

7. Diskussion

7.1. Nucleotidkonzentrationen in der Leber, Niere, Herz, Lunge und Gehirn Vitamin B6-defizienter Ratten

Vitamin B6-Mangel führte in der Rattenleber zu einer Konzentrationserhöhung der Uracilnucleotide um das 1,4-fache (UDP-GA) bis zu 5,8-fache (Σ UTP, UDP und UMP). Neben den Uracilnucleotiden zeigten auch CTP / CDP in der Rattenleber eine Konzentrationserhöhung um das 1,6-fache. GTP und GDP wiesen keine signifikanten Änderungen auf. Die hier ermittelten Uracilnucleotid-Konzentrationen in der Rattenleber bestätigten die von Renner et al. (2002) [41] ermittelten Konzentrationen. Über die Induktion eines Substratüberschusses kam es zudem zu einer Erhöhung der UDP-Zucker und CTP/ CDP in der Leber.

Die Ursache für diese Erhöhung der Uracilnucleotid-Konzentrationen in der Leber liegt möglicherweise in der Induktion einer vermehrten *de novo*-Synthese und/ oder Reutilisierung der Uracilnucleotide durch gesteigerte Enzymaktivitäten, in einer vermehrten Genexpression beteiligter Enzyme oder aber in einem verminderten Abbau von Uracilnucleotiden. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten in den 90er Jahren, dass unter Vitamin B6-Mangelbedingungen eine vermehrte Transkription verschiedener Gene (z. B. des Albumin- [29], β -Actin- und des Glykogenphosphorylase-Gens [31] sowie des Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase-Gens [27]) stattfand. Zusätzlich beobachteten Oka et al. (1993) eine generelle Steigerung der Genexpression in der Rattenleber, bedingt durch eine höhere Aktivität der RNA-Polymerase I und II [27]. Umgekehrt wurde in der humanen Hepatomzell-Linie Hep G2 eine Hemmung der Expression des Albumin-Gens unter Zugabe von Pyridoxin beschrieben [30].

Während die Untersuchungen an der Rattenleber bzw. an Rattenhepatozyten eine gesteigerte Genexpression zeigten, beobachteten Trakatellis et al. (1997) in Rattenlymphozytenkulturen entgegengesetzte Effekte [8]. Durch Hinzufügen des Pyridoxin-Antimetaboliten Desoxyridoxin wurde die Zellproliferation gehemmt und die DNA- und mRNA-Synthese vermindert. Eine mögliche Erklärung für diese Befunddiskrepanz lag in den unterschiedlichen Versuchsbedingungen: Trakatellis et al. setzten einen Antimetaboliten des Vitamin B6 ein und untersuchten Lymphozyten in der Zellkultur, Oka et al. induzierten in der Ratte einen Vitamin B6-Mangel durch Vitamin B6-freie Kost und untersuchten die Rattenleber.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit war eine in verschiedenen Organen unterschiedliche Modifikation der Genexpression, so dass beide Effekte nebeneinander

stattfinden könnten. Spätere Untersuchungen von Oka et al. [31] unterstützten diesen Ansatz: Sie fanden 1994 in der Rattenleber und im Skelettmuskel der Ratte gegenläufige Veränderungen derselben Gene durch Vitamin B6-Mangel. So fand sich in der Rattenleber eine Erhöhung, im Skelettmuskel jedoch eine Erniedrigung der Glykogenphosphorylase-mRNA; das β -Actin-Gen, ein sogenanntes House-keeping-Gen, zeigte sich unter Vitamin B6-Mangel im Skelettmuskel unverändert, in der Leber jedoch erhöht. Diese Ergebnisse zeigten eine Organspezifität der durch Vitamin B6-Mangel induzierten Modulation der Genexpression. Die in dieser Arbeit untersuchten Uracilnucleotid-Konzentrationen zeigten unter Vitamin B6-Mangel ebenfalls gegenläufige Effekte in verschiedenen Organen. Im Gegensatz zur Rattenleber (s.o.) zeigte sich im Herzmuskel eine 40%ige Erniedrigung der Konzentrationen von UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc und UDP-Glc sowie der Summe der Konzentrationen von UTP, UDP und UMP. CDP und CTP zeigten hier keine signifikanten Veränderungen. In der Rattenniere waren die Veränderungen heterogener: Während die Summe von UTP, UDP und UMP eine Konzentrationsminderung um 40% zeigten, waren die Konzentrationen von UDP-GalNAc, UDP-Glc und UDP-Gal um das 1,3- bis 1,4-fache erhöht. CTP/CDP-Konzentrationen waren unverändert. Im Gehirn waren lediglich die Konzentrationen von UDP-Glc, UDP-Gal und CTP/CDP um das 1,3-, 1,5- und 1,4-fache erhöht, während andere Nucleotidkonzentrationen, insbesondere UTP, UDP und UMP, nicht beeinflusst wurden. GTP und GDP zeigten in keinem Organ Veränderungen unter Vitamin B6-Mangel. Im Lungengewebe zeigte lediglich UDP-Glucuronsäure einen signifikanten Konzentrationsanstieg um 68% ($p=0,02$).

Die Zusammensicht dieser Ergebnisse mit der Literatur lässt eine Veränderung der Genexpression von am Uracilnucleotid-Stoffwechsel beteiligten Enzymen als Ursache der unter Vitamin B6-Mangel auftretenden Veränderungen im Uracilnucleotid-Haushalt als wahrscheinlich wirken. Unklar ist jedoch, ob die Erhöhung der Uracilnucleotide, insbesondere von UTP, zu einer vermehrten Genexpression führt, oder ob umgekehrt eine vermehrte Genexpression von an der Uracilnucleotidsynthese beteiligten Enzymen zu einer erhöhten Uracilnucleotid-Konzentration führt. Einen möglichen Hinweis erlangt man aus den Arbeiten von Renner [41] und Oka [31]: Die von Oka hinsichtlich der mRNA-Konzentrationen untersuchten Tiere unter Vitamin B6-Mangel wurden über 4 Wochen mit Vitamin B6-Mangelfutter ernährt. Die Organentnahme erfolgte nach 28 Tagen Mangeldiät. Zu diesem Zeitpunkt waren die Uracilnucleotid-Erhöhungen in der Rattenleber bereits wieder deutlich rückläufig (siehe Renner), so dass die von Oka et al. beschriebene Erhöhung der mRNA unter Vitamin B6-Mangel vermutlich unabhängig von einem vermehrten Angebot an UTP

war. Dies wäre ein indirekter Hinweis, dass primär die erhöhte Genexpression zu einer Erhöhung der Uracilnucleotide führt und nicht umgekehrt. Jedoch war zu dem von Oka et al. gewählten Zeitpunkt der Organentnahme die UTP-Konzentration noch nicht vollständig normalisiert, so dass weitere Untersuchungen zur Klärung dieser Frage abzuwarten bleiben.

Eine weitere Beobachtung war, dass die im Gehirn gemessenen Nucleotidkonzentrationen, insbesondere UTP, UDP und UMP, im Vergleich zu den anderen Organen größere Standardabweichungen aufwiesen. Eine mögliche Ursache für die höheren Schwankungen der Werte im Gehirngewebe lag in der zeitlichen Abfolge der Organentnahme und dem sich anschließenden Gefrierstop-Verfahren. Das Gehirn war das von allen zuletzt entnommene Organ, der Abbau an energiereichen Phosphaten fand zu diesem Zeitpunkt vorraussichtlich bereits statt. Jackson et al. (1980) hatten in Untersuchungen über die Auswirkung einer Ischämie auf den Nucleotidgehalt der Rattenleber nachgewiesen, dass bereits 10 min Ischämiezeit ausreichten, um zu einem nahezu vollständigen Abbau der Nucleotidtriphosphate zu führen. Bereits eine für 30 s anhaltende Perfusionsunterbrechung führte zu einer Senkung der Nucleotidtriphosphate auf 89% bei ATP, auf 95% bei UTP, auf 77% bei CTP und auf 92% bei GTP, während die Nucleotidmonophosphate im entsprechenden Maße zunahmten. Die Nucleosiddiphosphat-Konzentrationen hingegen blieben nahezu unverändert [82]. Die Organentnahme erfolgte aus diesem Grunde zügig, in stets der gleichen Reihenfolge, wobei vom Beginn der Entnahme des ersten Organs bis zur Entnahme des letzten Organs, des Gehirns eines Tieres, maximal 40 s verstrichen.

Weiterhin stellte sich die Frage nach metabolischen Konsequenzen, die sich aus der Erhöhung der Uracilnucleotid-Konzentrationen in der Leber bzw. einer Erniedrigung in anderen Organen ergeben. Der Glykogen-Stoffwechsel ist in zweifacher Hinsicht betroffen. Das Enzym des Glykogenabbaus, die Glykogen-Phosphorylase, ist PLP-abhängig und müsste im Vitamin B6-Mangel gehemmt sein. Als Substrat der Glykogen-Synthase müsste eine intrazelluläre Erhöhung der UDP-Glc zudem zu einer vermehrten Glykogenspeicherung in der Leber führen. Robinson beobachtete 1966 in Mäusen unter Vitamin B6-Mangel tatsächlich eine Abnahme der Glykogen-Phosphorylaseaktivität, einhergehend mit einem erhöhten Glykogengehalt der Leber [40]. Dem gegenüber beschrieben Okada et al. 1991, dass sich weder die Aktivität der Glykogen-Phosphorylase, noch der Gesamtglykogengehalt der Rattenleber unter Vitamin B6-Mangel veränderten [87]. 1994 zeigten Oka et al. zwar einen Anstieg des Glykogen-Phosphorylase-mRNA-Gehaltes der Rattenleber, die Aktivität der Phosphorylase blieb jedoch auch hier unverändert.

Ein weiteres System, welches durch die Uracilnucleotiderhöhung im Vitamin B6-Mangel beeinflusst werden könnte, ist die intrahepatische Glucuronidierung von Metaboliten. Bossuyt et al. entwickelten ein Modell für die Stimulation der Glucuronidierung in der Leber [88]. Mehrere Systeme sind darin miteinander verbunden: Die Antiportsysteme $\text{UDP-GA}_{\text{Influx}} / \text{UDP-GlcNAc}_{\text{Efflux}}$ und $\text{UDP-GlcNAc}_{\text{Influx}} / \text{UMP}_{\text{Efflux}}$, die intravesikuläre Metabolisierung von UDP-GA und das intravesikuläre Angebot an UDP-GlcNAc beeinflussen die UDP-Glucuronosyltransferase. Unter Vitamin B6-Mangel kam es zu einer Erhöhung aller beteiligter Uracilnucleotid-Verbindungen. Eine Steigerung der Glucuronidierung ist damit möglich.

Zudem ist eine Auswirkung des vermehrten Gehaltes an aktivierten Zuckern auf die Bildung von Glykokonjugaten wie Sekretions- und Membranproteinen sowie Glykolipiden denkbar (siehe auch 7.3.).

7.2. Nucleotidkonzentrationen in der Leber Vitamin B6-defizienter Ratten unter dem Einfluss eines absoluten Glucocorticoidmangels bzw. Glucocorticoidüberschusses

Bereits in den 70er Jahren wurden erste Hinweise auf die Modulation der Genexpression durch Vitamin B6 gefunden [89]. Weitere Beobachtungen zeigten in den 80er und 90er Jahren, dass PLP die Transkription verschiedener Proteine hemmt, indem es die Translokation des Steroidrezeptor-Komplexes vom Cytosol in den Zellkern und die Bindung des Hormon-Rezeptorkomplexes an die DNA inhibiert (s.u. 1.1.5) [14-26]. Im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit sollten erste Hinweise gewonnen werden, ob diese Effekte am Anstieg von Uracilnucleotiden und Uracilnucleotidzuckern in der Leber von Vitamin B6-Mangelratten ursächlich beteiligt sind. Dazu wurde eine Gruppe von Vitamin B6-Mangel- und Kontrollratten adrenaletomiert (Glucocorticoid-Mangel), in einer zweiten Versuchsgruppe wurde ein Glucocorticoid-Überschuss durch 48-stündige Nahrungskarenz induziert. In der Kontrollgruppe zeigte sich, wie bereits in der Arbeit von Renner gezeigt, unter Vitamin B6-Mangel eine deutliche Konzentrationserhöhung der Uracilnucleotide sowie eine geringe Konzentrationserhöhung von CTP und CDP. Auch in der Gruppe der adrenaletomierten Vitamin B6-Mangeltiere zeigten sich Erhöhungen der Uracilnucleotid-Konzentrationen, die allerdings im Vergleich zu Tieren ohne Eingriff in die Glucocorticoidhomöostase um 25% niedriger lagen. Bei den Tieren, die 2 Tage

vor Organentnahme unabhängig von der jeweiligen bisherigen Nahrung hungerten, blieb eine Erhöhung der Uracilnucleotide bei Vitamin B6-Mangeltieren aus. Gleichwohl zeigten sich bei den zuvor vollwertig ernährten Kontrolltieren gleiche Uracilnucleotid-Konzentrationen nach zweitägiger Nahrungskarenz wie bei Kontrolltieren ohne Nahrungskarenz. In der Kontrollgruppe mit vollwertigem Futter zeigte sich also auch unter Hungerbedingungen kein Abfall der Uracilnucleotid-Konzentrationen, d.h. eine Reutilisierung der energiereichen Uracilnucleotide als katabole Stoffwechselreaktion ist zumindest bei zuvor normal ernährten Tieren nicht eingetreten. Es ist möglich, dass unter einem Vitamin B6-Mangel Feed-back-Mechanismen, die eine Konstanz des Uracilnucleotidpools auch unter Hungerbedingungen gewährleisten, im Vitamin B6-Mangel außer Kraft gesetzt sind. Zudem ist im Vitamin B-Mangel eine Hemmung der gesteigerten Genexpression von Enzymsystemen der Uracilnucleotidsynthese zugunsten der Energiegewinnung denkbar.

Inwieweit es sich bei der Normalisierung der erhöhten Uracilnucleotid-Konzentrationen unter Hungerbedingungen um einen Glucocorticoid-vermittelten Effekt handelt, ist aufgrund dieses ersten Versuchsaufbaus nicht zu entscheiden. Ebenso ist noch unklar, inwieweit ein Absinken unter Normalkonzentrationen bei weiter bestehender Nahrungskarenz in zuvor Vitamin B6-mangelernährten Tieren auftritt. Im Rahmen der komplexen Anpassungsreaktionen auf den Hungerzustand sind verschiedenste Mechanismen denkbar.

Es sollte in diesem Ansatz ein möglichst einfaches Modell gewählt werden, um erste richtungsweisende Informationen zur Planung weiterer Untersuchungen zu gewinnen. Eine abschließende Aussage kann erst nach eingehenden weiteren Untersuchungen getroffen werden. Gegenstand weiterer Untersuchungen könnte sein: Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Uracilnucleotid-Konzentrationen unter Bedingungen länger andauernder Nahrungskarenz sowie die Auswirkung steigender definierter Glucocorticoid-Konzentrationen auf die Uracilnucleotide in der Rattenleber unter einem Monitoring der Genexpression von an der Synthese der Uracilnucleotide beteiligten Enzymen. Jedoch erscheint aufgrund des Ausbleibens einer signifikanten Erhöhung der Uracilnucleotide in adrenaletomierten Vitamin B6-Mangeltieren im Vergleich zu den Mangeltieren ohne Eingriff in die Glucocorticoid-homöostase die Hypothese eines Glucocorticoid-vermittelten Effektes eher unwahrscheinlich.

7.3. Membranglykosylierung der Rattenleber unter dem Einfluss eines Vitamin B6-Mangels und konsekutivem Überangebot von Uracilnucleotiden

Im Teilprojekt III sollte die Auswirkung eines erhöhten Uracilnucleotid-Pools auf die Synthese von Membranglykoproteinen untersucht werden. Die zu Beginn der Glykananalytik durchgeführte Monosaccharidanalyse ermöglichte es, den Oligosaccharidgehalt der Membranproteine zu bestimmen. Es konnten erste Rückschlüsse auf die Struktur der N-Glykane gezogen werden. Bei der Analyse der Rohmembranglykane zeigte sich ein Verhältnis von Mannose zu N-Acetylglucosamin von 3 : 1,4 bzw. 3 : 1,8. Dies deutete auf einen hohen Gehalt an mannosereichen Strukturen hin. Das Verhältnis Mannose/ N-Acetylglucosamin liegt bei einem biantennären Oligosaccharid als kleinste komplexe Glykanstruktur bei 3 : 4, bei höherer Komplexität nimmt bei gleichbleibendem Mannoseanteil der Anteil an N-Acetylglucosamin zu (s.u. 2.2.1.). Es bestand nun zum einen die Möglichkeit, dass auf den Oberflächen der Rattenleber überproportional mannosereiche Strukturen und hybride Oligosaccharide exprimiert wurden, wahrscheinlicher war jedoch, dass in der Rohmembranaufarbeitung ein sehr hoher Anteil an Membranen des ER und Golgi-Apparates mit entsprechenden mannosereichen Glykanvorstufen (s.u. 2.2.4.) enthalten war, so dass der relative Anteil an komplexen Glykanen der Plasmamembran kaum zu detektieren war. Um diese These zu belegen, erfolgte die Massenbestimmung der neutralen N-Glykane der Rohmembranproteine mit MALDI-TOF-MS. Es zeigten sich, wie vermutet, vornehmlich mannosereiche Strukturen. Die ebenfalls detektierten komplexen Oligosaccharide machten bei semiquantitativer Auswertungsmöglichkeit nur einen im Vergleich geringen Anteil des Gemisches aus. Eine weitere Analyse der komplexen Glykane aus Rohmembranaufarbeitungen war somit nicht sinnvoll und wurde zugunsten der aufwendigeren Aufarbeitung von Plasmamembranen verlassen. In der Monosaccharidanalyse von Plasmamembranglykanen zeigte sich ein Verhältnis von Mannose zu N-Acetylglucosamin von ca. 3 : 3,5, so dass durch die Plasmamembranaufarbeitung der Anteil an mannosereichen Strukturen und damit die vermutliche Verunreinigung mit Membranen des ER und Golgi-Apparates stark reduziert werden konnte. Diese Ergebnisse zeigten zudem, dass eine Berechnung des Oligosaccharidgehaltes der Membranproteine

anhand des Mannosegehaltes nur eine Näherung darstellt. Bei großen Anteilen mannosereicher oder hybrider Strukturen, die zusätzlich zur Kernregion Mannosen tragen, kann der errechnete Oligosaccharidgehalt höher als der tatsächliche liegen. Trotz der durch Vitamin B6-Mangel induzierten Konzentrationserhöhungen an Uracilnucleotiden auf ein Vielfaches der Normalwerte traten keinerlei Veränderungen des Glykosylierungsspektrums auf. Auch die Sialylierung der N-Glykane zeigte keinerlei Veränderung unter Vitamin B6-Mangel. Diese Ergebnisse lagen im Widerspruch zu *in vitro*-Untersuchungen, in denen eine Beeinflussung der Glykosylierung durch erhöhte Uracilnucleotid-Konzentrationen in der Zelle gezeigt wurden: Pels Rijcken et al. (1995) induzierten in Rattenhepatozyten einen Anstieg der Konzentrationen an UTP, UDP, UDP-Hexosaminen, UDP-Hexosen und CTP durch Inkubation der Zellen mit Uridin oder Cytidin [42]. Die Konzentration von CMP-NANA blieb trotz 3-facher Erhöhung des CTP-Pools unverändert. Die gemessenen Faktoren der Konzentrationserhöhungen der Nucleotide und Nucleotidzucker waren vergleichbar mit den in dieser Arbeit durch Vitamin B6-Mangel verursachten Konzentrationserhöhungen. Die Messung der Aufnahme von ³H-markierten Zuckern in Zell-assoziierte Glykokonjugate und Sekretionsproteine nach 16 h Vorinkubation mit Uridin zeigte eine vermehrte Aufnahme von N-Acetylhexosaminen in Sekretions- und Zell-assoziierte Glykoproteine, während der Sialylierungsgrad abnahm. Ein möglicher Mechanismus für die Abnahme des Sialylierungsgrades wurde 1984 von Cacan et al. [90] und 1980 von Carey et al. [91] beschrieben: Der Transport von CMP-NANA über den Golgi-Apparat wird durch Substratanaloga wie CMP oder UDP-Zucker gehemmt. Somit steht CMP-NANA im Golgi-Lumen bei hohen Konzentrationen an Substratanaloga in vermindertem Maße zur Verfügung. Auch in der Arbeit von Grammatikos et al. (1998) [43] an rekombinanten, eine Interleukin-2-Variante exprimierenden BHK-Zellen zeigte sich nach Vorbehandlung der Zellen mit Glucosamin und Uridin ein Anstieg der intrazellulären UDP-Zuckerpools. Es kam jedoch zu keiner Beeinflussung des Sialylierungsgrades, während sich das Glykosylierungsmuster des Interleukin-2 zu höhergradig verzweigten Antennen verschob. Nach Normalisierung des Nucleotidpools auf physiologische Werte zeigte sich eine Rückkehr zum ursprünglichen Glykanmuster. Der Sialylierungsgrad zeigte sich in der vorliegenden Arbeit unbeeinflusst. Eine im Glykan-Engineering rekombinanter Glykoproteine eingesetzte Methode ist die Erzeugung eines Shifts der Glykosylierung hin zu höherer Komplexität der Glykane durch Zugabe von Ammonium in das Zellmedium [92]. Es konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der Ammoniumkonzentrationen bei CHO-Zellen zu einem Anstieg von UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc führte [93]. In weiteren Untersuchungen konnte nachgewiesen

werden, dass der im Ammonium enthaltene Stickstoff in Monosaccharide eingebaut wurde. 60-70% des gesamten Stickstoffs der Monosaccharide bestanden aus inkorporiertem Ammonium-Stickstoff [94]. Diese Ergebnisse konnten Valley et al. (1999) an IL-2 bildenden BHK-Zellkulturen bestätigen [95]. In Zusammensicht mit der Arbeit von Grammatikos et al. (1998) [43] führte auch die Zugabe von Ammonium über eine Erhöhung des intrazellulären Uracilnucleotid-Pools zur Erhöhung der Komplexität der N-Glykane von Glykoproteinen.

Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der o. g. Befunde im Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit liegt sehr wahrscheinlich an den unterschiedlichen Versuchsbedingungen. Grammatikos et al. und Pels Rijcken et al. führten *in vitro*-Untersuchungen durch, zudem wurde die Erhöhung der Uracilnucleotid-Konzentrationen auf verschiedenen Wegen erreicht. Während der hier untersuchte Vitamin B6-Mangel über bisher unklare Mechanismen zu einer Erhöhung von Uracilnucleotiden führt, wurden in den *in vitro*-Versuchen gezielt Ausgangssubstrate im Überschuss angeboten, um die Erhöhung des Uracilnucleotid-Pools zu erreichen.

Pels Rijcken et al. (1993) [48] beschrieben im Anschluss an *in vitro*-Untersuchungen an Rattenhepatozyten das Modell der intrazellulären Kompartimentierung des Pyrimidinnucleotid-Pools. Durch radioaktive Markierung der Vorstufen der *de novo*-Synthese (Orotat) und des Salvage-Pathways (Uridin) konnte die Utilisierung der entstehenden Uracilnucleotide verfolgt werden. Pels Rijcken et al. zeigten, dass die im Salvage-Pathway gebildeten Nucleotide vornehmlich zur RNA-Synthese herangezogen wurden, während in der *de novo*-Synthese entstandene Uracilnucleotide vornehmlich in die Glykosylierung gingen (s.u. 2.1.6.).

Unter Bedingungen des Überangebotes von Uridin schienen *in vivo* die Uracilnucleotide aus dem Salvage-Pathway über den Overflow-Pool auch in die Proteinglykosylierung einzugehen (s.u. 2.1.6.). Möglicherweise spielt der Ursprung der Uracil-nucleotiderhöhung auch in der Utilisierung der Uracilnucleotide eine Rolle. Einen weiteren Erklärungsansatz für die Diskrepanz der Befunde bietet der gradientengetriebene, UMP-abhängige Transport von Glykanbausteinen über die Membran des Golgi-Apparates. Die cytosolisch gebildeten UDP-Zucker werden über Antiportsysteme im Austausch gegen UMP in das Golgi-Lumen transferiert, um dort für die Glykosylierung von Proteinen zur Verfügung zu stehen. Beschrieben sind u.a. folgende Antiporter: UDP-Gal/UMP, UDP-GlcNAc/UMP, UDP-GA/UMP und UDP-GalNAc/UMP [96-98]. Bei einem ausserhalb des Golgi-Apparates bestehenden Überschuss an UMP könnte eine Störung des gradientengetriebenen Antiporters auftreten, was innerhalb des Golgi-Lumens zu einem verminderten Substratangebot

und somit im Verhältnis zum intrazellulären Überangebot zu einer verminderten Glykosylierungsrate führen könnte.

Das Sialylierungsmuster der Oligosaccharide der Plasmamembran war im Vitamin B6-Mangel und in der Kontrollgruppe gleich. Es zeigte sich in beiden Gruppen eine ungewöhnlich hohe Anzahl an Sialinsäuren bei bi- und triantennären Glykanstrukturen. So fanden sich biantennäre Oligosaccharide mit drei und mit vier Sialinsäuren, sowie triantennäre Glykane mit vier und mit fünf Sialinsäuren. Ungefähr 40% der gefundenen Zuckerstrukturen zeigten eine Übersialylierung mit ein- bis drei Sialinsäuren mehr als Antennen des Glykans (s. Tab. 11). In der Ratte sind biantennäre, dreifach sialylierte Glykane bei verschiedenen Serumproteinen (Hämopexin, Serumtransferrin, und T-Kininogen) [99-101] sowie in der Zellkultur [102] beschrieben worden. Im bovinen plasmatischen Gerinnungssystem konnten bei Faktor X [103] biantennäre trisialylierte Glykane, bei Prothrombin [104] biantennäre tetrasialylierte Glykane gezeigt werden. In CEA-CAM 1, einem transmembranären Zelladhäsionsprotein der Ig-Superfamilie in der Rattenleber, zeigten 20% der detektierten Zucker eine Übersialylierung mit biantennären, dreifach sialylierten und triantennären dreifach und vierfach sialylierten Glykanen. Durch spezifische enzymatische Verdaus konnte in übersialylierten Strukturen sowohl α -2,3-gebundene Sialinsäuren, als auch α -2,6-gebundene Sialinsäuren indirekt nachgewiesen werden [105]. Im bovinen Fetuin konnten sogar fünffach sialylierte triantennäre Oligosaccharide [106], in der γ -Glutamyltranspeptidase aus der Rattenleber ein triantennäres Oligosaccharid mit sechs Sialinsäuren [107] nachgewiesen werden. Weiterführende Analysen mittels bindungsspezifischer Verdaus werden zur genaueren Charakterisierung der in dieser Arbeit gezeigten übersialylierten Strukturen notwendig sein.

Während Arbeiten *in vitro* eine Regulation der Proteinglykosylierung und Sialylierung durch die intrazelluläre Nucleotidzucker-Konzentration zeigen konnten, sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit für eine strenge Regulation *in vivo*.