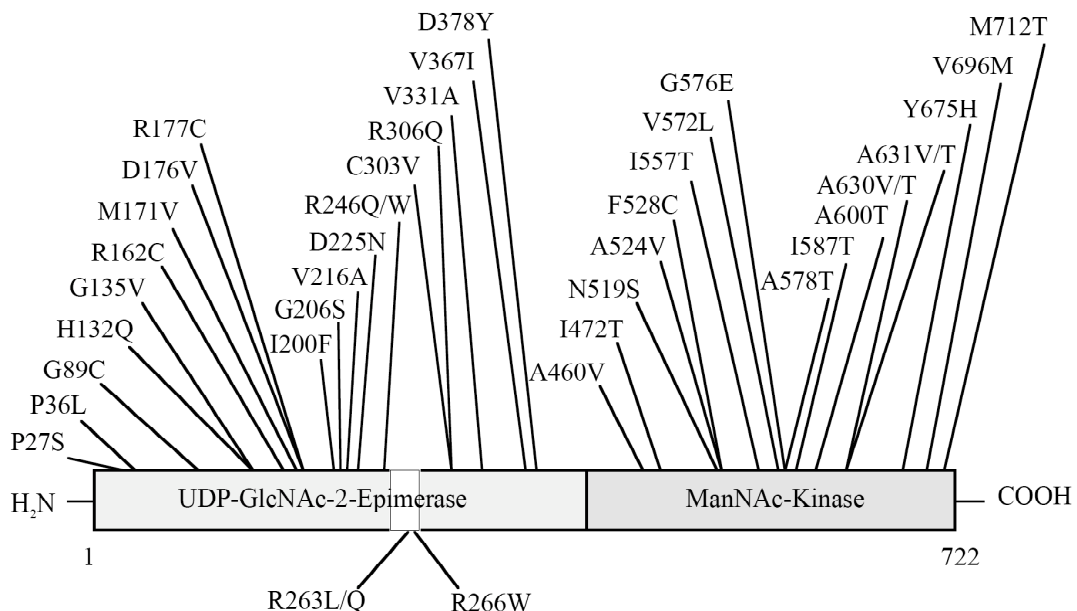


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Lokalisation der h-IBM- (oben) und Sialurie- (unten) Punktmutanten im GNE-Gen. Die Epimerase-Domäne ist hellgrau, die Kinase Domäne dunkelgrau und die postulierte CMP-Neu5Ac-Bindungstasche weiß unterlegt.

Da die gefundenen Mutationen im GNE-Gen keine eindeutige Erklärung für die Pathogenese von h-IBM geben, werden auch andere Mechanismen der Krankheits-

Einleitung

entstehung in Betracht gezogen. Eine Hypothese geht davon aus, daß durch das charakteristische Auftreten der „rimmed vacuoles“ ein Defekt im Proteinabbauweg besteht. Bei einer der h-IBM phänotypisch ähnlichen Erkrankung, der „inclusion body myopathy with Paget Disease of bones and frontotemporal dementia“ (IBMPFD), wurden sechs Mutationen im Gen des Valosin-Containing-Proteins (VCP) identifiziert und als krankheitsverursachend angesehen (Watts *et al.*, 2004). Die auch bei dieser Erkrankung auftretenden „rimmed vacuoles“ und „inclusion bodies“ werden auf den Defekt des VCP-Proteins zurückgeführt, welches zu unlöslichen Proteinaggregaten und letztlich zum Tod der Zelle führt. Bisher ist noch ungeklärt, ob VCP auch im Zusammenhang mit der h-IBM-Erkrankung steht. Weitere Untersuchungen führen zu der Annahme, daß eine Fehlregulation zwischen GNE und potentiellen Interaktionspartnern vorliegen könnte. Two-Hybrid-Screenings ergaben, daß vier Proteine, das promyelozytische Leukämie Zinkfinger-Protein (PLZF), das Collapsin-Response-Mediator-Protein 1, der Receptor-Interacting-Factor 1 (Weidemann *et al.*, 2006) und das Oxidation Resistance-Protein 1 (Oxr 1; Stella Mitrani-Rosenbaum, persönliche Mitteilung), mit der GNE interagieren. Bei dem PLZF handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor sowie um ein Adapterprotein für einen Subtyp von E3-Ligasen (Martin *et al.*, 2003). Dieses Protein ist somit am Proteinabbau über den Ubiquitin-Proteasom-Weg beteiligt und könnte wie VCP daher in einem Zusammenhang mit dem pathologischen Mechanismus der h-IBM stehen.