

1 Einleitung

1.1 Struktur und Vorkommen von Sialinsäuren

1.1.1 Struktur von Sialinsäuren

Sialinsäuren sind saure Aminosucker, deren Grundgerüst aus neun Kohlenstoffatomen besteht. Sie tragen an der C-2-Position eine Carboxyl- und an der C-5-Position eine Aminogruppe (Abbildung 1.1). Die Isolierung von Sialinsäuren gelang erstmals 1935 aus Glycolipiden des Gehirns bzw. 1936 aus submaxillarem Mucin (Klenk, 1935; Blix, 1936). Der häufigste Vertreter und biosynthetischer Vorläufer nahezu aller Sialinsäuren ist die *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), deren Aminogruppe acetyliert ist. Die hohe strukturelle Diversität der 50 bisher bekannten, natürlich vorkommenden Sialinsäuren ergibt sich aus der Art der Aminosubstituenten sowie Anzahl, Position und Kombination von Hydroxylsubstituenten an den C-Atomen C-4, C-7, C-8 und C-9 (Angata und Varki, 2002). Als Hydroxylsubstituenten sind Acetyl-, Lactoyl-, Sulfonyl-, Phosphonyl- oder Methylgruppen nachgewiesen worden, während als Aminosubstituenten die Acetyl- und Glycolylgruppen beschrieben sind (Varki, 1992; Schauer *et al.*, 1995). Neuraminsäure in unsubstituierter Form tritt dagegen in der Natur nur äußerst selten auf (Manzi *et al.*, 1990).

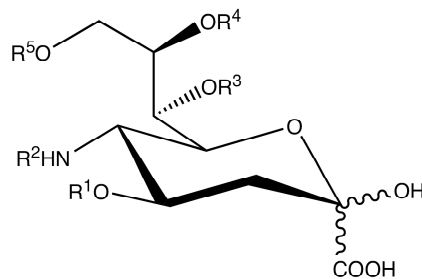


Abbildung 1.1: Struktur von Sialinsäuren.

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

1.1.2 Vorkommen von Sialinsäuren

Sialinsäuren kommen als essentieller Bestandteil von Glycokonjugaten bei Deuterostomia, von Echinodermen bis zum Menschen vor, während sie bei anderen Organismen eher die Ausnahme sind (Corfield, 1982). Die Deuterostomia-Linie weist alle Varianten der O-Modifikation auf (Angata und Varki, 2002), der Unterstamm der Vertebraten jedoch in der Regel nur O-acetylierte und eventuell noch O-lactoylierte Sialinsäuren. Anzahl und Diversität

der Sialinsäuren variieren je nach Spezies, Gewebeform und ontogenetischem Entwicklungsstand stark (Varki, 1993). So enthält die Speicheldrüse des Rindes vierzehn verschiedene Sialinsäuren (Reuter *et al.*, 1983). In humanem Gewebe finden sich nur drei verschiedene Typen von Sialinsäuren, die Neu5Ac, die 9-O-acetylierte Neu5Ac (Neu5,9Ac₂) und die 9-O-lactosylierte Neu5Ac (Neu5Ac9Lt). Das Fehlen der *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) in humanem Gewebe basiert auf einer Mutation im CMP-Neu5Ac-Hydroxylase-Gen (Irie *et al.*, 1998) und 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 aus exogenen Quellen stammende und inkorporierte Neu5Gc nachgewiesen werden (Tangvoranuntakul *et al.*, 2003). Da humane embryonale Stammzellen heutzutage mit Neu5Gc-haltigen Seren anderer Säugetiere auf einer Schicht von Maus-Feeder-Zellen kultiviert werden, sind sie gleich zwei Neu5Gc-Quellen ausgesetzt. Sie können den Zucker internalisieren und präsentieren schließlich Neu5Gc 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 Nachzucht 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 Feeder-Zellen mit humanem Serum kultiviert werden.

Abgesehen von einigen Bakterien und niederen Eukaryoten besitzen Protostomen in der Regel keine Sialinsäuren (Angata und Varki, 2002). Im Stamm der Mollusken jedoch kommen Sialinsäuren vor. So wurden im Tintenfischgewebe sialylierte Glycolipide nachgewiesen (Saito *et al.*, 2001). Auch verschiedene Insektenspezies synthetisieren in bestimmten Entwicklungsstadien Sialinsäuren (Roth *et al.*, 1992; Malykh *et al.*, 1999). Während in Pflanzen und Hefen bisher keine Sialinsäuren nachgewiesen werden konnten, findet man sie in einigen Protozoen und Pilzen (Barry, 1959; Alviano *et al.*, 1999). Sialinsäuren bilden bei Bakterien Komponenten der schützenden Glycokalyx und verhindern so die Erkennung und Bekämpfung durch das Immunsystem der Wirtsorganismen. Anders als bei den Vertebraten, die Sialinsäuren terminal tragen, findet man sie bei Bakterien vorwiegend als interne Zuckereinheiten der Polysaccharide oder in polysialylierter Form mit einer α 2,8- oder α 2,9-Verknüpfung.

1.1.3 Sialylierte Oligosaccharidstrukturen auf Proteinen und Lipiden

Sialinsäuren kommen bei Vertebraten in charakteristischer terminaler Position auf N- und O-Glycanen zahlreicher Glycoproteine und in den Gangliosiden vor. N-Glycane sind über einen *N*-Acetylglucosaminrest (GlcNAc) an Asparagin in der Konsensussequenz Asn-Xxx-Ser/Thr von Glycoproteinen gebunden und besitzen eine einheitliche Kernstruktur aus zwei GlcNAc- und drei Mannoseresten (Abb. 1.2). Der variable Strukturteil wird in drei Klassen unterteilt (Schachter, 2000).

Mannosereiche N-Glycane bestehen neben der Kernstruktur lediglich noch aus Mannoseresten. Oligosaccharide des komplexen Typs besitzen weiterhin noch *N*-Acetyl-lactosamineinheiten, Fucosen und Sialinsäuren. Der hybride Typ ist eine Mischform aus mannosereichem und komplexem Typ (Fukuda, 1994; Vliegenhart und Montreuil, 1995). Sialinsäuren sind beim komplexen Typ an das nicht-reduzierende Ende der Oligosaccharide in α 2,3- oder α 2,6-Stellung gebunden (Montreuil, 1975). Die Polysialylierung auf den N-Glycanen des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) stellt eine Sonderform der Sialylierung dar, wobei die Polysialinsäure aus einer linearen Kette von bis zu 200 α 2,8-verknüpften Sialinsäuren bestehen kann (Mühlenhoff *et al.*, 1998).

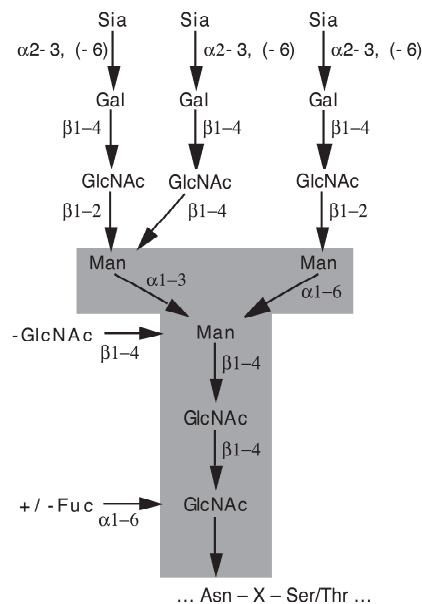


Abbildung 1.2: Grundstruktur eines typischen triantennären, komplexen N-Glycans.

Die für alle N-Glycane gemeinsame Kernstruktur (GlcNAc₂Man₃) ist grau unterlegt. ...Asn-X-Ser/Thr... ist das Aminosäure-Sequenzmotiv für die N-Glycosylierung. Neben dem in dieser Abbildung gezeigten triantennären Glycan sind bei Kohlenhydratstrukturen des komplexen Typs zusätzlich mono-, bi-, tetra- und pentaantennäre Formen möglich (Fukuda, 1994).

Die Strukturen von O-Glycanen sind sehr viel heterogener als die von N-Glycanen, wodurch die Nomenklatur der Gruppe bisher nicht vereinheitlicht werden konnte (van den Steen *et al.*, 1998). O-Glycane sind z.B. über *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) an einen Serin- oder Threoninrest von Glycoproteinen gebunden. Wie bei N-Glycanen des komplexen Typs findet man Sialinsäuren terminal in α 2,3- oder α 2,6-Position an das Oligosaccharid gebunden.

Sialylierte Glycolipide bezeichnet man als Ganglioside. Sie werden in hohen Konzentrationen in der grauen Hirnsubstanz gefunden (6% des Gesamtlipids) und bestehen aus einer Ceramideinheit mit einer Sphingosinbase und einer als Amid an die 2-Aminogruppe des Sphingosins gebundenen Fettsäure. Oligosaccharide sind über die C-1-Hydroxylgruppe an das Ceramid gebunden (Hakomori, 2000). Die Sialinsäuren der Ganglioside sind als Oligosialinsäuren sowohl α 2,3- bzw. α 2,6- als auch α 2,8-verküpft.

1.2 Biologische Funktion von Sialinsäuren

Die Gruppe der Sialinsäuren trägt erheblich zur Strukturvielfalt von Glycokonjugaten bei. Zahlreiche biologische Funktionen können direkt mit Sialinsäuren in Verbindung gebracht werden. Aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften, wie ihrer Ladung, ihres sauren Charakters und ihrer räumlichen Ausdehnung, beeinflussen Sialinsäuren ihre unmittelbare Umgebung. Sie können die Erkennung biologisch aktiver Strukturen durch Maskierung verhindern oder selbst in strukturell vielfältiger gebundener Form von spezifischen Bindungspartnern erkannt werden (Lasky, 1995; Kelm und Schauer, 1997). Im Folgenden werden die biologischen Funktionen von Sialinsäuren an einigen Beispielen erläutert.

1.2.1 Adhäsion und Zell-Zell-Interaktion

Adhäsionsprozesse sind elementar für die gerichtete Zellwanderung und Gewebeformation während der Ontogenese, sowie für Endzündungsreaktionen, malignes Zellwachstum oder Metastasierung (Edelman und Crossin, 1991; Hynes und Lander, 1992). Bedingt durch ihre negative Ladung können Sialinsäuren in ihrer terminalen Position auf Glycokonjugaten einerseits die Abstoßung zwischen Zellen oder der extrazellulären Matrix bestimmen, andererseits spielen Sialinsäuren auch als Liganden von spezifischen Sialinsäure-bindenden Lektinen für die Adhäsion eine zentrale Rolle. Zu den Sialinsäure-bindenden Lektinen gehören die Selektine und die Siglecs. Die Selektine vermitteln u.a. das sogenannte „Rolling“, das die Einwanderung der Leukozyten in aktiviertes Gefäßendothel initiiert (Lasky, 1995).

Dabei werden die Leukozyten durch Selektin-Bindung an Calcium-abhängige Strukturen, die Tetrasaccharide vom Typ Sialyl-Lewis^x oder Sialyl-Lewis^a enthalten, aus dem Blutstrom abgebremst (Phillips *et al.*, 1990; Bevilacqua *et al.*, 1991). Die beteiligten Selektine werden auf Leukozyten (L-Selektin) oder auf dem aktivierten Endothel (P- und E-Selektin) exprimiert. Bevorzugter Bindungspartner des L-Selektins sind 6'-Sulfo-Sialyl-Lewis^x-Strukturen (Varki, 1997). Die Invasion in das Epithel wird anschließend von Integrinen und Molekülen der Immunglobulinsuperfamilie vermittelt (Takeda, 1987).

Siglecs („Sialic acid-binding Ig superfamily lectins“) bilden die größte Familie sialinsäurebindender Lektine in Säugetieren. Im Menschen konnten bisher 11 verschiedene Siglecs (Crocker, 2002) identifiziert werden, die bevorzugt auf Zellen des Immunsystems exprimiert werden. Gemeinsamer Aufbau der Siglecs ist eine N-terminale Domäne, die strukturell der variablen Domäne von Immunglobulinen ähnelt, eine unterschiedliche Anzahl (1-16) von Domänen, die strukturelle Ähnlichkeiten mit der C2-Domäne von Immunglobulinen besitzen und einen Transmembranteil mit einem cytoplasmatischen Schwanz (Crocker und Varki, 2001). Ihre Funktion ist nur bei den länger bekannten Vertretern genauer untersucht worden. Siglec1/Sialoadhäsion lässt sich ausschließlich auf Makrophagen finden und reguliert dort die Interaktion mit anderen Zellen des Immunsystems über die Bindung an α 2,3-verknüpften Sialinsäuren (Hartnell *et al.*, 2001). Siglec2/CD22 dagegen bindet an α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren und ist an der homophilen Interaktion von B-Zellen beteiligt (Tedder *et al.*, 1997). Siglec4a/Myelin-assoziiertes Glycoprotein (MAG) wird nur auf Oligodendrozyten und Schwann-Zellen präsentiert und spielt bei der Aufrechterhaltung der Myelinscheidenstruktur eine wichtige Rolle (Schachner und Bartsch, 2000).

Das neuronale Zelladhäsionsmolekül NCAM vermittelt homophile und heterophile Zell-Zell-Interaktionen, deren Adhäsionsverhalten über die Menge der gebundenen Sialinsäuren moduliert wird (Cremer *et al.*, 1994). So lassen die großen, negativ geladenen Polysialinsäureketten nur schwache Interaktionen zwischen den Zellen zu (Hoffman und Edelman, 1983; Rutishauser *et al.*, 1988; Acheson *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1994). Embryonale Zellen besitzen größtenteils polysialyliertes NCAM, dessen Polysialinsäureketten sich im Laufe der Ontogenese verkürzen (Roth *et al.*, 1992). Aufgrund dieser Verkürzung ist im adulten Organismus die Adhäsion zwischen Nervenzellen verstärkt (Seki und Arai, 1993).

1.2.2 Sialinsäuren als Erkennungsdeterminanten für Pathogene

Sialinsäuren sind wesentliche Bestandteile hochspezifischer Bindungsrezeptoren für Viren, Bakterien, Parasiten und Toxine (Schauer, 1985; Varki 1992; Karlsson, 1995). Viren besitzen Sialinsäure-bindende Lektine (Hämagglutinine), die bei der Vermittlung der Agglutination von Erythrozyten mitwirken und die Virusaufnahme in die Wirtszelle vermitteln. Die Spezifität des Hämagglutinins des Influenza A-Virus für bestimmte Sialinsäuretypen wird von der Sialylierung der Wirtszelle (z.B. von Mensch, Huhn oder Schwein) bestimmt (Suzuki *et al.*, 2000). Mittels des Hämagglutinins erkennen und binden Influenza A-Viren an Neu5Ac α 2,6Gal-Strukturen, Influenza B-Viren dagegen an Neu5Ac α 2,3Gal-Strukturen. Versuche mit biochemisch modifizierten N-Acetylneuraminsäuren zeigten, dass Influenza A-Viren dabei speziell an die N-Acetylgruppe der Sialinsäure binden (Keppler *et al.*, 1995). Während eine 9-O-Acetylierung der Neu5Ac die Bindung von Influenza A und B an ihre Zielzelle verhindert, kann das Hämagglutinin der Influenza C-Viren nicht nur spezifisch an Neu5,9Ac₂-Strukturen (Zimmer *et al.*, 1994) binden, sondern deacetyliert die gebundene Sialinsäure zusätzlich durch eine 9-O-Acetyl-Esteraseaktivität (Herrler *et al.*, 1985). Influenza A-Viren anderer Wirtsorganismen können, wie bei dem aktuellen Vogelgrippe-Stamm H5N1 befürchtet, die Artengrenze zum Menschen dauerhaft überspringen, wenn es, begünstigt durch die räumliche Nähe von Mensch und Tier, zu Kreuzinfektionen von Influenza A-Viren der verschiedenen Wirtsorganismen kommt. Durch horizontalen Gentransfer zwischen den Virenspezies innerhalb der Wirtszelle kann sich ein neuer Virusstamm entwickeln, der Eigenschaften beider Stämme vereint. Ist dieser Stamm an die Sialylierung humaner Zellen angepasst, kann er saisonale Epidemien beim Menschen auslösen (Ito *et al.*, 1998).

Als Adhäsine bezeichnet man die sialinsäurebindenden Lektine von pathogenen Bakterien, welche die Bindung an die Wirtszelle ermöglichen (Ofek und Sharon, 1990). *Helicobacter pylori* besitzt zwei Adhäsine, die spezifisch an Glycoproteine oder Ganglioside binden (Miller-Podraza *et al.*, 1997), während das Schweinedarmbakterium *E. coli* K99 ein Adhäsion besitzt, welches spezifisch an das verstärkt im Darm von Schweinen synthetisierte Neu5Gc bindet (Yuyama *et al.*, 1993). Die Toxine von Cholera-, Botulinus- und Tetanuserregern nutzen zur Bindung an die Zelloberflächen ihrer Zielzellen spezifische, sialylierte Ganglioside und werden anschließend Rezeptor-vermittelt endocytisiert (Richards *et al.*, 1979; Schengrund *et al.*, 1991).

1.2.3 Maskierung antigener Determinanten durch Sialinsäuren

Einige parasitäre Mikroorganismen besitzen die Fähigkeit, ihre antigenen Determinanten mittels Sialinsäuren zu maskieren, und sind so vor der Erkennung durch das wirtseigene Immunsystem geschützt. *Trypanosoma cruzi*, der Erreger der Chagaskrankheit, bindet an terminale Sialinsäuren von Glykokonjugaten auf der Oberfläche der Wirtszelle. Der Erreger transferiert mittels Transsialidasen, welche Sialidase- und Sialyltransferase-Aktivität besitzen, die Sialinsäuren des Wirtsorganismus auf die eigene Zelloberfläche und maskiert so seine Antigenität (Colli, 1993; Tomlinson, 1994). Embryonalzellen maskieren ebenfalls durch Sialinsäuren ihre Antigenität und sind daher vor dem mütterlichen Immunsystem geschützt (Schauer, 1985). Entfernt man die schützende Sialinsäure-haltige Zona pellucida von Blastocysten, erkennt das Komplementsystem bereits nach kurzer Zeit die antigenen Determinanten und initiiert die Lyse der Blastocyste. Im Laufe der Differenzierung nimmt der Sialylierungsgrad von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) zu, wodurch diese gegenüber der Komplement-vermittelten Lyse unempfindlicher werden (Kircheis *et al.*, 1996). Sialinsäuren können nicht nur antigene Strukturen maskieren, sie können auch selbst eine Immunantwort auslösen. So besitzen Blutgruppenantigene spezifische Sialylstrukturen, die nach Inkubation mit Sialidasen ihre Antigenität verlieren (Pilatte *et al.*, 1993).

1.2.4 Einfluss von Sialinsäuren auf Struktur und Funktion von Glykokonjugaten und ihrer Träger

Die Struktur und damit auch die biologische Funktion einiger Glycoproteine wird von Sialinsäuren bestimmt. So ändert der Somatostatinrezeptor seine Konformation nach Desialylierung und bindet deutlich schlechter seinen Liganden (Rens-Domiano und Reisine, 1991). Die Funktionalität des desialylierten Nukleoporins p62, das den aktiven Proteintransport vom Cytosol in den Nukleus unterstützt, ist deutlich reduziert (Emig *et al.*, 1995).

Sialinsäuren dienen einer Vielzahl von Proteinen, wie dem Acetylcholin-Rezeptor, vermutlich durch sterische Hinderung von Proteasen als Degradationsschutz (Olden *et al.*, 1982). Weiterhin bestimmt das Vorhandensein terminaler Sialinsäuren auch die Lebensdauer von Blutbestandteilen, so werden Erythrozyten und Thrombozyten nach Verlust von Sialinsäuren bzw. Sialinsäure-haltiger Strukturen von Makrophagen erkannt und phagozytiert (Schlepper-Schäfer *et al.*, 1980; Kluge *et al.*, 1992). Die Clearance von desialylierten Serumglyco-

proteinen und Antigen-Antikörperkomplexen wurde bisher dem Asialoglycoproteinrezeptor der Leber zugeschrieben, der die Glycokonjugate erkennt, endocytiziert und degradiert (Ashwell und Harford, 1982). Neuere Arbeiten mit Asialoglycoproteinrezeptor-defizienten Mäusen zeigen jedoch keine Akkumulation desialylierter Glycokonjugate im Blutserum. Der Asialoglycoproteinrezeptor ist vielmehr für die Clearance von Sialinsäure- α -2,6GalNAc-tragenden Serumproteinen verantwortlich (Park *et al.*, 2005).

Das Erythropoietin, welches die Bildung von Erythrocyten stimuliert, verliert in der asialylierten Form an Aktivität, was ebenfalls auf der reduzierten Halblebenszeit im Blut beruht (Wasley *et al.*, 1991; Egrie und Browne, 2001). Die Funktionsweise des zeitlich bedingten Verlustes terminaler Sialinsäuren bzw. Sialinsäure-haltiger Strukturen, der auf eine Sialidase-Aktivität oder auf einem Zerfall basieren könnte, ist bisher nicht geklärt.

Das proliferative Verhalten von Zellen kann über die Sialinsäuren des Gangliosids GM3 reguliert werden. Während GM3 die Tyrosinkinaseaktivität des Epidermal-Growth-Factor-Rezeptors und damit das Zellwachstum hemmt (Bremer *et al.*, 1986), kann durch Deacetylierung der GM3-Sialinsäuren diese Inhibition wieder aufgehoben werden (Hanai *et al.*, 1988).

1.2.5 Sialinsäuren und Karzinome

Bei vielen Tumoren korreliert eine erhöhte Sialinsäurekonzentration auf der Zelloberfläche meist linear mit der Malignität (Fogel *et al.*, 1983; Hakomori, 1989; Bresalier *et al.*, 1990; Bhavanandan, 1991; Sawada *et al.*, 1994). So exprimieren Colonkarzinom- und Melanomzellen verstärkt Sialyl-Lewis^a-Strukturen auf den Zelloberflächen. Analog zum „Rolling“ der Leukocyten auf den Gefäßendothelzellen (siehe 1.2.1) führt die erhöhte Selektin-vermittelte Adhäsion der Sialyl-Lewis^a-tragenden Krebszellen zur erhöhten Invasivität dieser Tumore (Kageshita *et al.*, 1995). Auch die Maskierung mittels Sialinsäuren nutzen viele Krebsarten, um wie zahlreiche Pathogene (siehe 1.2.3) antigene Determinanten vor der Erkennung vom Immunsystem zu schützen (Dennis und Laferte, 1985). Werden Sialinsäuren durch Sialidasebehandlung entfernt, so können sie von natürlichen Killerzellen erkannt und lysiert werden (Ahrens und Ankel, 1987).

Bestimmte Tumorarten zeigen auch bei den Gangliosiden einen quantitativ und qualitativ veränderten Sialinsäuregehalt. Beispielsweise besitzen die Ganglioside GD2 und GD3 in Melanomen eine deutlich höhere Neu5,9Ac₂-Konzentration (Thurin *et al.*, 1985; Sjöberg *et al.*, 1992), das Gangliosid GM3 in Darm- und Lungenkarzinomen enthält Neu5Gc-Anteile

(Higashi, 1990). Tumorzellen mit bestimmten Gangliosiden sind durch Hemmung der Proliferation von Zellen des Immunsystems in der Lage, das Immunsystem zu supprimieren (Marcus, 1984). Hingegen führt die Deacetylierung von Sialinsäuren des GM3 zu einer erhöhten Proliferation (siehe 1.2.4; Hanai *et al.*, 1988).

In der Tumordiagnostik werden vielfach tumorspezifische Sialylstrukturen als Marker genutzt (Bhavanandan, 1991; Dreyfuss *et al.*, 1992; David *et al.*, 1993; Yamashita *et al.*, 1995). So dienen Neu5,9Ac₂-Strukturen als Marker zur Erkennung von Melanomen (Fahr und Schauer, 2001). Da grundsätzlich viele Tumorarten einen erhöhten Sialinsäureanteil insgesamt und/oder an Glycolipiden aufweisen (Sillanauke *et al.*, 1999), kann in der Klinik die Tumorprogression durch Messung des Sialinsäuregehalts im Serum verfolgt werden (Fischer und Egg, 1990).

1.3 Biosynthese von Sialinsäuren

Die Biosynthese von Sialinsäuren lässt sich in zwei Teile gliedern, die UDP-GlcNAc-Synthese, welche einen Teil des Aminosuckerstoffwechsels darstellt und die Synthese der CMP-Neu5Ac aus UDP-GlcNAc, die vom Aminosuckerstoffwechsel abzweigt.

Die *de novo*-Biosynthese der Aminosucker beginnt mit der Bildung von Glucosamin-6-Phosphat aus Fructose-6-Phosphat durch die Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Aminotransferase (EC 2.6.1.16), welche die Aminierung von Fructose-6-Phosphat am C-2 katalysiert und so die Abzweigung von der Glycolyse initiiert. Ihre Aktivität wird durch zahlreiche Mechanismen reguliert, wodurch es eine Schlüsselposition bei der Regulation der Aminosuckersynthese einnimmt (Kornfeld *et al.*, 1964; Tourian *et al.*, 1983; Broschat *et al.*, 2002). Im nächsten Schritt wird die Aminogruppe des Glucosamin-6-Phosphat durch die Glucosamin-6-Phosphat-*N*-Acetyltransferase (EC 2.3.1.4) acetyliert; Donor der Acetylgruppe ist das Acetyl-Coenzym A. Anschließend katalysiert die GlcNAc-Phosphat-Mutase (EC 2.7.5.2) reversibel die Umwandlung vom entstandenen GlcNAc-6-Phosphat in GlcNAc-1-Phosphat. Nach der abschließenden Uridylierung durch die UDP-GlcNAc-Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.23) entsteht schließlich UDP-GlcNAc.

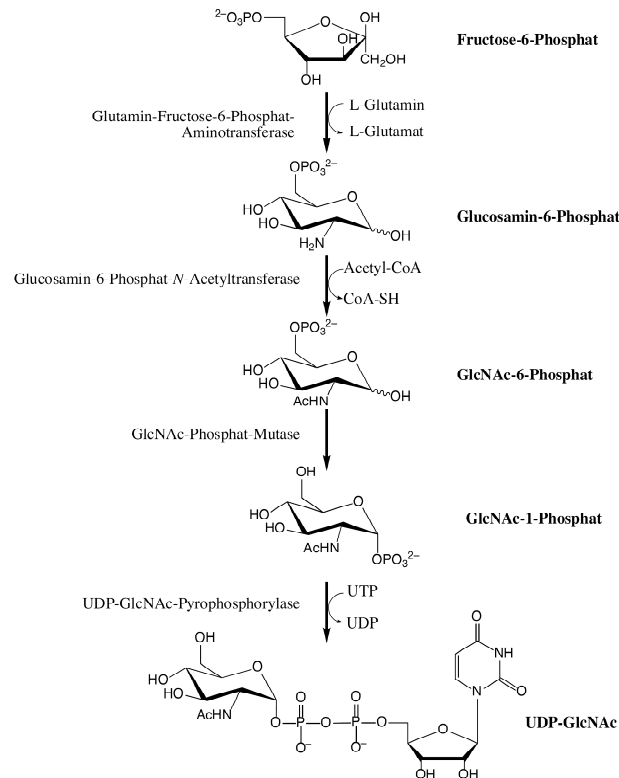


Abbildung 1.3: UDP-GlcNac-Synthese in Säugetierzellen.

Die cytosolischen Enzyme dieses Stoffwechselweges kommen in nahezu allen Geweben von Säugetieren vor.

Neben der *de novo*-Biosynthese von *N*-Acetylhexosaminen können diese auch über die Nahrung aufgenommen oder beim intrazellulären Abbau von Oligosacchariden wieder verwertet werden. Entsprechende Kinasen führen diese Substanzen in den Aminozuckermetabolismus zurück. So wird *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) durch die ManNAc-Kinase in 6-Position phosphoryliert (Gosh und Roseman, 1961), die GlcNac-Kinase wandelt analog GlcNac in GlcNac-6-Phosphat um (Datta, 1971). Die GalNAc-Kinase phosphoryliert GalNAc zu GalNAc-1-Phosphat (Pastuszak *et al.*, 1996), welches im weiteren Verlauf des Metabolismus durch die UDP-GlcNac-Pyrophosphorylase zu UDP-GalNAc uridyliert wird. UDP-GlcNac und UDP-GalNAc stehen im stöchiometrischen Verhältnis von 2 zu 1 über die Aktivität der UDP-GalNAc-4-Epimerase im Gleichgewicht (Piller *et al.*, 1983).

1.3.1 Biosynthese von CMP-Neu5Ac

Biosynthetischer Vorläufer aller Sialinsäuren ist die *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), welche in fünf irreversiblen enzymatischen Schritten aus UDP-GlcNAc synthetisiert wird (Abb. 1.4). Die ersten beiden Schritte der Sialinsäurebiosynthese, die 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, Effertz *et al.*, 1999). ManNAc-6-Phosphat wird anschließend durch die Neu5Ac-9-Phosphat-Synthase (E.C. 4.1.3.20) in einer Aldolreaktion mit Phosphoenolpyruvat zu Neu5Ac-9-Phosphat kondensiert. Im nächsten Schritt wird die Phosphatgruppe abgespalten und Neu5Ac gebildet. Bisher konnte nicht geklärt werden, ob die Reaktion auf die Aktivität unspezifischer Phosphatasen zurückzuführen ist oder ob eine spezifische Neu5Ac-9-Phosphat-Phosphatase (E.C. 3.1.3.29) beteiligt ist, obwohl eine solche Enzymaktivität in Rattenleber und in humanen Erythrozyten detektiert werden konnte (Warren und Felsenfeld, 1961; Jourdian *et al.*, 1964). Der letzte Schritt der Sialinsäurebiosynthese, die Aktivierung der Neu5Ac durch die CMP-Neu5Ac-Synthetase (E.C. 2.7.7.43), findet im Unterschied zur Aktivierung aller anderen Monosaccharide im Nukleus statt (Kean, 1969; Kean, 1970). Dabei kondensieren CTP und Neu5Ac unter Abspaltung von Pyrophosphat; Produkt der Reaktion ist CMP-Neu5Ac. Im Gegensatz zu den α -verknüpften Sialinsäuren in Glycokonjugaten bietet die β -Konformation der CMP-Neu5Ac möglicherweise einen Schutz vor dem Abbau durch α -spezifische Sialidasen (Haverkamp *et al.*, 1979; Kolter und Sandhoff, 1997). Der biologische Grund für die Kernlokalisierung der CMP-Neu5Ac-Synthetase ist bisher nicht eindeutig geklärt, jedoch deuten neuere Befunde auf eine Beteiligung des Reaktionsprodukts CMP-Neu5Ac an der Regulation der Genexpression (Büttner *et al.*, 2002).

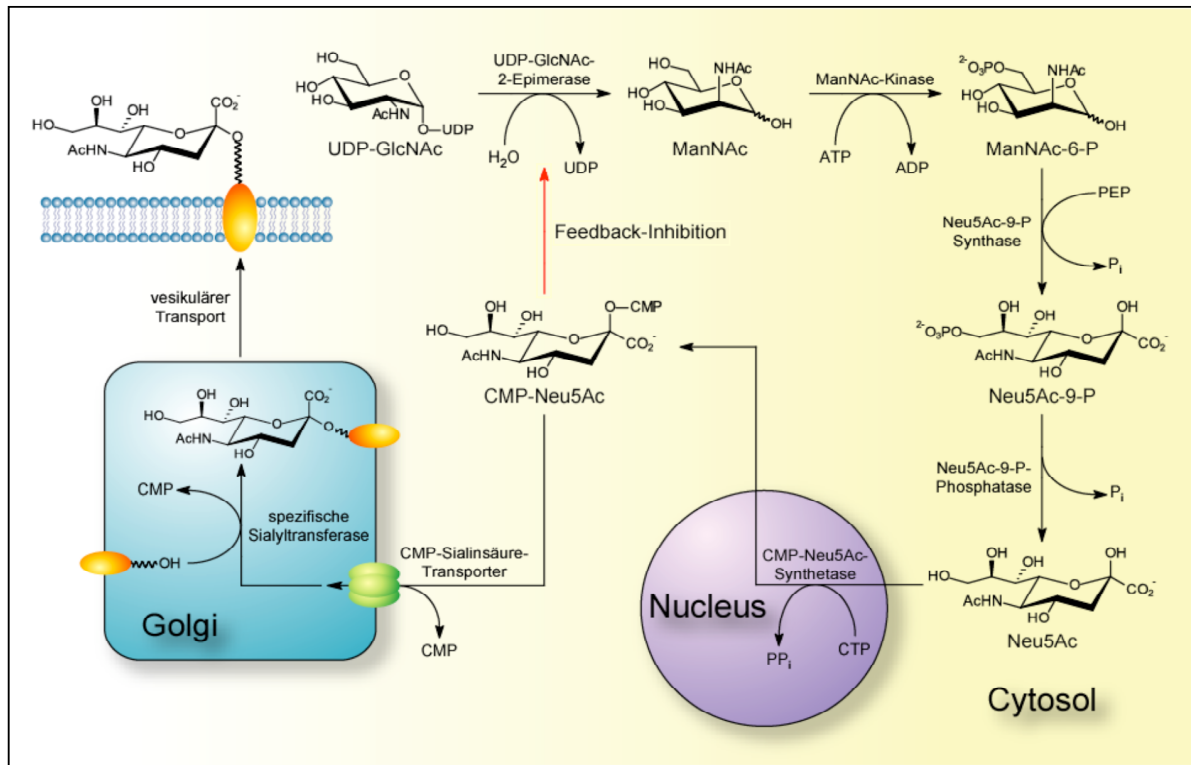


Abbildung 1.4: Biosynthese von Sialinsäuren und sialylierten Glycokonjugaten in Säugetierzellen.

Die Neu5Ac-Biosynthese wird durch einen katabolen Stoffwechselweg für Neu5Ac ergänzt. Durch den lysosomalen Anionentransporter wird zunächst die aus dem Oligosaccharidabbau erhaltene Neu5Ac ins Cytosol transportiert (Mancini *et al.*, 1989), wo sie von der Neu5Ac-Aldolase (auch als Neu5Ac-Lyase bezeichnet; E.C. 4.1.3.3) in ManNAc und Pyruvat gespalten wird. Im nächsten Schritt katalysiert die für den katabolen Neu5Ac-Stoffwechsel wichtige GlcNAc-2-Epimerase (E.C. 5.1.3.8) die reversible Reaktion von ManNAc zu GlcNAc, wobei das Gleichgewicht deutlich auf der GlcNAc-Seite liegt (Luchansky *et al.*, 2003). Als weitere Quelle für die Neu5Ac-Bildung könnte auch CMP-Neu5Ac dienen, jedoch konnte bislang keine spezifische CMP-Neu5Ac-Hydrolase nachgewiesen werden (Kean, 1991).

1.3.2 Biosynthese von sialylierten Oligosaccharidketten

Nach Aktivierung von Neu5Ac durch die CMP-Neu5Ac-Synthetase gelangt CMP-Neu5Ac vom Zellkern über das Cytosol in den Golgi-Apparat. Während die Funktionsweise des Exports von CMP-Neu5Ac aus dem Zellkern bisher nicht geklärt ist, freie Diffusion jedoch wahrscheinlich erscheint, konnte für den Import in den Golgi-Apparat ein spezifischer CMP-Neu5Ac-Transporter identifiziert werden (Eckhardt *et al.*, 1996). Dieser agiert als Antiporter

von CMP und CMP-Neu5Ac. Im *trans*-Golgi-Netzwerk wird anschließend die Neu5Ac durch spezifische Sialyltransferasen unter Abspaltung von CMP auf Oligosaccharidketten von Glycokonjugaten transferiert (Harduin-Lepers *et al.*, 1995). Die bisher klonierten 20 Sialyltransferasen (Harduin-Lepers *et al.*, 2005) verknüpfen die Neu5Ac an ihren spezifischen Akzeptor in Neu5Ac α 2,6Gal-, Neu5Ac α 2,3Gal-, Neu5Ac α 2,6GalNAc- und Neu5Ac α 2,8-Neu5Ac-Stellung. Modifiziert werden die Hydroxylgruppen der Neu5Ac erst nach der Übertragung auf Oligosaccharidstrukturen durch Acetyl-, Lactolyl-, Sulfonyl- und Methyltransferasen (Reuter und Gabius, 1996; Schauer, 2000). Eine Ausnahme bildet die Hydroxylierung des *N*-Acylrestes der Neu5Ac zu Neu5Gc, bei der das mit einem Nukleotid aktivierte CMP-Neu5Gc als Substrat dient (Kawano *et al.*, 1995). Nach vollendeter Prozessierung werden die sialylierten Glycokonjugate von Transfervesikeln zu ihren Bestimmungsorten transportiert.

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

Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (EC 5.1.3.14/2.7.1.60) katalysiert die ersten beiden Schritte der Neu5Ac-Biosynthese. Eine Besonderheit stellt die Bifunktionalität des Enzyms dar, welches zwei aufeinanderfolgende Reaktionen des Stoffwechselweges katalysiert (Hinderlich *et al.*, 1997; Stäsche *et al.*, 1997). Es gibt nur wenige vergleichbare Enzyme, z.B. die Formiminotransferase-Cyclodeaminase und die UMP-Synthase (Murley und MacKenzie, 1995; Yablonski *et al.*, 1996). Vor Entdeckung dieser Bifunktionalität wurden die Enzymaktivitäten unabhängig voneinander untersucht, so wurde die UDP-GlcNAc-2-Epimerase von Cardini und Leloir (1957) entdeckt und die Umwandlung von UDP-GlcNAc zu ManNAc von Comb und Roseman (1958) erstmals korrekt beschrieben, während die ManNAc-Kinase 1961 unabhängig von Gosh und Roseman (1961) bzw. Warren und Felsenfeld (1961) nachgewiesen wurde. Erste Hinweise für ein bifunktionelles Enzym ergaben sich aus der identischen Gewebeverteilung und der subzellulären Lokalisation beider Enzymaktivitäten (Van Rinsum *et al.*, 1983). Den Beweis für ein bifunktionelles Enzym erbrachten schließlich Stäsche *et al.* (1997) und Hinderlich *et al.* (1997). Dabei gelang erstmals die Reinigung eines stabilen und homogenen Enzyms aus Rattenleber. Frühere Reinigungsversuche der UDP-GlcNAc-2-Epimerase bzw. der ManNAc-Kinase aus verschiedenen Quellen ergaben lediglich partiell gereinigtes und instabiles Enzym (Spivak und Roseman, 1966; Sommar und Ellis, 1972a; Kikuchi und Tsuiki, 1973; Kundig *et al.*, 1966). Das aus Rattenleber gereinigte Enzym lag in zwei oligomeren Zuständen vor, die als

Dimere und Hexamere von 75 kDa-Untereinheiten beschrieben wurden (Hinderlich *et al.*, 1997). Das Dimer besitzt im Gegensatz zum höher oligomeren Enzym nur die ManNAc-Kinase-Aktivität, was auf eine Regulation der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität über verschiedene oligomere Zustände des bifunktionellen Enzyms hindeutet. Spätere Untersuchungen mit Punkt- und Deletionsmutanten (Effertz *et al.*, 1999; Blume *et al.*, 2004) zeigten neben den genannten oligomeren Zuständen zusätzlich noch trimeres Protein. Analysen von Deletionsmutanten sowie Yeast-Two-Hybrid-Experimente mit UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Fragmenten legen eine Dimerisierungsstelle innerhalb der Kinase-Domäne nahe (Blume *et al.*, 2004).

Bereits 1964 konnte die große regulatorische Bedeutung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase für die Neu5Ac-Biosynthese durch die Entdeckung einer starken Feedback-Inhibierung mittels des Endproduktes CMP-Neu5Ac gezeigt werden (Kornfeld *et al.*, 1964). Weiterhin kann die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität durch Proteinkinase C-vermittelte Phosphorylierung erhöht werden (Horstkorte *et al.*, 2000). Während die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität komplex reguliert wird, bleibt die Aktivität der ManNAc-Kinase dabei unbeeinflusst, was die regulatorische Schlüsselrolle der UDP-GlcNAc-2-Epimerase hervorhebt. Die Expressionsrate der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase ist ebenfalls einem Regulationsmechanismus unterworfen. So besitzt Hepatombgewebe im Vergleich zu normalem Lebergewebe eine um mehr als 90% verringerte Expression, was mit einer verringerten Synthese von Serumglycoproteinen im Hepatombgewebe korreliert (Reutter *et al.*, 1970; Kikuchi *et al.*, 1971; Harms *et al.*, 1973). Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Expression wird ontogenetisch reguliert. In Ratten- und Meerschweinchenleber steigt die zunächst geringe Expression im Fötus während der frühen Entwicklungsphase kontinuierlich an, erreicht etwa zwei Wochen nach der Geburt ihr Maximum und sinkt im weiteren Verlauf der Entwicklung wieder auf ein etwas niedrigeres Niveau ab (Kikuchi *et al.*, 1971; Gal *et al.*, 1997). Auch beim Menschen sinkt im Alter der Sialylierungsgrad der Mundschleimhaut (Salvolini *et al.*, 1999). Die Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wird wahrscheinlich epigenetisch durch DNA-Methylierung reguliert (Oetke *et al.*, 2003; Giordanengo *et al.*, 2004).

Die essentielle Stellung des bifunktionellen Enzyms für die Ontogenese wird durch das frühe Absterben UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-defizienter Mäuseembryonen spätestens am Tag 8,5 der Embryonalentwicklung unterstrichen (Schwarzkopf *et al.*, 2002). Hämatopoietische Zelllinien, die keine UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase exprimieren, sind ein alternatives Modell, um die Bedeutung des Enzyms für die Regulation

der Sialylierung von Glycoproteinen und Glycolipiden der Plasmamembran zu analysieren. Diese Zellen besitzen zahlreiche funktionelle Defekte wie die fehlende homophile Interaktion des Siglec2, die erniedrigte Interaktion des P-Selektins mit seinen Liganden (Keppler *et al.*, 1999) und die Reduktion der Zell-Matrix-Interaktion (Suzuki *et al.*, 2002).

Bisher konnte die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus Ratte (Stäsche *et al.*, 1997), Maus (Horstkorte *et al.*, 1999) und Mensch (Lucka *et al.*, 1999) kloniert werden. Die Aminosäuresequenzen weisen eine hohe Homologie auf; zwischen Ratte und Maus ist eine Aminosäure, zwischen Maus und Mensch 9 und zwischen Ratte und Mensch 10 von 722 Aminosäuren unterschiedlich. Das ebenfalls bifunktionelle Enzym in Vögeln, Fischen und Seeigel ist zum humanen Enzym zu 90%, 80% bzw. 70% homolog. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase des Schimpansen ist mit der humanen identisch. Der N-terminale Bereich des Enzyms besitzt Homologien zu bakteriellen UDP-GlcNAc-2-Epimerasen, während der C-Terminus zu Zuckerkinasen homolog ist. Die Mutation konservierter Aminosäuren resultiert in einem selektiven Aktivitätsverlust der entsprechenden Domäne, die Aktivität der anderen Domäne bleibt dabei bestehen (Effertz *et al.*, 1999). Andererseits legen Aktivitätsanalysen von Deletionsmutanten eine starke intramolekulare Abhängigkeit der beiden Domänen nahe (Blume *et al.*, 2004). Des Weiteren ist die Aminosäure Trp 204 für die Aktivität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase essentiell (H. Wieland, persönliche Mitteilung). Der evolutionäre Vorteil der Bifunktionalität des Enzyms ist bislang nicht geklärt, jedoch wird spekuliert, ob durch die direkte Umsetzung von ManNAc eine Freisetzung des Zwischenproduktes ins Cytosol verhindert wird, wo es mittels der GlcNAc-2-Epimerase dem katabolen Neu5Ac-Stoffwechsel (siehe 1.3.2) zugeführt würde. Kürzlich wurden neben der bereits bekannten mRNA drei weitere entdeckt (Watts *et al.*, 2003). Die verschiedenen Spleißvarianten unterscheiden sich lediglich im 5'-Bereich und zeigen ein Gewebespezifisches Expressionsmuster. Sie kodieren für drei verschiedene Polypeptidisoformen, die unterschiedliche biochemische Eigenschaften besitzen (S. Reinke, persönliche Mitteilung).

Der Reaktionsmechanismus der ManNAc-Kinase ist bislang nicht untersucht worden, jedoch wird ein zu den homologen Zuckerkinasen ähnlicher Mechanismus postuliert. 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). Der Reaktionsmechanismus der UDP-GlcNAc-2-Epimerase ist relativ gut untersucht (Abbildung 1.5) und beginnt mit der E1-ähnlichen Reaktion von UDP-GlcNAc zum intermediären Zwischenprodukt 2-Acetamidoglucal (Tanner, 2002). 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 (Sommar und Ellis, 1972), erste konkrete Hinweise ergaben sich allerdings erst, als das Zwischenprodukt im Urin von Sialurie-Patienten nachgewiesen wurde (Kamerling *et al.*, 1979, siehe auch 1.5.1). Im zweiten Schritt wird das Intermediat 2-Acetamidoglucal durch säurekatalysierte *syn*-Addition von Wasser zu ManNAc umgesetzt. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase benötigt für ihre katalytische Aktivität nicht wie andere Epimerasen (z.B. UDP-GalNAc-4-Epimerase) einen Cofaktor, etwa NAD^+ .

Kürzlich konnte durch Sättigungstransferdifferenz-NMR-Untersuchungen das Bindungsepitop des Substrates UDP-GlcNAc und UDP identifiziert werden (Blume *et al.*, 2004). Der UDP-Teil wird stärker gebunden und bindet das Produkt UDP der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Reaktion an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase besser als das Substrat UDP-GlcNAc, was auf eine kompetitive Inhibition der Enzymaktivität hindeutet.

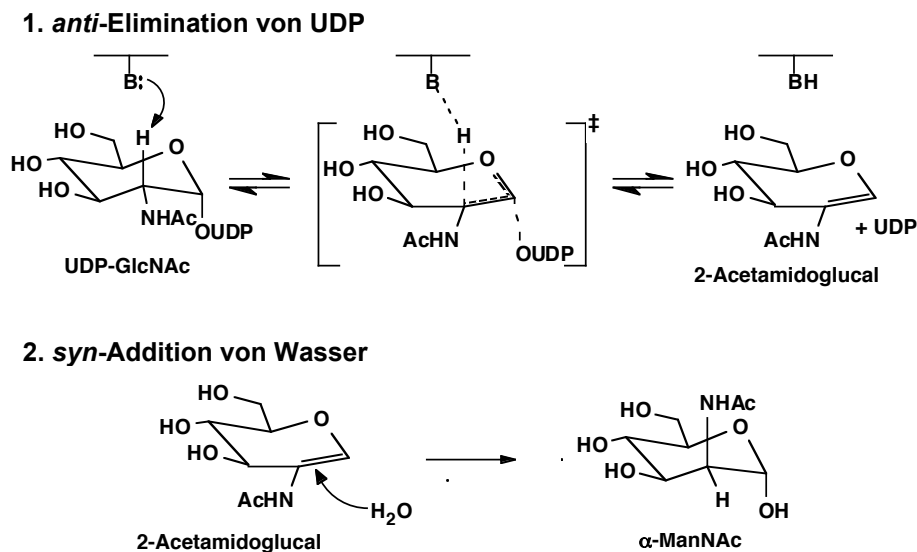


Abbildung 1.5: Postulierter Katalysemechanismus der UDP-GlcNAc-2-Epimerase von Säugetieren.

In einer E1-ähnlichen Reaktion wird durch Säureaktivierung UDP abgespalten und das Proton am C-2 von einer Base eliminiert. Durch die anschließende *syn*-Addition von Wasser wird das Intermediat 2-Acetamidoglucal schließlich zu ManNAc umgesetzt..

1.5 Pathobiochemie der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase

Punktmutationen gelten als Ursache vieler Erbkrankheiten, das prominenteste Beispiel hierfür ist die Sichelzellanämie, bei der der Austausch lediglich einer Aminosäure im Hämoglobin (E6V-Punktmutation), dessen Löslichkeit im desoxygenierten Zustand erheblich reduziert und die charakteristische Sichelzellenform der Erythrozyten hervorruft (Ingram, 1956).

Für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase sind eine Reihe von Mutationen bekannt, die sich phänotypisch in zwei Krankheitsbildern manifestieren: die Sialurie (1.5.1) und die erbliche Einschlusskörperchenmyopathie (1.5.2).

1.5.1 Sialurie

Die Sialurie ist eine sehr seltene autosomal-dominante Stoffwechselkrankheit (Leroy *et al.*, 2001). Sialurie-Patienten leiden an Entwicklungsstörungen und an einer Vergrößerung der Leber (Ferreira *et al.*, 1999; Enns *et al.*, 2001). Namensgeber der Krankheit ist der hohe Anteil (mehrere Gramm/Tag) von freier Neu5Ac im Urin, weiterhin konnte 2-Acetamidoglucal nachgewiesen werden. Die molekulare Ursache der Krankheit sind Punktmutationen im UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen, die zu einem Verlust der allosterischen Feedback-Inhibition der UDP-GlcNAc-2-Epimerase durch CMP-Neu5Ac führen, die eine unkontrollierte Produktion von cytosolischem Neu5Ac zu Folge hat (Weiss *et al.*, 1989; Seppala *et al.*, 1991). Die bisher untersuchten Patienten weisen die Punktmutationen R263L, R266Q und R266W in der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase auf (Seppala *et al.*, 1999). Des Weiteren konnten in Subklonen von Jurkat-Zellen sieben weitere UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Punktmutanten, die den Sialurie-Phänotypen hervorrufen, identifiziert werden (Yarema *et al.*, 2001). Diese 7 Mutationen und die der Sialurie-Patienten deuten auf eine Lokalisation der CMP-Neu5Ac-Bindungsstelle zwischen den Aminosäuren 249 und 275 hin.

1.5.2 Erbliche Einschlusskörperchenmyopathie (HIBM)

Die erbliche Einschlusskörperchenmyopathie („Hereditary Inclusion Body Myopathy“, kurz HIBM) ist eine weitere Krankheit, die sich auf Punktmutationen in der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zurückführen lässt (Eisenberg *et al.*, 2001). Sie stellt in erster Linie eine Erkrankung des frühen Erwachsenenalters dar. Die Krankheitssymptomatik beginnt

oft zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr mit einer langsam fortschreitende Schwächung von zunächst distalen und anschließend auch proximalen Muskeln. Im weiteren Verlauf breiten sich atrophische Muskelveränderungen auf Arme und Beine aus (Argov und Yarom, 1984). Histologisches Merkmal von HIBM sind Muskelfasern mit „rimmed vacuoles“ und eosinophilen cytoplasmatischen oder nukleären Einschlüssen (Abbildung 1.6; Nonaka, 1999). In diesen Einschlüssen konnten die für neurodegenerative Erkrankungen typischen Proteine identifiziert werden, weswegen das Krankheitsbild auch als „Alzheimer des Muskels“ diskutiert wird (Askanas *et al.*, 1998). Die „rimmed vacuoles“, die vorwiegend in atrophischen Muskelfasern vorkommen, konnten als autophagische Vakuolen identifiziert werden (Lotz *et al.*, 1989). Der HIBM-Prototyp, bei dem der Musculus Quadriceps von der makroskopischen Krankheitsentwicklung ausgenommen ist, wird autosomal rezessiv vererbt und wurde erstmals bei persischen Juden beschrieben (Argov und Yarom, 1984). Weitere HIBM-Fälle wurden vorwiegend unter Juden des gesamten Mittleren Ostens und in der japanischen Bevölkerung gefunden. Einzelfälle wurden jedoch in allen Teilen der Welt entdeckt.

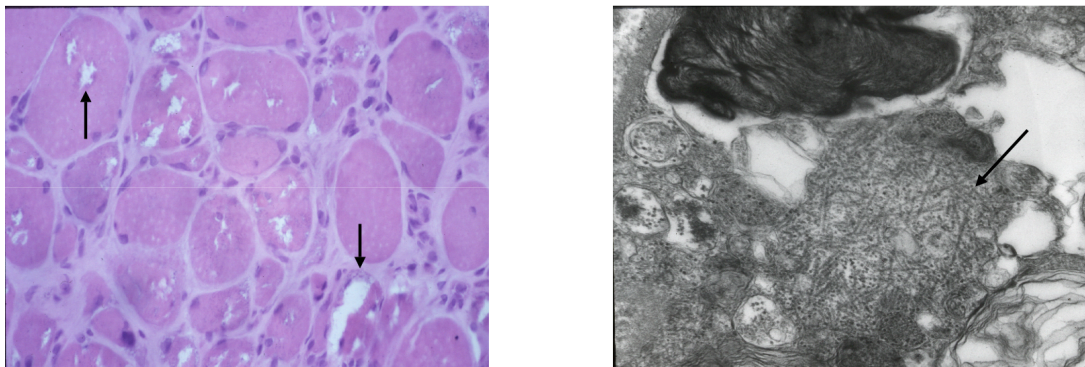


Abbildung 1.6: Mikroskopische Charakteristika der erblichen Einschlusskörperchenmyopathie (HIBM). Links: Muskelquerschnitt eines HIBM-Patienten mit „rimmed vacuoles“ und hyper- bzw. atrophischen Muskelfasern. Rechts: Filamentäre Einschlüsse im Cytosol.

Bisher konnten über 40 Mutationen nachgewiesen werden, die für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase als krankheitsverursachend gelten, sich über das komplette GNE-Gen erstrecken und beide funktionellen Domänen betreffen können (Abbildung 1.7). Neben einfachen Punktmutationen wurden auch Rasterschub- und Deletionsmutationen gefunden (Nishino *et al.*, 2002). Sowohl rekombinant exprimierte HIBM-Mutanten (Noguchi *et al.*, 2004; Hinderlich *et al.*, 2004), als auch Muskelzellen der Patienten (Salama *et al.*, 2005) weisen eine verringerte Enzymaktivität auf, so dass betroffene Zellen partiell hyposialyliert

sein können (Noguchi *et al.*, 2004; Huizing *et al.*, 2004). Bislang ist jedoch unklar, ob der pathologische Mechanismus der HIBM im direkten Zusammenhang mit der Biosynthese der Neu5Ac oder mit einer der zahlreichen biologischen Funktionen der Sialinsäure steht.

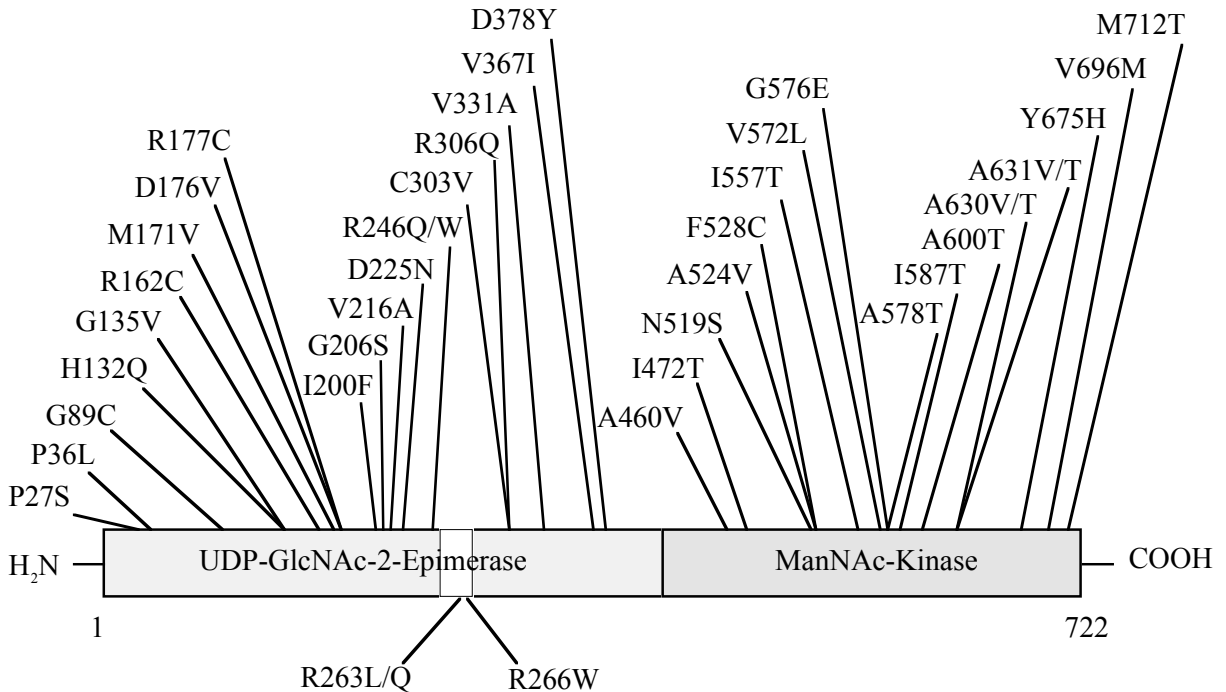


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Lokalisation der HIBM- (oben) und Sialurie- (unten) Punktmutaten im UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen.

Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne ist hellgrau, die ManNAc-Kinase-Domäne ist dunkelgrau und die postulierte CMP-Neu5Ac-Bindestelle ist weiß unterlegt.