

2. Grundlagen

2.1. Uracilnucleotide

Uracilnucleotide spielen im Organismus eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Monosacchariden, z. B. für den Aufbau von Glykokonjugaten; als Bestandteil der Ribonucleinsäure sind sie für die Proteinbiosynthese essentiell.

2.1.1. Uracilnucleotidbiosynthese

Die de novo-Synthese der Uracilnucleotide wird von Multienzymkomplexen des Cytosols katalysiert (s. Abb. 2).

Das Skelett der Pyrimidinbasen wird durch die Fusion von Aspartat und Carbamylphosphat durch die Aspartattranscarbamylase gebildet. Nach dem Ringschluss unter Katalyse der Dihydroorotase erfolgt die NAD⁺-abhängige Oxidation des Dihydroorotates zu Orotat. Durch Anlagerung von Phosphoribosylpyrophosphat und nachfolgende enzymatische Decarboxylierung entsteht schließlich Uridin-5'-monophosphat (UMP), der Grundbaustein der Synthese der Nucleotide und Nucleotidzucker der Pyrimidinreihe.

In weiteren ATP-abhängigen Reaktionsschritten können nun durch stufenweise Phosphorylierung Uridin-5'-di- und -triphosphat synthetisiert werden. Cytidin-5'-triphosphat wird durch Übertragung einer Aminogruppe auf Uridin-5'-triphosphat unter Katalyse der CTP-Synthetase gebildet, wobei Glutamin als Aminogruppendonator fungiert.

2.1.2. Regulation der de novo-Synthese

Während der Entwicklung des Organismus steht die de novo-Biosynthese im Vordergrund [45]. Die Biosynthese des UMP als Ausgangspunkt für die Synthese der weiteren Nucleotide und Nucleotidzucker der Pyrimidinreihe wird von 6 Enzymen unterschiedlicher intrazellulärer Lokalisation katalysiert, welche bei Eukaryonten in Multienzymkomplexen vorliegen und über verschiedene Substrate reguliert werden (s. Abb. 2): Der Multienzymkomplex I ist im Cytosol lokalisiert und besteht aus der Carbamylphosphatsynthetase II, Aspartattranscarbamylase sowie der Dihydroorotase. Im ebenfalls cytosolischen Multienzymkomplex II sind die Aktivitäten der

Orotatphosphoribosyltransferase und Orotidinmonophosphat-Decarboxylase zusammengefasst. Die DHO-Dh befindet sich auf der Aussenseite der inneren Mitochondrienmembran.

Die Uracilnucleotid-Biosynthese unterliegt einer strengen Regulation, in deren Vordergrund die allosterische Endproduktthemmung der Carbamylphosphatsynthetase II durch UTP und weitere Uracilnucleotide, sowie die allosterische Aktivierung durch PRPP stehen [46]. Zusätzlich findet eine Rückkopplung auf der Ebene der Intermediärprodukte statt: Orotat hemmt sowohl die mitochondriale Dihydroorotatdehydrogenase, als auch die cytosolische Dihydroorotase. UMP scheint desweiteren die OMP-Decarboxylase zu hemmen, jedoch eher im Sinne einer permanenten Dämpfung der UMP-Synthese als im Sinne einer rückgekoppelten Anpassung (s. Abb. 2).

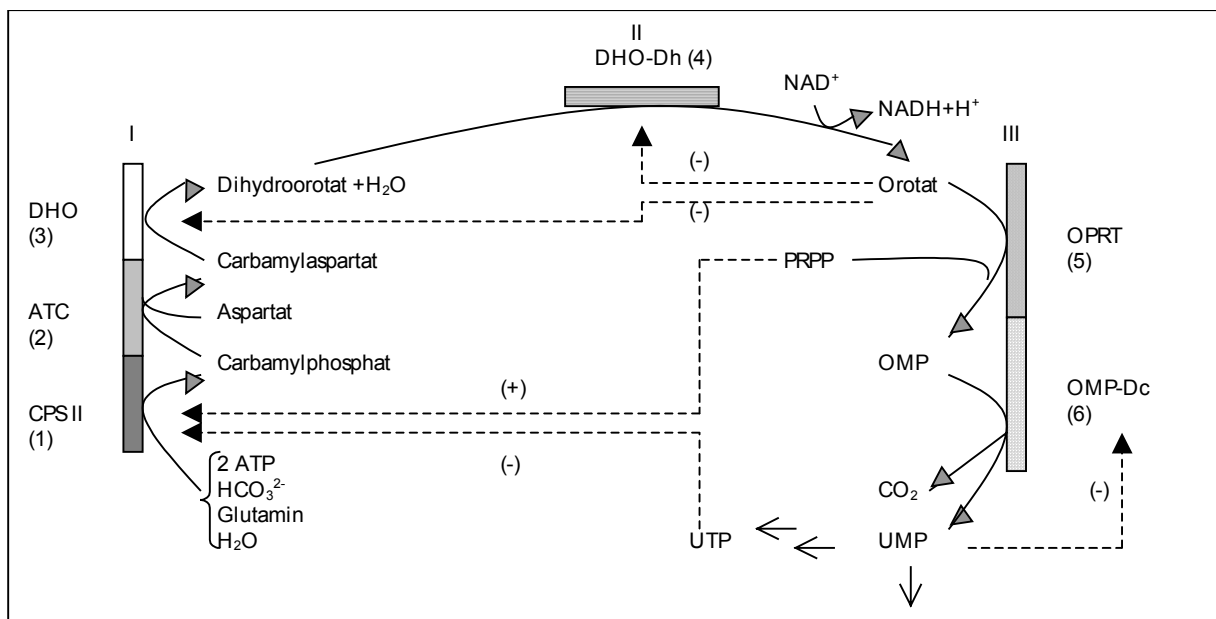


Abb. 2: Übersicht über die Reaktionsabfolge und Regulation der Pyrimidinbiosynthese. Der mit I bezeichnete cytosolische Enzymkomplex besteht aus der Carbamylphosphatsynthetase II (CPS II), Aspartattranscarbamylase (ATC) und Dihydroorotase (DHO). Der Enzymkomplex II beinhaltet die mitochondriale Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHO-Dh); Komplex III besteht aus der Orotatphosphoribosyltransferase (OPRT) und der Orotidinmonophosphat-Decarboxylase (OMP-Dc). Die unterbrochenen Pfeile stellen Rückkopplungsmechanismen dar, wobei (+) allosterische Aktivierung und (-) allosterische Hemmung bedeuten. Darstellung nach Löffler und Petrides, Physiologische Chemie, 4. Auflage, 1988.

2.1.3. Synthese von Nucleotid-aktivierten Monosacchariden

Die Synthese der Nucleotidzucker erfolgt im Cytosol der Zelle in zwei Schritten:

- 1) Zunächst wird die Hexose in C1-Position durch eine Hexokinase phosphoryliert.
- 2) Unter Katalyse verschiedener spezifischer Hexose-1'-phosphat-Nucleotidtransferasen reagiert das Monosaccharid-1'-phosphat mit UTP unter Abspaltung von Pyrophosphat zum UDP-aktivierten Monosaccharid.

Uracilnucleotide sind im Zuckerstoffwechsel die bevorzugten Nucleotide; lediglich Mannose und L-Fucose liegen GDP-aktiviert, N-Acetylneuraminsäure (NANA, Sialinsäure) liegt CMP-aktiviert vor.

2.1.4. Funktionen der Uracilnucleotide und Uracilnucleotid-Zucker im Organismus

Die Uracilnucleotide sind an vielfältigen Biosynthesen beteiligt:

- Als Bausteine der RNA sind sie an der Transkriptionsphase der Proteinbiosynthese beteiligt.
- UDP-aktivierte Zucker werden für den Aufbau von Glykokonjugaten wie Glykoproteinen, -peptiden und -lipiden benötigt, einschließlich der Glykogenbiosynthese.
- Im Galactosestoffwechsel liegen die Monosaccharide sowohl bei der Verwertung der durch die Milch aufgenommenen Galactose durch den Säugling, als auch bei der Synthese von Lactose in der Lactation UDP-aktiviert vor.
- Durch Oxidation der Hydroxylgruppe am C6-Atom der UDP-Glucose entsteht UDP-Glucuronsäure, die an der Konjugation von körpereigenen (z. B. Bilirubin, Steroidhormone) und -fremden Stoffen (z. B. Pharmazeutika, Gifte) im Rahmen der Biotransformation beteiligt ist. Aus UDP-Glucuronsäure entsteht durch Decarboxylierung UDP-Xylose, welche durch Einschleusung in den Hexosemono-

phosphatweg an der Erzeugung von Pentosen für die Nucleotid- und Nucleinsäurebiosynthese beteiligt ist.

- Im Bindegewebe wird UDP-Glucuronsäure zur Synthese von Glykosaminoglykanen, einem wesentlichen Bestandteil z. B. des Knorpels, der Nabelschnur oder der Kornea, verwandt.

2.1.5. Abbau und Reutilisierung der Uracilnucleotide

Ein Großteil der täglich benötigten Uracilnucleotide wird durch Wiederverwertungsmechanismen gewonnen, die jedoch noch unvollständig aufgeklärt sind. Beim Abbau von Nucleotiden und Nucleinsäuren entstehen freie Pyrimidinbasen, die, anders als die Purinbasen, nicht mit PRPP zu den entsprechenden Mononucleotiden reagieren können. Es scheint vielmehr so, dass die Pyrimidinbasen mit Ribose-1'-phosphat, gewonnen aus dem Purinabbau, zum entsprechenden Nucleosid reagieren, und schließlich ATP-abhängig zu Pyrimidinnucleotiden phosphoryliert werden [47].

Der Abbau der Pyrimidinbasen erfolgt im Wesentlichen in der Leber durch Spaltung des Pyrimidinringes in Fragmente. Nach Dephosphorylierung des UMP zu Uridin erfolgt die Ringspaltung der cyclischen Base in drei Stufen: Zunächst wird der Pyrimidinring zu Dihydrouracil reduziert. Durch hydrolytische Spaltung zwischen Position 1 und 6 entsteht Ureidopropionat. Nach Abspaltung von NH_3 und CO_2 entsteht β -Alanin, welches zu Acetat, NH_3 und CO_2 abgebaut wird.

2.1.6. Modell der intrazellulären Kompartimentierung der Uracilnucleotid-Biosynthese

Nach Untersuchungen an Rattenhepatozyten stellten Pels Rijcken et al. 1993 das Modell der intrazellulären Kompartimentierung der Pyrimidinnucleotid-Biosynthese auf. Danach existieren in der Leberzelle drei UTP-Pools: Ein Salvage-Pool aus der Reutilisierung von Uracilnucleotiden, der de novo-Pool aus neu synthetisierten Uracilnucleotiden und der sogenannte „Overflow“-Pool. Sie konnten nachweisen, dass das für die zytoplasmatische Biosynthese von UDP-Zuckern benötigte UTP aus der de novo-Synthese stammt, während der Reutilisierungs-Pool die RNA-Synthese im Zellkern speist [48] (s. Abb. 3).

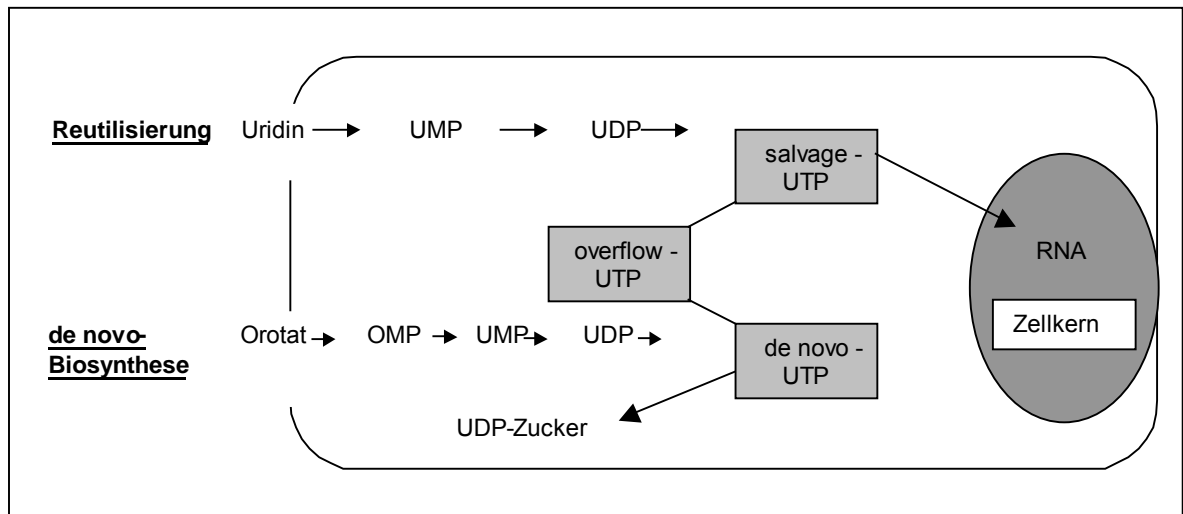


Abb. 3: Modell der intrazellulären Kompartimentierung der Pyrimidinnucleotid-Biosynthese in Ratten-Hepatozyten, modifiziert nach Pels Rijcken et al. (1993).

2.2. Glykoproteine

Glykoproteine sind Proteine mit glykosidisch gebundenem Kohlenhydratanteil, die Monosaccharide oder Oligosaccharide sein können. Je nach Art der Bindung des Glykananteils an das Protein unterscheidet man N-gebundene und O-gebundene Glykane. Sie treten als membrangebundene Glykoproteine (Rezeptoren, Kanalproteine, Histokompatibilitätsantigene u.v.a.) und in gelöster Form, z. B. als Serumproteine, Transportproteine, Immunglobuline und Proteohormone, auf.

2.2.1. Struktur von N-gebundenen Glykanen

Allen N-Glykanen ist ein Pentasaccharid gemeinsam, das direkt an den Asparaginstoffrest in der Sequenz -Asn- X -Ser/Thr- des Proteins gebunden ist. Es handelt sich hierbei um die sogenannte Kern- oder Core-Region, bestehend aus zwei N-Acetylglucosamin-Einheiten und drei Mannosen (GlcNAc β 1-4 GlcNAc β 1-4 Man (Man α 1-6) Man α 1-3). An den terminalen Mannosen der Core-Region können weitere Oligosaccharidketten, sogenannte Antennen, gebunden sein, die in drei strukturelle Gruppen eingeteilt werden [49] (s. Abb. 4).

- (1) Die Antennen vom mannosereichen Typ bestehen ausschließlich aus α -glykosidisch gebundenen D-Mannosen (in der Regel 9 Mannosen).
- (2) Die komplexen Oligosaccharide tragen an der Core-Region sich wiederholende N-Acetyllactosamin-Einheiten (Gal β 1-4GlcNAc), sogenannte *repeating-units*. Terminale Zucker sind häufig N-Acetylneuraminsäure, Galactose oder Fucose. Nach der Anzahl der Core-gebundenen Antennen unterscheidet man bi- bis hexaantennäre Strukturen. Zusätzliche Variabilität erhalten die komplexen N-Glykane durch Bindung eines N-Acetylglucosaminrestes an die Core-Region ("*bisected GlcNAc*") oder Bindung einer Fucose in diesem Bereich (core-Fucose), sowie durch Veresterung mit anorganischen Säuren oder Verlängerung der Ketten durch *repeating-units*.
- (3) Beim hybriden Typ treten sowohl Elemente des mannosereichen, wie auch des komplexen Typs auf. Auch der hybride Typ kann ein β 1-4-gebundenes *bisected GlcNAc* gebunden an die Core-Region tragen.

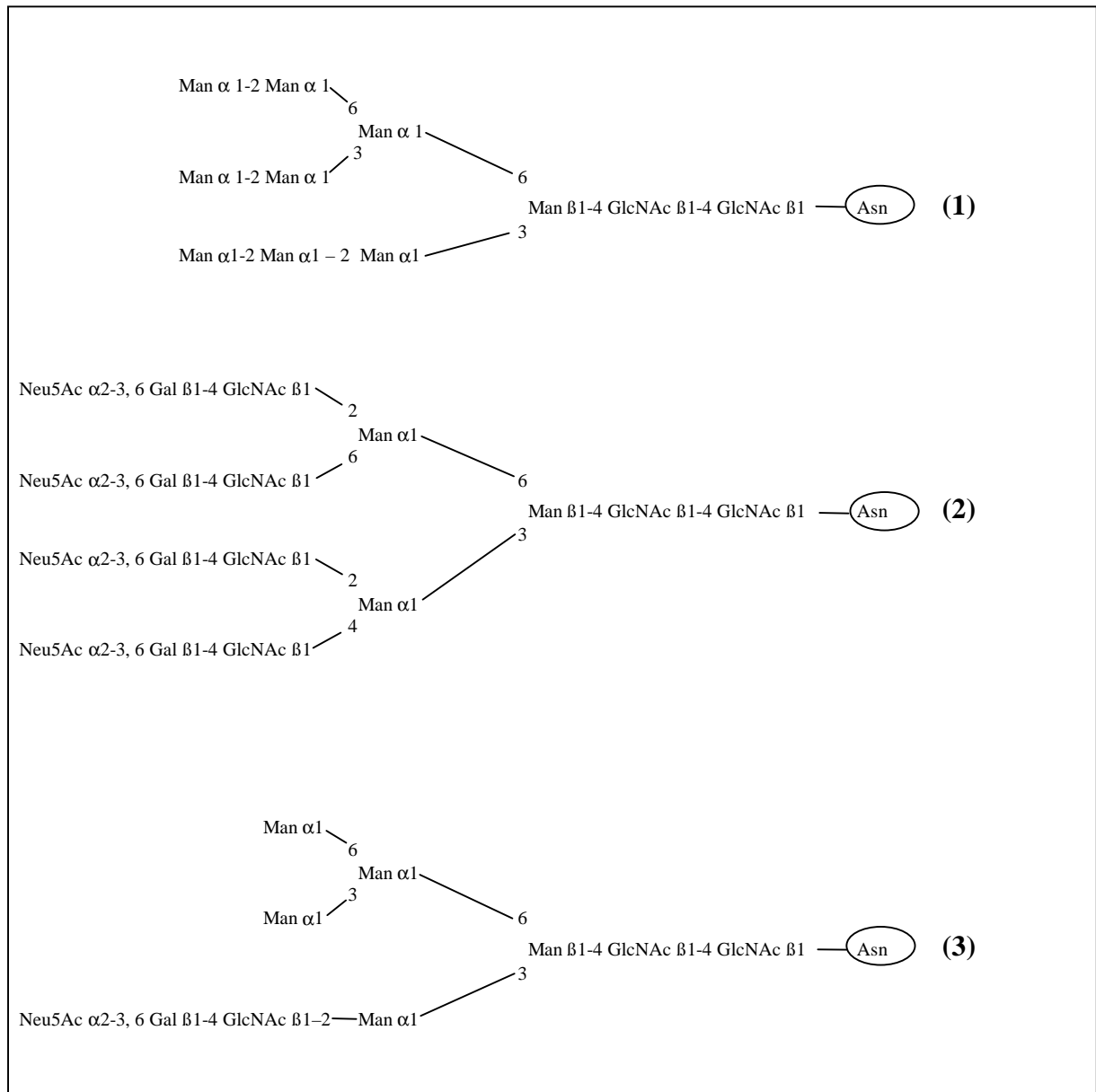


Abb. 4: Struktur der drei Haupttypen von N-Glykanen. (1) Mannosereiches Oligosaccharid, (2) tetraantennäres Oligosaccharid vom komplexen Typ, (3) hybrider Typ.

2.2.2. Struktur von O-gebundenen Glykanen

O-Glykane besitzen im Gegensatz zu den N-Glykanen wenige gemeinsame Strukturmerkmale. Sie sind meist über einen N-Acetyl-D-galaktosaminrest (GalNAc) an die Hydroxyaminosäuren Serin oder Threonin gebunden. Es wurden bereits mindestens vier z. T. verzweigte Core-Strukturen nachgewiesen, an denen N-Acetyl-lactosamineinheiten, Sialinsäuren und andere Hexosen die Antennen bilden [50].

2.2.3. Biologische Funktionen von N- und O-Glykanen

Das Verständnis über die Rolle, die der Oligosaccharidanteil in Funktion und Metabolismus von Glykoproteinen spielt, ist noch immer unvollständig. Im Folgenden soll eine Auswahl als gesichert geltender Erkenntnisse einen Einblick in die Komplexität Oligosaccharid-vermittelter Funktionen geben.

Pharmakokinetik:

Der Glykananteil des Glykoproteins beeinflusst zum einen dessen molekulare Stabilität [49,51], zum anderen wird der Abbau und damit die Halbwertszeit von Serumglykoproteinen durch den Glykananteil bedingt, indem Rezeptoren z. B. der Leber bestimmte Zuckerstrukturen binden und über Endozytosemechanismen dem lysosomalen Abbau zuführen:

- Der hepatische Asialoglykoproteinrezeptor bindet terminale β -Gal und β -GalNAc, die nach Verlust der Sialinsäurereste, z. B. durch Abbau von Sialidasen, freiliegen [52].
- Die extrem kurze Halbwertszeit des Lysemedikamentes t-PA (*tissue-type plasminogen activator*) beruht auf der Bindung des mannosereichen Glykananteils an einen hepatischen Mannoserezeptor [53].
- Sulfatierte Glykoprotein hormone wie das Luteinisierungshormon (LH) werden aufgrund des endständigen $\text{SO}_4\text{-4GalNAc}\beta 1$ von einem Rezeptor der von Kupfferschen Sternzellen aus dem Blutkreislauf entfernt [54].

Speicherfunktion: Oligosaccharide der Zelloberfläche aber auch Serumglykoproteine können durch Bindung von Ionen eine Speicherfunktion übernehmen. So binden die Sialinsäuren des Glykananteils des Fibrinogens Ca^{2+} , um bei der Fibrinpolymerisation eine ausreichende lokale Ca^{2+} -Konzentration zu gewährleisten [55].

Interaktionen zwischen den Zellen: Die Bindung von Spermien an einen Rezeptor der Eizelle wird über O-gebundene sulfatierte Oligosaccharid-Strukturen vermittelt [56]. Transmembranäre Glykoproteine, wie Integrine, Selektine, Cadherine und Mitglieder der IgG-Superfamilie, vermitteln Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsionen, die z. B. in der Interaktion von Zellen des Immunsystems, bei der Migration der Leukozyten ins Gewebe und im Rahmen der Embryogenese eine wesentliche Rolle spielen. Die transmembranären Glykoproteine vermitteln dabei sowohl Signale des extrazellulären Raumes nach intrazellulär (*outside-in-signaling*), als auch Signale des Zellinneren an die umgebende Matrix und Zellen (*inside-out-signaling*) [57,58]. Es gibt weiterhin Hinweise, dass eine veränderte Glykosylierung in malignen Zellen das Metastasierungsverhalten beeinflusst. So soll α 2-8-Polysialylierung, nachgewiesen bei Mamma-Karzinom-Zellen, zu einer verminderten Zell-Zell-Adhäsion beitragen und damit die Infiltration in das umliegende Gewebe fördern [59].

Rezeptor-Funktion bei Infektionen: Viele Viren, Bakterien und Parasiten binden hochspezifisch an bestimmte Kohlenhydratstrukturen der Zielzelle [60]. So bindet Influenza-Virus A an Neu5Ac α 2-6Gal, während Influenza-Virus B an Neu5Ac α 2-3Gal bindet [61]. Die Modifizierung der Sialinsäure durch O-Acetylierung in Position 9 verhindert wiederum die Bindung des Influenza-Virus A, generiert aber eine Bindungsstelle für das Influenza-Virus C [62]. Keppler et al. (1998) zeigten, dass durch die Verlängerung der N-Acyl-Seitenkette der Neuraminsäuren membranständiger Glykoproteine von MDCK-Zellen die Bindung und damit die Infektionsrate der Zellen durch Influenza A um bis zu 80% gesenkt werden konnte [63].

Intrazelluläre Zielsteuerung der Glykoproteine: Lysosomale Glykoproteine werden während ihrer Synthese im endoplasmatischen Retikulum am äußersten Mannoserest in Position 6 phosphoryliert und im Golgi-Apparat von membranständigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren gebunden. Die abgeschnürten Membranvesikel werden dann zu den Lysosomen transportiert [64].

Immunogenität: Oligosaccharide können die immunogene Wirkung von Glykoproteinen beeinflussen, indem sie antigene Bereiche des Proteins maskieren.

Andererseits können sie auch selbst antigen wirken [65]. Das bekannteste Beispiel sind die Kohlenhydratdeterminanten des Blutgruppen-ABO-Systems.

2.2.4. Biosynthese von N-Glykanen

Die Biosynthese der N-Glykane erfolgt parallel zur Translation des entsprechenden Proteinanteils im rauhen endoplasmatischen Reticulum (rER) in einem zweischrittigen Mechanismus: An dem Akzeptormolekül Dolicholphosphat, welches die wachsende Saccharidkette an der Membran des rER fixiert, wird zunächst eine Oligosaccharidvorstufe, bestehend aus der Core-Region und zusätzlichen sechs Mannose- und drei Glucosemolekülen, synthetisiert. Als Bausteine dienen UDP-Glucose, UDP-N-Acetylglucosamin und GDP-Mannose, die von Monosaccharid-spezifischen Glykosyltransferasen übertragen werden. Die Bindung der Glykanvorstufe an den entsprechenden Asparaginrest des in den Ribosomen entstehenden Proteins geschieht unter Freisetzung von Dolicholphosphat. Die Prozessierung der Glykanvorstufe zum spezifischen Oligosaccharid - das sogenannte "Trimmen" - beginnt bereits während des Transportes des Glykoproteins vom rER zum Golgi-Apparat. Es werden zunächst die 3 terminalen Glucosereste sowie ein Mannoserest entfernt. In den cis-Zisternen des Golgi-Apparates findet eine weitere Abspaltung von Monosacchariden bis zur Freilegung der Glykan-Core-Region statt. An die Core-Region des Glykans werden nun durch spezifische Glykosyltransferasen Nukleosiddiphosphat-aktivierte Monosaccharide angeheftet; es entsteht ein für das entsprechende Glykoprotein typisches Heterosaccharid. In den trans-Zisternen werden dann Sialinsäurereste und L-Fucose auf die Antennen des Oligosaccharides übertragen [66].

2.2.5. Regulation der Synthese spezifischer N-gebundener Oligosaccharide von Glykoproteinen

Während der Ablauf der N-Glykansynthese bereits umfassend untersucht wurde, bestehen noch immer Fragen über die beteiligten Regulationsmechanismen, die eine matrizenunabhängige Synthese von N-Glykanen, die für das entsprechende Glykoprotein spezifisch sind, ermöglichen. Es wurden bisher drei Regulationsebenen beschrieben:

- Die Beteiligung von Glykosyltransferasen und Glucosidasen sind bereits untersucht worden. Ihr Expressionsgrad sowie ihre intrazelluläre Lokalisation sind wesentliche Determinanten der wachsenden Oligosaccharidkette. So tritt z. B. eine Polysialylierung neuronaler Zelladhäsionsmoleküle, von der man annimmt, sie sei für die Interaktionen der neuronalen Zell-Adhäsionsmoleküle miteinander verantwortlich, nur in einer frühen Phase der Embryogenese auf [67-71].
- Des Weiteren spielt die Passagezeit durch die intrazellulären Kompartimente bei der Glykanprozessierung eine regulative Rolle: Die unterschiedlichen Glykosyltransferasen und Glukosidasen liegen, räumlich getrennt, in den verschiedenen Subkompartimenten (cis-, medial-, trans-Zisternen) des Golgi-Apparates vor. Die Glykanvorstufen durchlaufen zunächst das ER und wandern dann in Transportvesikeln zum Golgi-Apparat mit dem sie, beginnend am cis-Pol, wiederholt fusionieren und so in Kontakt mit den verschiedenen Prozessierungs-Enzymen treten, um letztlich am trans-Pol auszutreten [72]. Der gerichtete Transport der Glykan-tragenden Vesikel wird dabei von GTP-bindenden Proteinen reguliert, die sich in den Vesikeln befinden [73].
- Eine weitere Regulation der Glykosylierung scheint nach neueren Erkenntnissen auf der Ebene des intrazellulären Angebotes an Nucleotidzuckern, dem Substrat der Glykansynthese, stattzufinden [42-44] (s.u. 1.1.9.).

2.2.6. Biosynthese von O-Glykanen

Die Synthese der O-Glykane erfolgt post-translational und beginnt mit der Übertragung eines N-Acetyl-D-galaktosamin-Restes (aus UDP-GalNAc) auf einen Serin- oder Threoninrest des Polypeptides. Spezifische Glykosyltransferasen knüpfen dann schrittweise einzelne Nucleosiddiphosphat-aktivierte Monosaccharide an die wachsende Glykankette an [50].