

schen Ärzteschaft festgestellt hat, eine qualifizierte Schmerztherapie werde nicht durch bestehende Gesetze beeinträchtigt, möchte das Bundesgesundheitsministerium noch in diesem Jahr den Ärzten entgegenkommen und die Betäubungsmittelverschreibungsverordnung vereinfachen. Danach soll etwa die Anlage 3 nicht mehr in drei Abschnitte A, B und C geteilt werden, sondern nur noch eine einzige Liste enthalten, auf der alle verschreibungsfähigen Betäubungsmittel in alphabetischer Reihenfolge zu finden sind. Wegfallen sollen die Pflicht, Zahlenangaben in Worten zu wiederholen, sowie die erforderliche Anzeige bei der zuständigen Landesbehörde, wenn die Höchstmenge eines Betäubungsmittels überschritten wird. Darüber hinaus soll es dem Arzt in Zukunft ermöglicht werden, im Notfall ein Betäubungsmittel auf einem gewöhnlichen Rezept auszustellen.

Schmerzverordnung gefordert

Den Schmerztherapeuten gehen diese geplanten Änderungen der Betäubungsmittelverschreibungsverordnung

Neue Indikation für Lenograstim

Ersatz für die Knochenmarktransplantation?

Die Europäische Kommission hat die Marktzulassung für Lenograstim (Granocyte®) zur Mobilisierung von peripheren Blutstammzellen (PBPC) für autologe Transplantationen erteilt. Die Zulassung erfolgte auf der Grundlage mehrerer Studien unter Verwendung von Lenograstim zur PBPC-Mobilisierung und gilt für die Mehrheit der europäischen Mitgliedstaaten.

Die Mobilisierung peripherer Blutstammzellen (PBPC) ist ein an Krebspatienten durchgeführtes medizinisches Verfahren. Dabei werden Blutstammzellen (Vorläufer der normalen Blutzellen) gewonnen, so daß sie dem

aber nicht weit genug. Sie befürchten nämlich, Schmerzpatienten könnten weiterhin allein durch die Bezeichnung Betäubungsmittel, die sie auf dem Rezept lesen, irritiert werden oder sich sogar als Süchtige diskriminiert fühlen. Deshalb fordern Schmerztherapeuten, man solle Arzneien zur Behandlung von Schmerzen aus dem Betäubungsmittelgesetz streichen und in eine neu zu formulierende Schmerzverordnung aufnehmen. Trotzdem, so sagen sie, sind die geplanten Erleichterungen ein Schritt in die richtige Richtung, möglichst vielen Schmerzpatienten eine qualifizierte Therapie mit Morphin zu ermöglichen.

Quelle

Prof. Dr. Dr. Christa Habrich, Ingolstadt, Prof. Dr. Ludwig Brandt, Wuppertal, Prof. Dr. Michael Zenz, Bochum, Prof. Dr. Geoffrey W. Hanks, Bristol/Great Britain, Prof. Dr. Eberhard Klaschik, Bonn, Dr. Michael Strumpf, Bochum, Dipl.-Psych. Anne Willweber-Strumpf, Bochum, Prof. Dr. Dr. Klaus Lehmann, Köln, Münchner Medizinische Wochenschrift (MMW)-Arzneimittelpreis, Morphin (MST(r)): Arzneimittel des Jahres '97, Geschichte, Stellenwert und Perspektiven, Deutsches Medizinhistorisches Museum, Ingolstadt, 22. März 1997.

Die Ausstellung „In Morpheus' Armen – Morphin als Rauschdroge und Schmerzmittel“ ist noch bis zum 4. Mai 1997 im Deutschen Medizinhistorischen Museum in Ingolstadt zu besichtigen.

Dr. Michael Stein, München

Patienten nach einer hochdosierten Chemotherapie bei soliden Tumoren oder zur Behandlung von Patienten mit rezidivierenden oder refraktörichen bösartigen Bluterkrankungen reinfundiert werden können. Lenograstim wird

dem Patienten zur Stimulierung der Produktion und Ausschüttung von Stammzellen in das periphere Blut verabreicht. Die Zellen werden aus dem Blutstrom des Patienten entnommen und dem Patienten nach der Chemotherapie zur Unterstützung des hämatopoetischen Systems zurückgegeben. Im Vergleich zur Knochenmarktransplantation besteht bei der PBPC-Transplantation ein niedriges Infektions- und Blutungsrisiko und der Krankenhausaufenthalt wird verkürzt. Die PBPC-Transplantation erfordert keine Vollnarkose und ist weniger schmerzhaft. Auch sie macht es dem Arzt möglich, hohe Dosen einer Chemotherapie anzuwenden. Experten zufolge wird dieses Verfahren wahrscheinlich in vielen Fällen die Knochenmarktransplantation ersetzen.

Rekombinanter Wachstumsfaktor

Lenograstim wurde erstmalig 1993 zugelassen und ist der einzige glykosylierte, humanidentische, rekombinante Granulozytenkolonien-stimulierende-Faktor (rHuG-CSF), der in Europa verfügbar ist. Durch die Unterstützung der Wiederherstellung normaler Neutrophilenspiegel (weiße Blutzellen) senkt Lenograstim das Risiko von Infektionen und trägt dazu bei, daß Patienten die optimalen Dosen der Chemotherapie erhalten können. Darüber hinaus verkürzt Lenograstim die Dauer der Neutropenie, die zu einer Verringerung der neutropenieinduzierten Morbidität führt. Lenograstim wird gut vertragen; selten wird über geringfügige Nebenwirkungen berichtet, zu denen leichte bis mäßige Knochenschmerzen gehören, die jedoch mit Analgetika (z. B. Paracetamol) einfach behandelt werden können.

Quelle

Presseinformationen der Rhône-Poulenc Rorer GmbH, Köln.

Proteinglykosylierung

Struktur, Funktion und pharmazeutische Bedeutung

Von Gerd Reuter und Hans-Joachim Gabius, München*

Eigenschaften und Funktionen von Proteinen lassen sich nicht automatisch aus ihrer Sequenz ablesen. Modifizierungen während und nach der Translation sind häufig erforderlich, um die korrekte Faltung und Aggregation dieser Makromoleküle, den zielgerichteten Transport zu ihrem intra- oder extrazellulären Bestimmungsort und funktionelle Aspekte zu gewährleisten. So hat z. B. die reversible Phosphorylierung wesentliche Bedeutung für die Regulation von Enzymaktivitäten und Zellproliferation. Die häufigste Form der kovalen-

ten Modifizierung von Proteinen ist die Glykosylierung. Wie die Phosphorylierung ist sie bei allen Tieren und Pflanzen zu finden, was vermuten läßt, daß ihr eine grundlegende physiologische Bedeutung zukommt.

Durch die enzymatische Glykosylierung wird das Peptidgerüst in der Regel um Oligosaccharide ergänzt, was die strukturelle Variabilität des endgültigen Produktes erhöht. Essentielle Funktionen dieser Glykosylierung können von der Änderung unspezifischer physikochemischer oder biochemischer Parameter wie Löslichkeit des Proteins oder seine Zugänglichkeit für Proteasen bis hin zur Vermittlung von spezifischen Erkennungsprozessen reichen, an denen als Rezeptoren für die Zuckerliganden Lektine, Antikörper oder Enzyme beteiligt sind [1–3]. Daher steht die Geschichte der Erforschung der Glykoproteine, die Gegenstand der folgenden Ausführungen sind, auch in enger Beziehung zur Lektinologie [1, 4, 5] (Tab. 1). Die zielbewußte Nutzung von Lektinen und Zuckerliganden wie Neoglykoproteinen weist auf eine Reihe möglicher pharmazeutischer Anwendungsgebiete hin, die schon an anderer Stelle erläutert sind [1, 6, 7].

Struktur und Biosynthese

Oligosaccharide sind primär hydrophile, in begrenztem Rahmen flexible Struktureinheiten [8]. Noch wenig be-

Tab. 1: Historische Entwicklung der Erforschung von (Sialo-) Glykokonjugaten und Lektinen.

1805	erste Beschreibung von Mucinen	Gmelin
1865	Mucin besteht aus Protein- und Zuckeranteil	Eichwald
1888	Entdeckung von agglutinierender Aktivität in Rizinussamen	Stillmark
1927/1936	Entdeckung von Sialinsäuren in Gangliosiden und Mucinen durch Farbreaktionen	Walz; Levene und Landsteiner; Blix
1940	aktive Substanz für Blutgruppe A ist ein Glykopeptid	Landsteiner und Harte
1941	Kristallisierung von N-Acetylneuraminsäure, Bezeichnung Neuraminsäure	Klenk
1942/1947	Sialidase als „Rezeptor-zerstörendes Enzym“ von Influenza-A-Viren entdeckt	Hirst; Burnett
1949	Entdeckung von UDP-Glucose	Leloir
1952	Kohlenhydrate als determinante Gruppen der ABH-Blutgruppenantigene identifiziert	Morgan und Watkins
1954	Einführung der Bezeichnung „Lektin“ für Antikörper-ähnliche Moleküle	Boyd

* Herrn Prof. Dr. Werner Reutter zum 60. Geburtstag gewidmet.

kannt ist ihre herausragende Fähigkeit, als biologische Informationsträger zu fungieren. So sind für ein Hexasaccharid theoretisch mehr als 10¹² unterschiedliche Strukturvarianten möglich [9], wobei Strukturvarianten, die z. B. durch Veresterung von OH-Gruppen des Oligosaccharids entstehen können, nicht einmal berücksichtigt sind. Diese Zahl übertrifft das entsprechende Potential der Proteine und Nucleinsäuren um mehrere Größenordnungen, auch wenn die theoretisch ableitbare Vielfalt der Glykane in der Realität eingeschränkt ist. Dies ist dadurch bedingt, daß nicht für jede der möglichen glykosidischen Bindungen die entsprechende Glykosyltransferase im Organismus verfügbar zu sein scheint, die Nucleotid-aktivierte Monosaccharideinheiten in Glykane einbauen kann. Mit UDP-Glucose ist der erste Vertreter dieser Klasse 1949 entdeckt worden (Tab. 1). Es ist somit nicht verwunderlich, daß die erweiterten Möglichkeiten der Strukturanalyse des Glykanteils von Glykoproteinen, Modifizierungen wie Phosphorylierung, Sulfatierung oder Acetylierung einschließlich, nicht nur deren Katalogisierung erlauben, sondern auch die nachfolgenden Funktionsbeschreibungen vorantreiben. Die ganze Breite der Variationsmöglichkeiten ist vermutlich noch längst nicht vollständig erfaßt, wie das Auffinden stets neuer Oligosaccharidsequenzen belegt [10–12]. Hiermit wird auch ver-

ständig, daß die Strukturanalyse einen Grundpfeiler für das Verständnis der biologischen Funktion der Proteinglykosylierung darstellt.

N-Glykosylierung

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen N- und O-glykosidisch an das Protein gebundenen Kohlenhydratketten, die Asparagin (Asn) bzw. Serin oder Threonin (Ser/Thr) als Anknüpfungspunkte nutzen (Abb. 1). Die alleinige Anheftung von N-Acetylglucosamin an Serin/Threonin ist eine von mehreren möglichen Sonderformen der kovalenten Kohlenhydrat-Protein-Bindung, die bei Zytoplasma- und Zellkern-Proteinen auftritt [10]. Als Signal für die Asparaginmodifizierung dient die Sequenz Asn-X-Ser/Thr. Der Aminosäure in der mittleren variablen Position und ihrer räumlichen Zugänglichkeit kommt große Bedeutung für die Nutzung dieser Sequenz als Erkennungsmerkmal zu [13, 14]. Auf das N-Atom der Säureamidfunktion der Aminosäure Asparagin innerhalb dieser Akzeptorsequenz wird im Lumen des endoplasmatischen Retikulums eine evolutionär unverändert gebliebene Oligosaccharid-Grundstruktur von einem Lipidanker (Dolicholdiphosphat) durch eine entsprechende Transferase übertragen [11, 13, 15, 16]. Nach der Verknüpfung mit dem Protein

wird dieser gemeinsame Vorläufer durch schrittweise Abspaltung von Glucose- und Mannoseeinheiten zu der für alle N-Glykane typischen Grundstruktur prozessiert (Abb. 2).

Priv.-Doz. Dr. Gerd Reuter



(Jg. 1949) studierte Chemie an der Universität Münster. Nach der Diplomarbeit über die Synthese von Halogenzuckern promovierte er Anfang 1977 über Proteoglykane aus Schweineaorta. Nach anschließendem Aufenthalt als DFG-Stipendiat im Organisch-Chemischen Laboratorium der Universität Utrecht, Niederlande, mit Arbeiten über Chemie und Analytik von Sialinsäuren, ab 1979 am Biochemischen Institut der Medizinischen Fakultät der Universität Kiel und dort 1989 Habilitation auf dem Gebiet der Glykokonjugate mit Lehrbefugnis für das Fach Biochemie. Seit 1994 am Institut für Physiologische Chemie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München mit dem Arbeitsschwerpunkt der strukturellen und funktionellen Analyse von Glykokonjugaten und ihren Rezeptoren.

Prof. Dr. Hans-Joachim Gabius



(Jg. 1955) studierte Biochemie in Hannover und San Diego als Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes. Promotion 1982 nach Arbeit am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin; nach dortiger Assistentenzeit und Auslandsaufenthaltigen Habilitation für das Fach Biochemie 1989 in Göttingen. 1991 Berufung auf die C3-Professur für Glykobiologie und angewandte Tumorektologie an das Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Marburg. Seit 1993 Ordinarius für Physiologische Chemie der Universität München. Träger mehrerer wissenschaftlicher Auszeichnungen (1983 Otto-Hahn-Medaille, 1988 Preis der Dr.-Carl-Duisberg-Stiftung und 1990 Paul-Martini-Preis).

Anschrift: Prof. Dr. H.-J. Gabius, Institut für Physiologische Chemie, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstraße 13, 80539 München

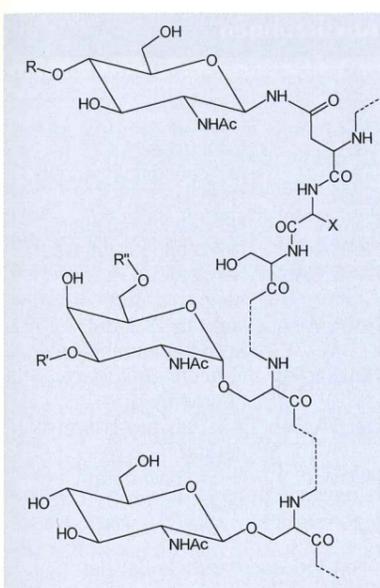


Abb. 1: Beispiele kovalenter Kohlenhydrat-Protein-Bindungen. Dargestellt sind die für N-glykosidisch gebundene Glykane typische Anheftung an das Protein über β -N-Acetylglucosamin, das an den Amidstickstoff von Asparagin in der Peptidsequenz Asn-X-Ser gebunden ist, und die für O-Glykane typische α -glykosidische Bindung von N-Acetylglucosamin an Serin oder Threonin. Die dritte aufgeführte Bindungsart von β -N-Acetylglucosamin an die OH-Gruppen von Serin oder Threonin ist bei intrazellulären Glykoproteinen gefunden worden. In den beiden erstgenannten Fällen sind die an das Peptid gekoppelten Saccharide in der Regel Teil von Glykanketten, wie in Abb. 5 bis 7 dargestellt, bei der dritten Variante ist bislang keine über das Monosaccharid hinausgehende Glykanstruktur bekannt. Es wird für diese Art der Modifizierung eine der Phosphorylierung ähnliche Funktion diskutiert. An einem Proteinmolekül können, wie schematisch wiedergegeben, mehrere Saccharidketten auch unterschiedlicher Typen gebunden sein.

Der biologische Sinn dieser scheinbaren Verschwendung, die vorgefertigte Einheit partiell wieder abzubauen, ist lange rätselhaft geblieben. Heute geht man begründet davon aus, daß besonders die Präsenz der Glucosemoleküle Teil einer Qualitätskontrolle ist [17]. Das Zusammenspiel biochemischer und topologischer Faktoren garantiert die notwendige Präzision beim Aufbau der für die Funktion des Proteins erforderlichen Tertiär- und Quartärstruktur. Wie in Abbildung 3 schematisch zusammengefaßt, sind an dieser Qualitätskontrolle zwei Lektine und mehrere Enzyme beteiligt. Ist das Glykoprotein nicht korrekt gefaltet, so bindet es an die im Lumen des endoplasmatischen

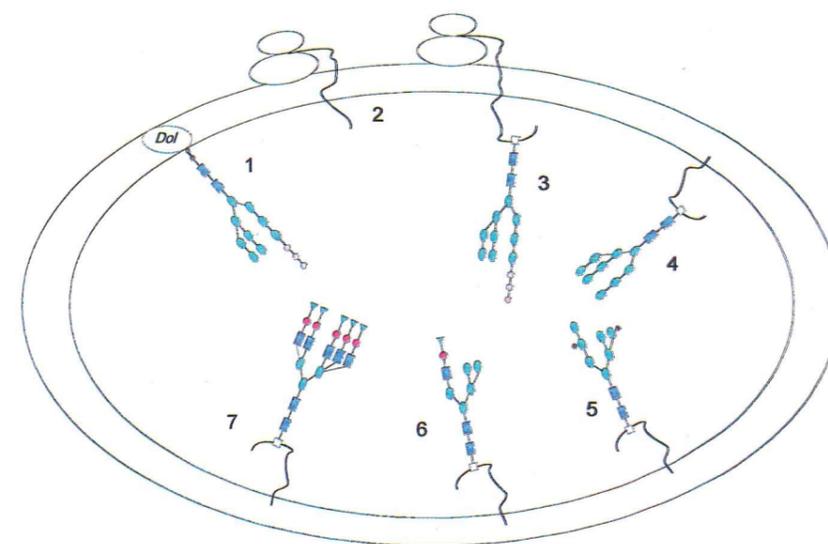


Abb. 2: N-Glykosylierung von Proteinen. Ein an Dolicholdiphosphat gebundenes Mannose-reiches und Glucose-haltiges Oligosaccharid (1) wird während der Biosynthese des Proteins an den Ribosomen (2) auf Asparagin innerhalb einer geeigneten Asn-X-Ser/Thr-Sequenz übertragen (3). Dieses Glykan kann dann zu verschiedenen Strukturen modifiziert werden, dem high-mannose Typ (4), dem Hybrid-Typ (6) oder dem komplexen Typ (7). Mit angegeben ist der Weg der 6-OH-Phosphorylierung von Mannose, die ein Signal für den Lektin-abhängigen Transport bestimmter Proteine zu den Lysosomen ist (5). Die Reihenfolge und Verknüpfungsart der Zucker und die Anomerie jeder glykosidischen Bindung innerhalb der Glykanstrukturen sind in Abb. 4 wiedergegeben.

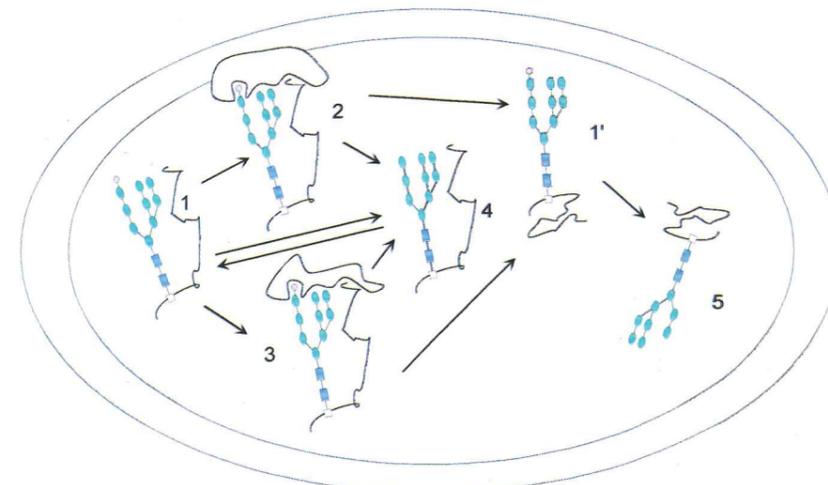


Abb. 3: Kontrolle der Reifung von Glykoproteinen im endoplasmatischen Retikulum. Nach Übertragung der Zuckerkette von Dolicholdiphosphat auf das Protein werden schrittweise zwei Glucosemoleküle abgespalten, was zu einer monoglucosylierten Zwischenstufe führt (1). Diese wird vom membranständigen Lektin Calnexin (2) oder vom im Lumen befindlichen Lektin Calreticulin (3) erkannt. Auf die Zucker-Protein-Interaktion folgt eine Protein-Protein-Wechselwirkung. Beide Lektine sind als molekulare Chaperone an der korrekten Faltung des Glykoproteins beteiligt. Wird die Assoziation mit einem der beiden Lektine irrtümlich umgangen oder nur einen beschränkten Zeitraum aufrechterhalten, kann die Glucosidase II das Kohlenhydrat-Erkennungssignal für diese Chaperone aus der Glykankette entfernen, so daß kein weiteres Andocken möglich ist (4). Sollte die räumliche Struktur des Glykoproteins jedoch noch nicht korrekt sein, so wird die irreguläre Faltung noch vor dem weiteren Transport aus dem endoplasmatischen Retikulum hinaus von der UDP-Glucose:Glykoprotein-Glycosyltransferase erkannt. Die Zuckerkette wird selektiv reglucosyliert, was die weitere Korrekturarbeit durch Calnexin bzw. Calreticulin ermöglicht (1, 2, 3). Nach ordnungsgemäßer Faltung erfolgt die Dissoziation des Glykoproteins von den Lektinen (1'), und das Erkennungssignal für die beiden Chaperone wird auf dieser Stufe irreversibel durch eine endo-Mannosidase abgespalten (5). Nach Durchlaufen dieser Qualitätskontrolle erfolgt nun der weitere Transport zum Golgi-Komplex.

Tab. 1 (Fortsetzung)

1955/1956	N-Acetylneuraminsäure ist das Kondensationsprodukt von N-Acetylglucosamin bzw. N-Acetylmannosamin und Pyruvat	Gottschalk; Zilliken und Glick
1960	Beschreibung von Kohlenhydraten in Plasmamembranen von Zellen	Cook; Herzenberg
1962	vollständige Strukturaufklärung der N-Acetylneuraminsäure	Kuhn und Brossmer
1962	Mikroheterogenität von Glykoproteinen entdeckt	Schmid
1963	Entdeckung von Dolicholen	Hemming
1965/1966	Lokalisation von Glykosyltransferasen im endoplasmatischen Retikulum	Molnar; Schachter
1974	Isolierung des ersten Säugerlektins	Ashwell
1979	Reinigung endogener Liganden für pflanzliche Lektine	Rüdiger
1984	Isolierung von Lektinen aus Tumoren	Gabius; Raz und Lotan
1986	erste vollständige unabhängige Synthese der N-Acetylneuraminsäure	Danishevsky
1986/1988	Einführung der Lektindetektion durch Antikörper und Neoglykoproteine in der Tumordiagnostik	Gabius und klinische Kollegen
1988	Nomenklatur- und Abkürzungsvorschlag für Sialinsäuren	Reuter und Schauer

Retikulums befindlichen Lektine Calnexin und Calretikulin. Sie erkennen spezifisch Glykoproteine mit nicht ordnungsgemäßer Proteinkonformation, die einen Glucoseresit tragen und sich daher noch im Stadium der Modifizierung der Glykanketten befinden. Das betroffene Glykoprotein kann wegen der Assoziation mit den beiden Lektinen nicht vom endoplasmatischen Retikulum zur weiteren Glykanprozessierung in den Golgi-Komplex transportiert werden. Seine Tertiär- und Quartärstrukturen können aber auf dieser

Stufe noch korrigiert werden. Calnexin und Calretikulin haben damit die Funktion molekularer Chaperone.

Die Bedeutung der Glucosylierung wird durch die Präsenz eines besonderen Enzyms in diesem intrazellulären Areal unterstrichen. Sollte die Glucosidase II verfrüht das Glucose-Erkennungssignal für Calnexin und Calretikulin abgespalten haben, so werden Glykoproteine, die ihre native Konformation noch nicht erreicht haben, durch die UDP-Glucose:Glykoprotein-Glucosyltransferase erneut glucosyliert

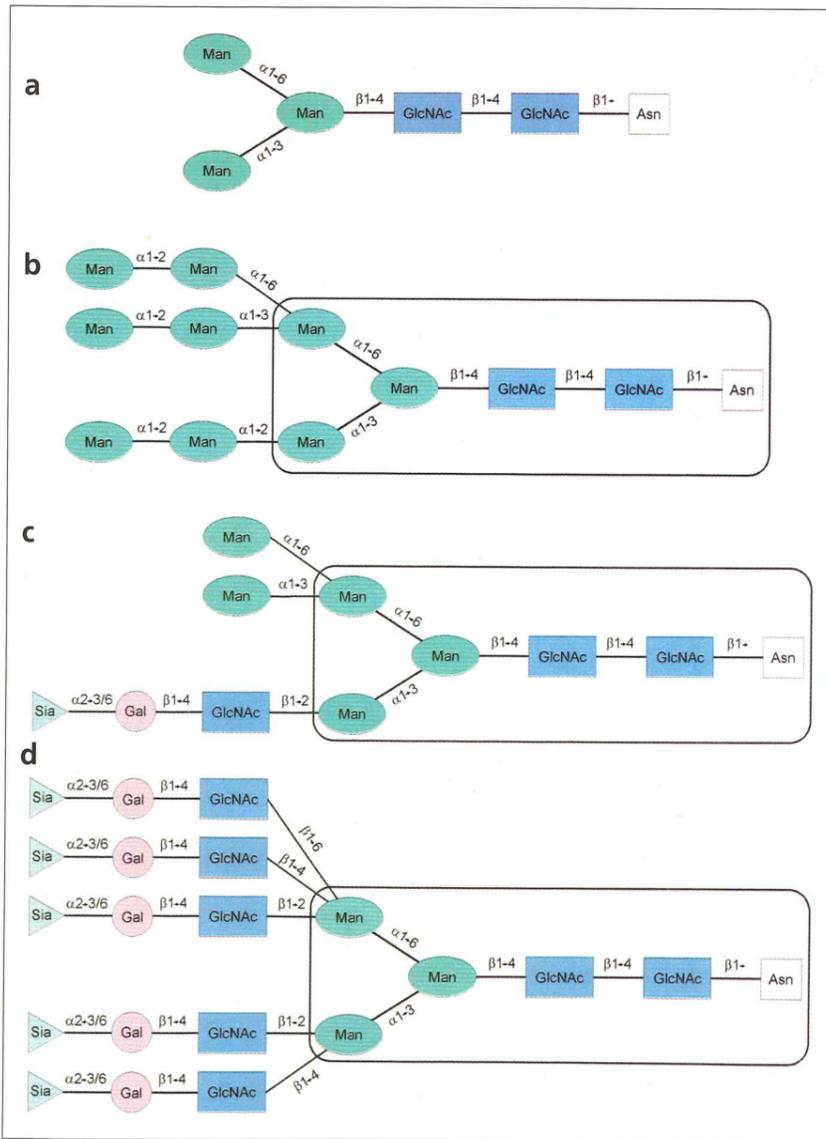


Abb. 4: Struktur von N-Glykanen. Allen N-Glykanen gemeinsam ist die sogenannte Core-Struktur (a), die auf dem in Abb. 2 gezeigten Weg weiter modifiziert werden kann zu dem high-mannose Typ (b), dem Hybrid-Typ, der am Core noch zwei zusätzliche Mannosereste und eine komplexe Kette besitzt (c), und dem komplexen Typ, der bis zu fünf Sialin-Gal-GlcNAc-Antennen tragen kann (d). Die zeitliche Reihenfolge, in der diese Antennen aufgebaut werden, ist in Abb. 5 angegeben. Nicht aufgeführt sind die zusätzlichen Möglichkeiten der Fucosylierung an dem N-Acetylglucosaminmolekül, das an Asparagin gebunden ist (vgl. Abb. 6), und/oder an einem N-Acetylglucosaminrest der komplexen Antennen.

Abkürzungen

Dol	Dolichol
Fuc	L-Fucose
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5,9Ac ₂	N-Acetyl-9-O-acetylneuraminsäure
Neu5,7,9Ac ₃	N-Acetyl-7,9-di-O-acetylneuraminsäure
Neu5Ac9Lt	N-Acetyl-9-O-L-lactylneuraminsäure
Neu5Ac2en	2,3-Dehydro-N-acetylneuraminsäure
Neu5Gc	N-Glykolyneuraminsäure
Xyl	Xylose

Alle Monosaccharide außer der L-Fucose liegen als D-Zucker vor.

Zur Struktur der Sialinsäuren siehe Abb. 12.

(Abb. 3). Dieses Enzym erkennt bevorzugt irregulär gefaltete Glykoproteine [18]. Tritt nach dieser Re-Glucosylierung mit Hilfe der erwähnten Chaperone eine ordnungsgemäße Strukturbildung des Proteins ein, so erfolgt die dann endgültige Abspaltung des Erkennungssignals und der Transport zum Golgi-Komplex, woran weitere Lektine wie ERGIC-53 beteiligt sind [3]. In diesem Stadium erfüllt der innere, unverändert gebliebene Bereich der Kohlenhydratkette die Aufgabe einer Postleitzahl in der zentralen Verteilungsstelle der Zelle. Angekommen im Golgi-Komplex wird diese Kernstruktur bei Tieren u. a. zu der Gruppe der typischen komplexen N-Glykane weiterverarbeitet (Abb. 4). Diese Schritte werden durch die Übertragung von Nucleotid-aktivierten Monosacchariden mit Hilfe spezifischer Glykosyltransferasen in einer festgelegten Reihenfolge katalysiert [11].

Die gebildeten Glykoproteine mit Zuckerketten des komplexen Typs sind keineswegs nur entwicklungs-geschichtliche Relikte ohne biologische Funktion. Überzeugende Belege für ihre vitale Rolle sind am Beispiel transgener Tiere erhalten worden. Wird die in Abbildung 5 aufgeführte N-Acetylglucosaminyltransferase I in knock-out (ko)-Mäusen ausgeschaltet, so wird die Bildung von Zuckerketten des komplexen Typs (Abb. 4) verhindert, und die Embryonalentwicklung endet am Tag 10 [19]. Nicht nur derart grundlegende

Eingriffe in die Proteinglykosylierung zeigen deutliche Auswirkungen. Eine Störung beim Einbau eines einzelnen Zuckers, der L-Fucose, führt zu gravierenden, klinisch faßbaren Symptomen, die die Infektionsabwehr betreffen (Leukozytenadhäsionsdefizienz-Syndrom, Typ II); diese Störung kann auch experimentell durch das gezielte Ausschalten einer L-Fucosyltransferase (L-Fucosyltransferase VII) erreicht werden [19]. Selbst eine so geringfügig erscheinende Modifizierung wie die 9-O-Acetylierung von Sialinsäuren kann von großer funktioneller Bedeutung sein. So führt die gezielte Erhöhung der enzymatischen De-O-Acetylierung dieses Zuckers in transgenen Mäusen zum Abbruch der Embryogenese schon auf früher Stufe [20]. Eine Veränderung oder sogar Blockierung der Biosynthese von Glykanketten kann experimentell außer durch gezielte Mutationseinführung in Tiere

(Etablierung von ko-Mutanten) auch durch den Einsatz modifizierter Substrate oder spezifischer Inhibitoren der entsprechenden Glykosyltransferasen erreicht werden [11, 21].

Der molekulare Aspekt der Glykosylierung verdient auch bei therapeutischer Anwendung entsprechender Produkte Aufmerksamkeit. Bei Glykoproteinen von möglichem pharmazeutischem Interesse wie Epoetin (Erythropoietin) oder t-PA, die aus Hefen, Pflanzen oder transgenen Tieren gewonnen werden, darf im Hinblick auf einen möglichen klinischen Einsatz nicht übersehen werden, daß Zuckerketten hochwirksame Antigene darstellen können. Da sich das Muster der Glykosylierung bei verschiedenen Organismen sehr stark unterscheidet, muß diesem Aspekt bei der Herstellung rekombinanter Glykoproteine besondere Beachtung geschenkt werden [22]. So produzieren pflanzliche Zellkulturen

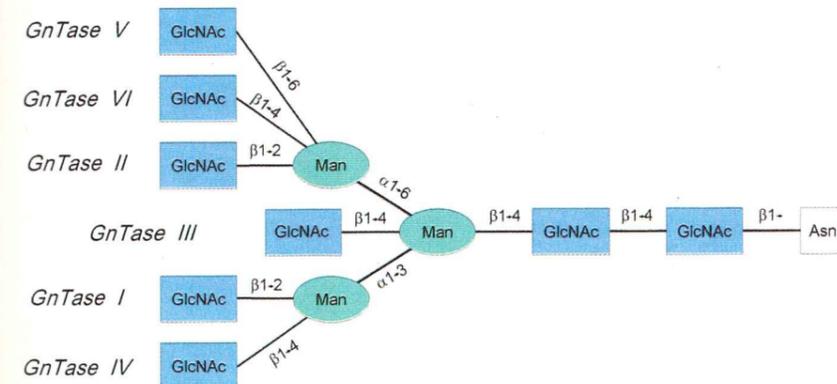


Abb. 5: Übertragung von N-Acetylglucosamin auf Mannosereste der Core-Struktur von N-Glykanen. Durch N-Acetylglucosaminyltransferasen (GnTase) werden GlcNAc-Reste von UDP-GlcNAc auf verschiedene OH-Gruppen der alpha-Mannosereste übertragen. Für die Bildung biantennärer Strukturen sind GnTase I und II erforderlich; für triantennäre Strukturen GnTase I, II, IV oder I, II, V; für Ketten mit vier Antennen GnTase I, II, IV und V und für solche mit fünf Antennen GnTase I, II, IV, V und VI. Die GnTase III hängt einen GlcNAc-Rest an die beta-glykosidisch gebundene Mannose des Cores („bisecting GlcNAc“).

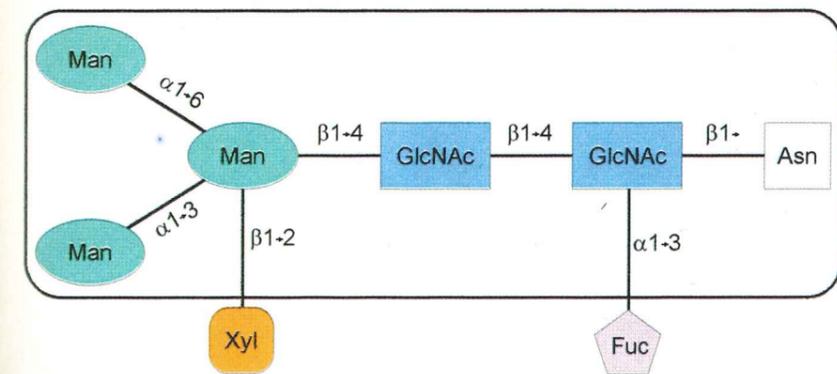


Abb. 6: Struktur eines stark immunogenen pflanzlichen N-Glykans. Der allen N-Glykanen gemeinsame Core-Bereich ist markiert.

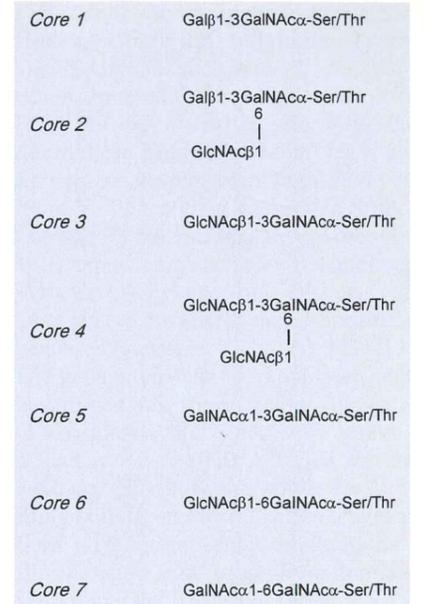


Abb. 7: Struktur der sieben bekannten Core-Bereiche von O-Glykanen. Diese Saccharidketten können durch die Übertragung weiterer Zucker, wie Fucose oder Sialinsäure, noch verlängert und damit modifiziert werden (vgl. Abb. 8).

das in Abbildung 6 dargestellte Epitop, das stark immunogen ist und daher die klinische Nutzung des Produktes erheblich einschränkt.

O-Glykosylierung

Außer der N-Glykosylierung kann als weitere Modifizierung die O-Glykosylierung stattfinden (Abb. 1). Sie ist unabhängig von Dolicholderivaten und beginnt in der cis-Golgi-Region [11, 16]. Der gesamte Aufbau der entsprechenden Ketten, für die Beispiele in Abbildung 7 aufgeführt sind, geschieht durch schrittweise Übertragung einzelner Nucleotid-aktivierter Monosaccharide in definierter Reihenfolge. Er entspricht somit den letzten Stadien der Biosynthese der N-Glykane. Beiden Glykanten ist gemeinsam, daß schließlich Sialinsäuren und L-Fucose in terminaler Position gebunden werden [23, 24]. Insgesamt ist die Variabilität der bisher gefundenen O-Glykanstrukturen, die z. B. auch durch Lewis-Epitope modifiziert sein können (Abb. 8), deutlich größer als die der N-Glykane. Derartige Saccharide im terminalen Bereich der einzelnen Antennen sorgen aber auch bei den N-Glykanen für eine erhebliche Variabilität. Aufgrund ihrer räumlich exponierten Stellung sind sie für Zucker-erkennende

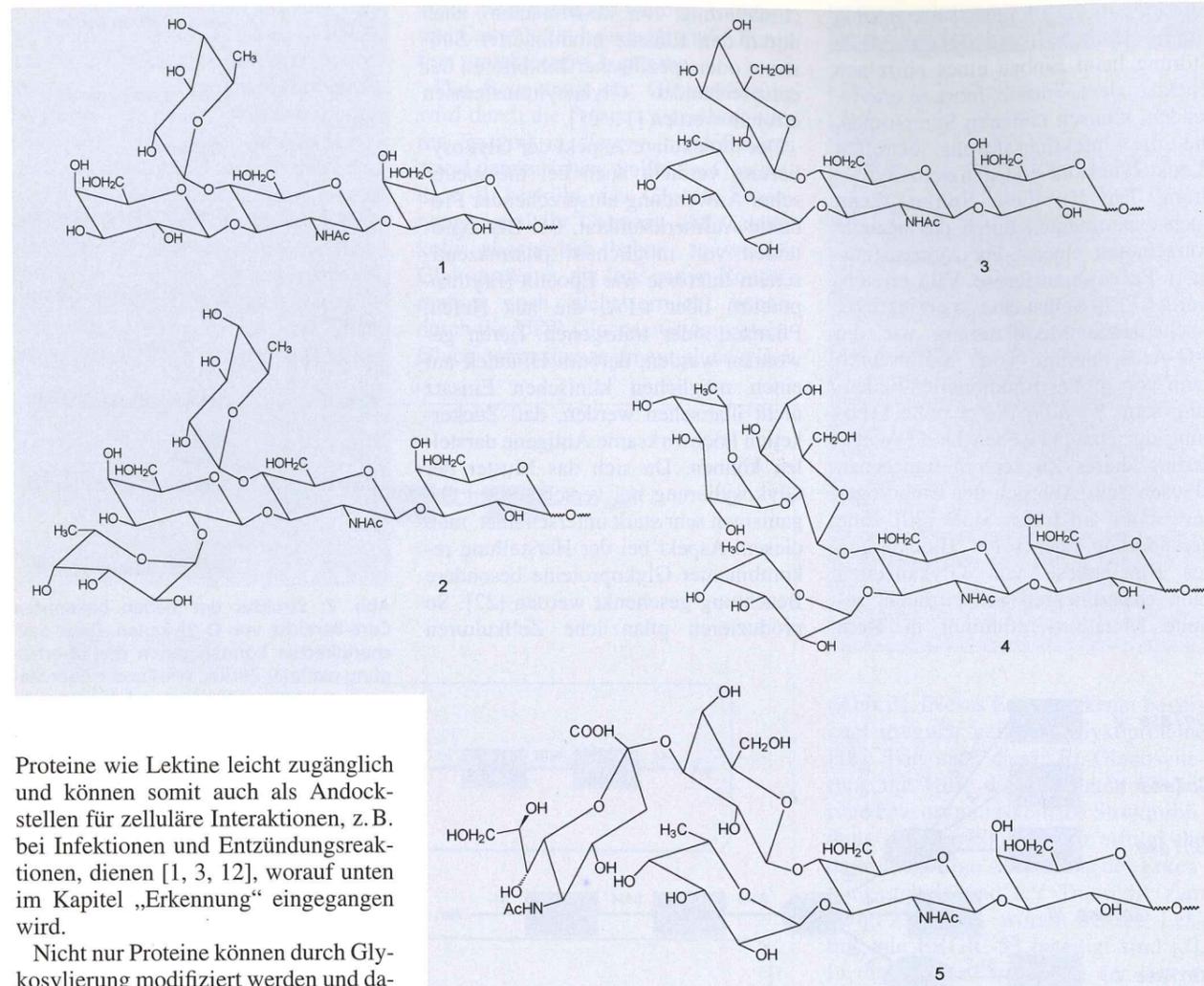


Abb. 8: Konformation von Lewis-Epitopen. Die abgebildeten Saccharidstrukturen stellen die verschiedenen Lewis-Epitope dar: 1 Lewis^a; 2 Lewis^b; 3 Lewis^x; 4 Lewis^y; 5 Sialyl-Le^x. Diese Oligosaccharideinheiten befinden sich am Ende von Glykanketten und können deren biologische Wirkung modifizieren oder sogar bestimmen, indem sie z. B. als Andockstellen für Lektine aus Bakterien wie *H. pylori* oder aus Leukozyten dienen.

Tab. 2: Grundstrukturen von Glykolipiden. Die verschiedenen Kohlenhydratketten sind an Ceramid (Cer) gebunden und können durch weitere Zucker wie Galaktose, N-Acetylgalaktosamin oder L-Fucose ergänzt werden. So entsteht durch die Einführung von N-Acetylgalaktosamin in α 1-3-Bindung an das endständige N-Acetylgalaktosamin der Globotetraose das Forssman-Antigen. Wenn Sialinsäuren an Oligosaccharidketten angehängt werden, nennt man diese Glykolipide Ganglioside.

Glykolipid	Abk.	Struktur
Gangliotriaose	GgOse ₃	GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer
Gangliotetraose	GgOse ₄	Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer
Neolactotetraose	nLcOse ₄	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer
Neolactoheptaose	nLcOse ₆	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer
Globotriaose	GbOse ₃	Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer
Isoglobotriaose	iGbOse ₃	Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer
Globotetraose	GbOse ₄	GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer
Isoglobotetraose	iGbOse ₄	GalNAc β 1-3Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer
Lactotriaose	LcOse ₃	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer
Lactotetraose	LcOse ₄	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Gal β 1-Cer
Mucotriaose	McOse ₃	Gal β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer
Mucotetraose	McOse ₄	Gal β 1-3Gal β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer
Galabiose	GaOse ₂	Gal α 1-4Gal β 1-Cer
Galatrisaose	GaOse ₃	Gal α 1-4Gal α 1-4Gal β 1-Cer

Strukturermittlung

Deglykosylierung

Für die Analyse der Oligosaccharidketten in Glykoproteinen ist in den meisten Fällen zunächst eine Trennung von Saccharid- und Proteinteil erforderlich.

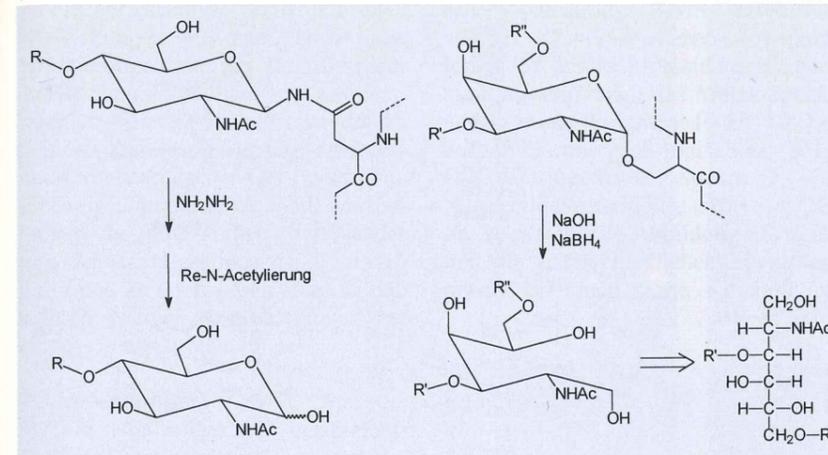


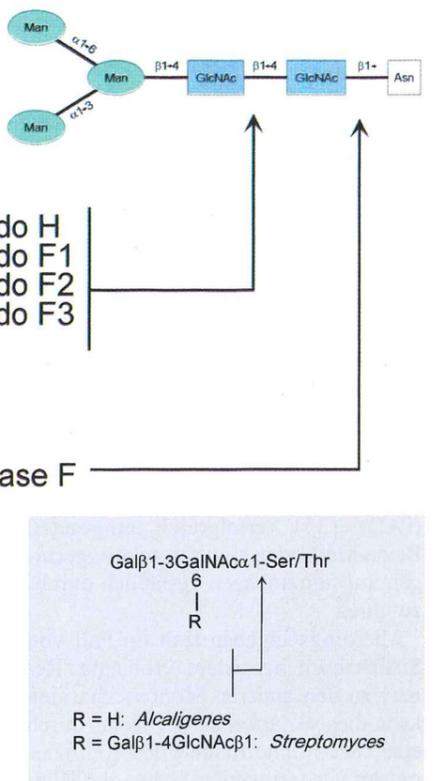
Abb. 9: Reaktionsverlauf der Spaltung von N-Glykanen durch Hydrazinolyse (links) und von O-Glykanen durch Alkali/Borhydrid-Behandlung (β -Eliminierung; rechts). Durch Behandlung von Glykoproteinen mit Hydrazin werden bevorzugt N-glykosidische Bindungen gespalten. Gleichzeitig werden die N-Acylsubstituenten der Aminozucker entfernt, so daß für die weitere Analyse zunächst eine Re-N-Acetylierung erforderlich ist. O-Glykane können durch Behandlung mit NaOH aus ihrer Ser/Thr-Bindung gelöst werden. Wegen der möglichen Degradation des entstehenden reduzierenden Zuckers in dem stark alkalischen Milieu wird er mit Natriumborhydrid zum Alditol reduziert. Eine solche Reduktion ist auch mit den Glykanen, die durch die Hydrazinolysen gebildet werden, möglich. Durch die Verwendung von Natriumbortritiid kann die gesamte Zuckerkette radioaktiv markiert werden, womit eine sehr empfindliche Detektion möglich wird.

Dies kann chemisch im Fall der N-Glykane über die Behandlung mit Hydrazin [26] geschehen oder bei den O-Glykanen durch β -Eliminierung [27]. Der Ablauf dieser Reaktionen ist in Abbildung 9 dargestellt. In den letzten Jahren sind endo-Glykosidasen, die die Sac-

charidketten der N- und O-Glykane an oder in der Nähe der Bindungsstelle zum Protein spalten können, kommerziell verfügbar geworden, so daß die enzymatische Deglykosylierung zunehmend die chemischen Methoden ersetzt. Für die N-Glykane sind mehrere

	high mannose	Hybrid	bi- tri- Antenne	tetra-
endo H	+	+	-	-
endo F1	+	+	-	-
endo F2	+	-	+	-
endo F3	-	-	+	+
PNGase F	+	+	+	+

Abb. 10: Spaltungsspezifität von endo-Glykosidasen. Die glykosidischen Bindungen der beiden N-Acetylglucosaminreste im Core-Bereich der N-Glykane können, wie in der Abbildung angegeben, durch verschiedene endo-Glykosidasen gespalten werden. Die in Abb. 4 gezeigten Strukturtypen werden durch die kommerziell verfügbaren Enzyme mit hoher Selektivität als Substrate akzeptiert. Werden die Produkte dieser enzymatischen Reaktionen mit Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert, so ist eine Abspaltung von Glykanketten durch eine Verschiebung der Position der Proteinbanden zu niedrigerer Molekularmasse erkennbar. Durch die Spezifität der endo-Glykosidasen ergeben sich damit strukturelle Aussagen. Für die enzymatische Hydrolyse der Kohlenhydrat-Protein-Bindung in O-Glykanen sind bislang nur zwei endo-Glykosidasen beschrieben, die nur wirken, wenn die angegebenen Oligosaccharidstrukturen vorliegen (rechts).



R = H: *Alcaligenes*
R = Gal β 1-4GlcNAc β 1: *Streptomyces*

dieser endo-Glykosidasen bekannt. Sie sind spezifisch für bestimmte Typen von N-Glykanketten und für die Positionen innerhalb der Kette (Abb. 10) [28]. Mit der Abspaltung der Glykane durch diese Enzyme werden gleichzeitig strukturelle Daten erhalten, weil nur beim Vorliegen einer passenden Struktur eine Hydrolyse erfolgt. Für die entsprechende enzymatische Behandlung intakter O-Glykane sind bislang nur zwei Enzyme mit sehr enger Spezifität beschrieben worden (Abb. 10) [29, 30]. Die genannten endo-Glykosidasen sind zusammen mit einer Reihe von exo-Glykosidasen nicht nur von analytischem Interesse. Ihre Aktivität steuert auch den Katabolismus sowie die Verfügbarkeit freier Glykanketten und partiell abgebauter Antennenstrukturen, für die eine eindeutige Funktionsbeschreibung noch aussteht [31, 32].

Monosaccharidanalyse

Die qualitative und quantitative Analyse der meisten Monosaccharide, die als Bausteine der Glykanketten vorkommen, stellt nach geeigneter Derivatisierung kein grundlegendes Problem mehr dar. Sie werden z. B. als Trimethylsilylether der Methylglykoside oder als die sogenannten Alditolacetate (Abb. 11) mit Hilfe der Gaschromatographie, oft in Kombination mit Mas-

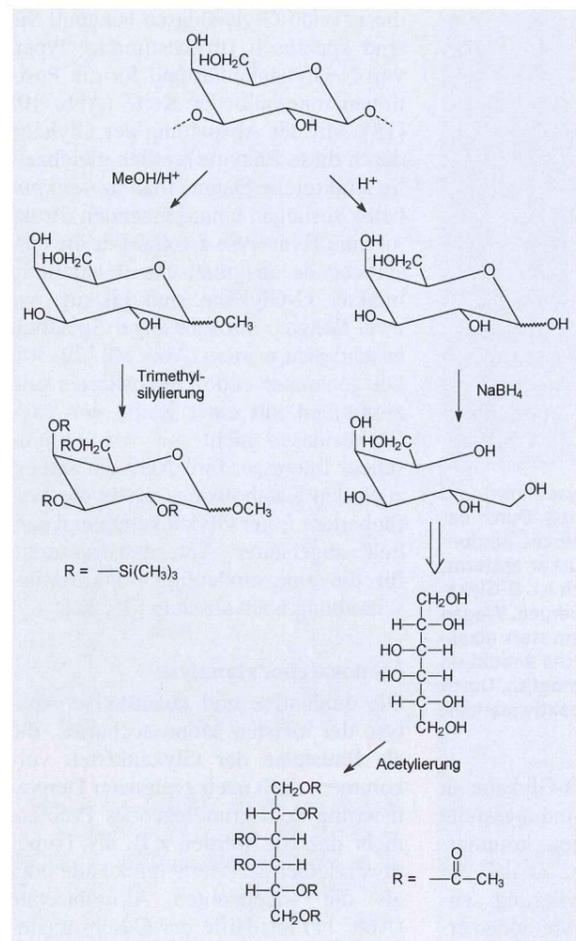


Abb. 11: Freisetzung und Derivatisierung von Monosacchariden aus Glykanen für gaschromatographische Analysen. Durch saure Hydrolyse werden die glykosidischen Bindungen der einzelnen Zuckerbausteine gespalten, so daß ein Gemisch von Monosacchariden entsteht. Wird diese Hydrolyse in Methanol durchgeführt, so entsteht ein Gemisch der verschiedenen Methylglykoside (α,β -Furanose und α,β -Pyranose), die nach Derivatisierung der OH-Funktionen z. B. durch Trimethylsilylierung gaschromatographisch analysiert werden können. Nur ein Derivat für jedes Monosaccharid wird erhalten, wenn die saure Hydrolyse in H_2O durchgeführt wird und die entstehenden Zucker mit $NaBH_4$ zu den Alditolen reduziert werden. Üblicherweise erfolgt danach eine Umsetzung der Alkoholgruppen durch Acetylierung oder Trifluoracetylierung. Wegen der gleichen funktionellen Gruppe an C-1 und C-6 können aber bestimmte Unterscheidungen nicht mehr gemacht werden, z. B. zwischen D- und L-Galaktose.

senspektrometrie, nachgewiesen [33, 34]. In neuerer Zeit wird auch die HPLC (high-performance liquid chromatography), z. B. in Verbindung mit „pulsed-amperometric detection“ (PAD) [35], erfolgreich eingesetzt. Beide Methoden sind mit relativ geringen Substanzmengen verlässlich durchzuführen.

Allerdings ergeben sich im Fall von Sialinsäuren besondere Probleme. Relativ zu den anderen Monosacchariden kann dieser Zucker in der Natur durch eine beachtliche Reihe von Modifizierungen variiert werden. Über die Mög-

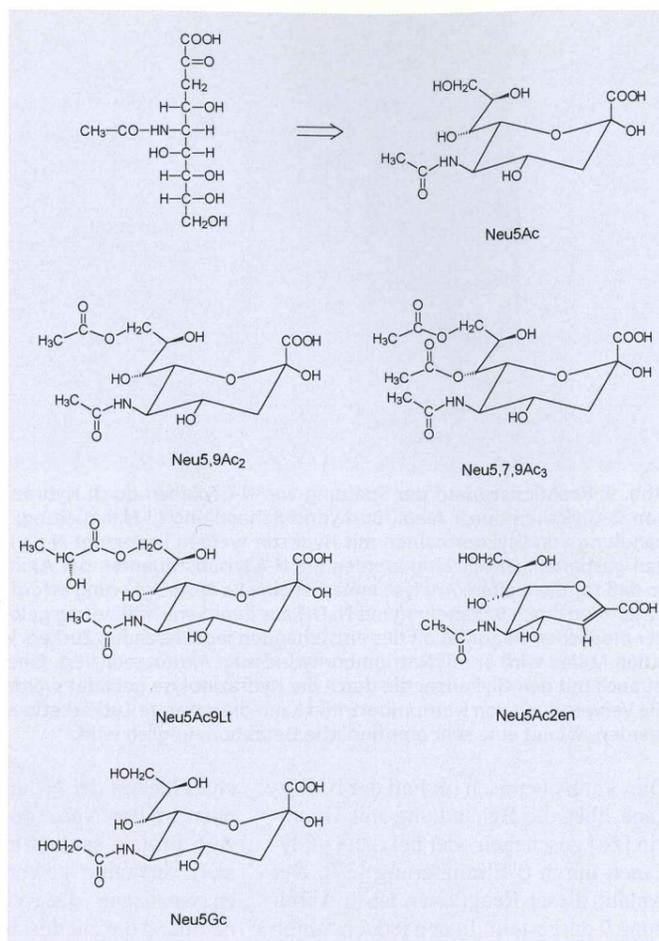


Abb. 12: Strukturen der bisher im Menschen nachgewiesenen Sialinsäuren. Zur besseren Übersicht ist die Fischer-Projektion der 5-Amino-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosäure (Neuraminsäure) als N-acetylierte Verbindung (Neu5Ac) mit angegeben. (Zu den Abkürzungen siehe die Übersicht neben Abb. 4.) N-Glykolyneuraminsäure ist bislang in humanem Material nur bei Tumoren gefunden worden.

türlich vorkommende Sialinsäuren von dem genannten Grundgerüst ab. Die Zahl wird noch um etwa zehn Vertreter dieser Zuckerfamilie erhöht, die als Derivate der ebenfalls natürlich vorkommenden 2,3-ungesättigten Variante anzusehen sind [37].

Diese Modifikationen sind keineswegs nur exotische Spielformen, sondern können, wie für die Rolle der O-Acetylierung in der Embryogenese schon betont wurde, durchaus physiologisch relevante Funktionen ausüben. Im Mucin von Submandibularisdrüsen des Rindes sind 14 verschiedene Arten eindeutig identifiziert worden [38]. Bemerkenswerterweise sind beim Menschen bislang nur sechs Derivate (Abb. 12) der insgesamt fast 40 bekannten Spezies nachgewiesen worden, davon eine ausschließlich in Tumoren. Die Analyse all dieser verschiedenen Arten

mit z.T. nur geringfügigen strukturellen Abweichungen stellt naturgemäß hohe Anforderungen an die Präzision der analytischen Methoden, um zweifelsfrei zwischen ihnen unterscheiden zu können. Durch die häufig anzutreffende Veresterung der OH-Funktionen mit Essigsäure entstehen labile Verbindungen, die ohne Verlust oder Wanderung der Acetylgruppen kaum zu isolieren und zu analysieren sind, so daß dadurch weitere Komplikationen bei der Analyse auftreten können.

GC/MS-Kopplung

Im folgenden sollen nun beispielhaft Methoden vorgestellt werden, mit denen diese Probleme angegangen werden können. Die sichere Identifizierung substituierter Sialinsäuren erfolgt häufig durch kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie. Das schon früh von Kamerling und Vliegthart aufgestellte Fragmentierungsmuster der Sialinsäuren unter Elektronenstoß-Ionisationsbedingungen (EI-MS) [39] hat sich als allgemeingültig erwiesen und ist mit Erfolg auch für die Interpretation von Spektren einer Vielzahl neu entdeckter Derivate herangezogen worden [38, 40]. Anhand relativ weniger charakteristischer Fragment-Ionen, die in Abbildung 13 mit A bis H gekennzeichnet sind, läßt sich Art und Ort einer Substitution am Neuraminsäuremolekül verlässlich festlegen.

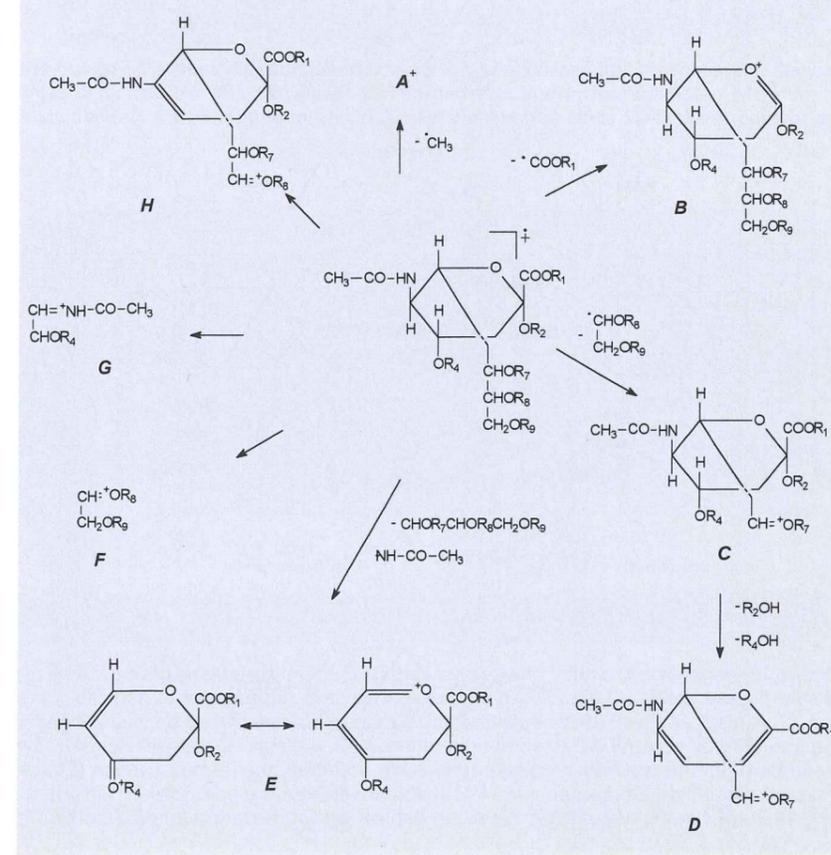
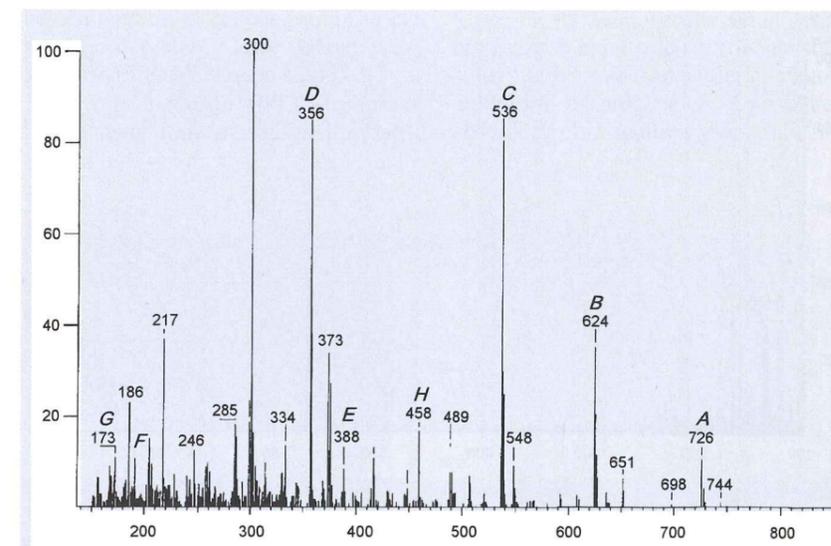
Bedingt durch die technische Eigenart bestimmter Massenspektrometer, Fragment-Ionen im hohen Massenbereich bei geringen Substanzmengen nur mit schwacher Intensität darzustellen, kann es unter Umständen vorkommen, daß Fragment-Ionen oberhalb von 400 Masseneinheiten kaum zu erkennen sind, was eine Strukturermittlung verhindert. Aus diesem Grunde ist die Analyse von Sialinsäuren mit chemi-

Abb. 13: Elektronenstoß-Ionisations-Massenspektrometrie (EI-MS) von Sialinsäuren. Oben ist das Massenspektrum per-O-trimethylsilylierter N-Acetylneuraminsäure unter Elektronenstoß-Ionisationsbedingungen gezeigt. Die primär für die Interpretation benötigten charakteristischen Fragment-Ionen, deren Entstehung und Struktur gleichfalls dokumentiert ist (rechts), sind mit A bis H bezeichnet. Der Austausch von Substituenten führt zu einer Verschiebung der Position von Fragmenten, die diesen Substituenten enthalten, zu anderen Massenzahlen (z. B. von Trimethylsilyl zu Acetyl um -30 Masseneinheiten) und erlaubt somit die Bestimmung von Art und Position der Derivatisierung.

scher Ionisation (CI-MS) entwickelt worden. Dabei entstehen bevorzugt Ionen im hohen Molekularmassenbereich einschließlich des Molekülpeaks und weniger Fragment-Ionen als bei der Elektronenstoß-Ionisation [41]. Das entsprechende Spektrum von N-Acetylneuraminsäure (Abb. 14) läßt im Vergleich mit Abbildung 13 deutlich die unterschiedlichen Spaltungsmuster erkennen. Eine Kombination

von EI-MS und CI-MS ermöglicht damit auch bei geringen Substanzmengen eine eindeutige Identifizierung.

Ein wesentliches Hindernis bei dieser Art der Analyse stellt allerdings die Notwendigkeit dar, daß die Sialinsäuren zuvor aus den zu untersuchenden Materialien in möglichst reiner Form isoliert werden müssen. Inzwischen sind vielfach erprobte Methoden für diese Isolierung verfügbar [42, 43]. Sie



sind u. a. bei der Isolierung von Sialinsäuren aus Mucinen, Erythrozyten, Bakterien oder Insekten erfolgreich angewandt worden, was jedoch nicht ohne Substanzverlust möglich ist [38, 44 - 46]. Dies kann bedeuten, daß die isolierte Sialinsäuremenge unterhalb der Detektionsgrenze der angewandten Analysenverfahren liegt. Durch indirekte hochempfindliche Methoden wie die Einführung einer radioaktiven Mar-

kierung über den Stoffwechsel bei metabolisch aktiven Zellen läßt sich die Abwesenheit von Sialinsäuren in bestimmten Materialien sicherer bestimmen, als dies bei einer chemisch-spektroskopischen Methode möglich wäre [47, 48].

MS/MS-Technik

Da Sialinsäuren trotz vieler Reinigungsverfahren [42] häufig nur zusam-

men mit anderen Substanzen wie anorganischen Salzen, Stoffwechselsäuren wie Pyruvat, Farbstoffen oder sogar Weichmachern aus den verwendeten Gefäßen erhalten werden können, ist auch ein massenspektrometrischer Nachweis nicht immer eindeutig zu führen. Die Sialinsäure-relevanten Fragment-Ionen können in ungünstigen Fällen von Fremd-Ionen, die von den oben genannten Substanzen stammen, überdeckt sein. Mit Hilfe der MS/MS-Technik läßt sich dann die Analyse erheblich sicherer gestalten als bei den oben genannten Methoden. In diesem Verfahren werden sog. „daughter-“ und „parent-ions“ registriert und die dem Fragmentationsschema entsprechenden Folge- oder Stamm-Ionen aufgespürt [49]. So muß nach dem in Abbildung 13 gezeigten Fragmentationsschema aus dem Fragment C das Fragment D als „daughter-ion“ auftauchen, wenn ein Signal bei 536 Masseneinheiten von N-Acetylneuraminsäure stammt. Durch diese Folgeanalyse werden Identifizierungen möglich, die mit konventioneller Massenspektrometrie nicht erhalten werden können. Neben der Anwendung auf Sialinsäuren sind diese eleganten Verfahren auch für die Analyse anderer Saccharide wie sulfatierte Galaktose oder N-Acetylgalaktosamin nutzbar [50]. Derartige funktionell bedeutende Varianten sind u. a. bei Selektinliganden, die die Leukozytenadhäsion initiieren, bei Thyreoglobulin und bei Glykoproteinhormonen der Hypophyse zu finden.

HPLC

Weiterhin von großer Bedeutung für die Analyse von Sacchariden ist die HPLC [35, 51 - 54], vor allem wegen der im Vergleich zur Massenspektrometrie technisch relativ einfachen Handhabbarkeit. In Verbindung mit hochempfindlichen Detektionssystemen erlaubt die HPLC eine Analyse von Sialinsäuren im femtomolaren Bereich. So kann nach Derivatisierung freier Sialinsäuren deren Trennung über reversed-phase-Säulen mit einer sich anschließenden sehr empfindlichen fluorimetrischen Detektion erfolgen [37, 55] (Abb. 15). Es ist allerdings anzumerken, daß die chromatographischen Analysenverfahren keine eindeutige Strukturfestlegung der Sialinsäure-derivate erlauben, weil sie nur relative Aussagen zulassen. Eine Zuordnung ist nur dann möglich, wenn die entsprechenden Referenzsubstanzen zur Verfügung stehen. Die Aussagegenauigkeit dieser Methoden läßt sich allerdings erhöhen, wenn die zu analysie-

renden Sialinsäuren zusätzlich mit spezifischen Enzymen ihres katabolen Stoffwechsels behandelt werden (Abb. 16). So spaltet die N-Acetylneuraminatlyase (EC 4.1.3.3) Sialinsäuren in Pyruvat und entsprechende N-Acylmannosaminderivate, was zum Verschwinden der Sialinsäurepeaks in der HPLC-Analyse führt; Sialat-O-Acetyltransferase (EC 3.1.1.53) können selektiv 9-O-Acetylgruppen von Sialinsäuren abspalten, so daß die für diese Sialinsäuren typischen Signale nach Enzymbehandlung im Chromatogramm in die Position der nicht O-acetylierten Monosaccharide verschoben sind [42].

Die verschiedenen HPLC-Trennverfahren wie Ionenaustauschchromato-

graphie, Gelfiltration oder reversed-phase-Chromatographie finden auch Anwendung bei der Analyse von Oligosacchariden. So ist es nach enzymatischer oder chemischer Deglykosylierung von Glykoproteinen auf der Ebene der N-Glykanketten möglich, unterschiedliche Oligosaccharidketten zu fraktionieren. Damit lassen sich schon auf dieser Stufe strukturelevante Aussagen machen, indem etwa Sialinsäurehaltige Glykanketten von nicht sialylierten über Anionenaustauschchromatographie getrennt werden. Gradientenelution von einer solchen Ionenaustauschermatrix mit steigender Salzkonzentration erlaubt zudem eine Unterscheidung hinsichtlich der Zahl der

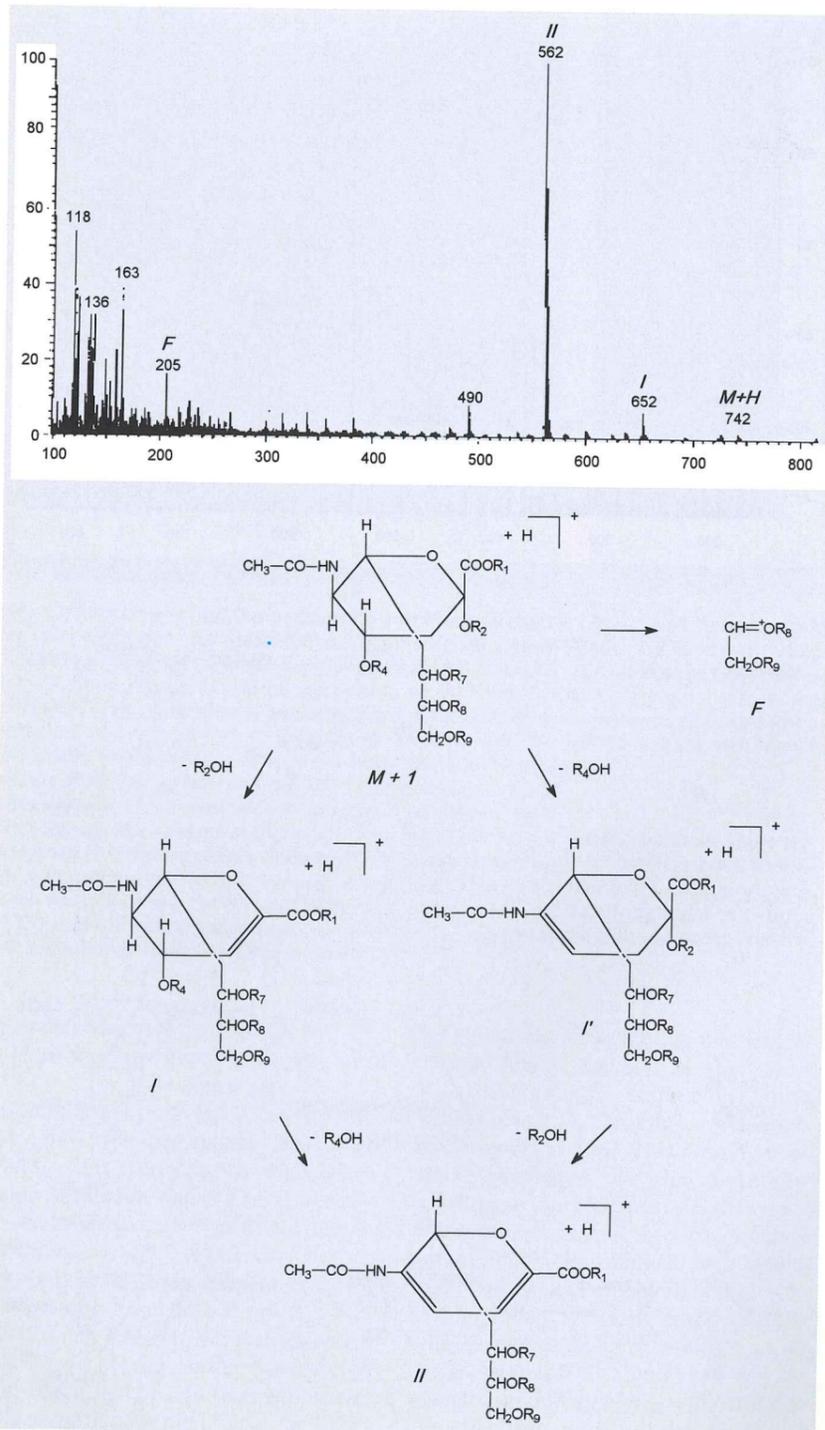


Abb. 14: Massenspektrometrische Analyse von Sialinsäuren mit chemischer Ionisation (CI). Im Massenspektrum von N-Acetylneuraminsäure als per-O-trimethylsilyliertes Derivat entstehen unter CI-Bedingungen prominente Peaks im hohen Massenbereich (oben). Sie sind von der gleichen Verbindung im Spektrum nach Elektronenstoß-Ionisation (EI) nicht zu finden (vgl. Abb. 13). Das Fragment F des EI-Spektrums taucht in der Regel ebenfalls auf. Wie das Fragmentationsschema zeigt, kann eine Substitution am 4-OH von Sialinsäuren auch anhand der wenigen Fragment-Ionen identifiziert werden.

men erlaubt die HPLC eine Analyse von Sialinsäuren im femtomolaren Bereich. So kann nach Derivatisierung freier Sialinsäuren deren Trennung über reversed-phase-Säulen mit einer sich anschließenden sehr empfindlichen fluorimetrischen Detektion erfolgen [37, 55] (Abb. 15). Es ist allerdings anzumerken, daß die chromatographischen Analysenverfahren keine eindeutige Strukturfestlegung der Sialinsäure-derivate erlauben, weil sie nur relative Aussagen zulassen. Eine Zuordnung ist nur dann möglich, wenn die entsprechenden Referenzsubstanzen zur Verfügung stehen. Die Aussagegenauigkeit dieser Methoden läßt sich allerdings erhöhen, wenn die zu analysie-

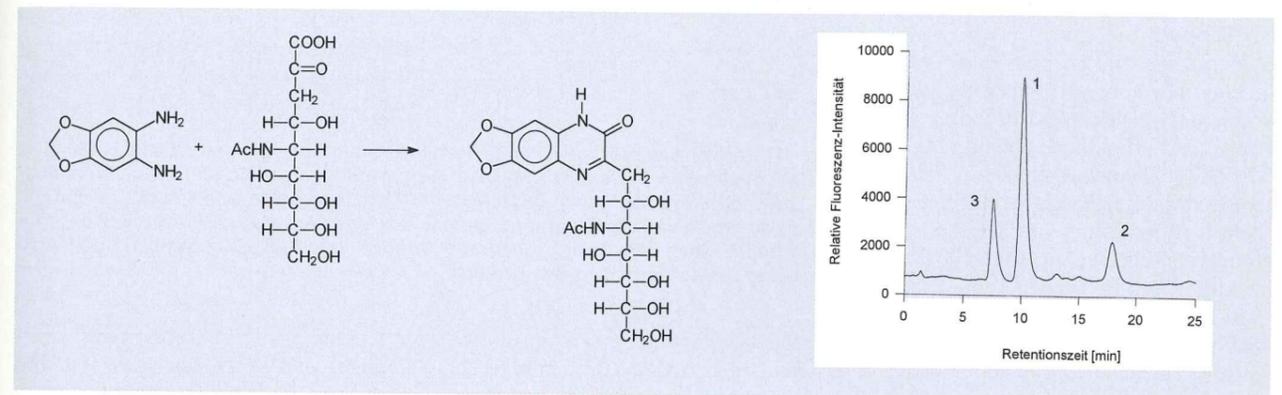


Abb. 15: HPLC-Analyse von Sialinsäuren mit Hilfe fluorimetrischer Detektion. Nach Umsetzung von Sialinsäuren entsprechend dem angegebenen Reaktionsschema (links) können diese Derivate über reversed-phase-Säulen getrennt und in femtomolaren Mengen mit fluorimetrischer Detektion erfaßt werden. Das abgebildete Chromatogramm (rechts) zeigt die Analyse eines Sialinsäuregemischs aus Neu5Ac (1), Neu5,9Ac₂ (2) und Neu5Gc (3).

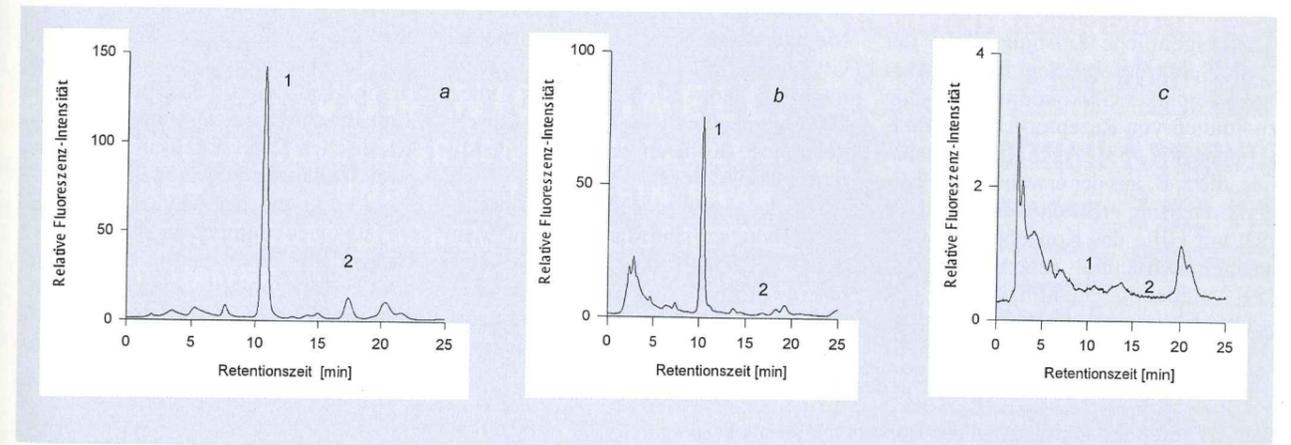


Abb. 16: Enzymatische Sialinsäureanalyse. Die in Abb. 15 dargestellte Art der Sialinsäureanalyse kann in ihrer Aussagegenauigkeit erheblich gesteigert werden, wenn diese Zucker vor der Derivatisierung mit spezifischen Enzymen behandelt werden. Das Chromatogramm der Ausgangskomponenten (a) weist neben Signalen, die nicht auf Sialinsäuren zurückzuführen sind, Peaks für Neu5Ac (1) und Neu5,9Ac₂ (2) auf. Nach Behandlung mit Sialat-9-O-acetyltransferase, die selektiv die Acetylgruppe in der 9-OH-Position von Sialinsäuren abspaltet, verschwindet der entsprechende Peak (2) nahezu vollständig, während Neu5Ac unverändert vorliegt (b). Inkubation mit N-Acetylneuraminatlyase schließlich führt zur Spaltung der meisten Sialinsäuren in Pyruvat und N-Acylmannosaminderivate, die sich nicht mehr nach dem in Abb. 15 wiedergegebenen Reaktionsschema umsetzen lassen, so daß die Peaks für Neu5Ac (1) und Neu5,9Ac₂ (2) nicht mehr auftauchen (c).

vorhandenen Sialinsäuren. Die mit der HPLC mögliche Isolierung einzelner Kettenstrukturen gestattet deren weitere Bearbeitung mit Hilfe anderer Methoden.

Damit gehen die Möglichkeiten der chromatographischen Zuckermanalyse von Glykoproteinen weit über qualitative und quantitative Erfassung der Monosaccharidbausteine hinaus, die nur die Bruttozusammensetzung liefert. Ihre Anwendung ermöglicht den Aufbau von Datenbanken, in denen chromatographische Elutionsprofile mit Strukturen korreliert werden [56]. Für die grundlegenden Aussagen über die Reihenfolge und die Anomerie der Verknüpfung der einzelnen Monosaccharide sind allerdings Verfahren nötig, die im folgenden besprochen werden.

NMR-Spektroskopie

Moderne Techniken der kernmagnetischen Protonen-Resonanz-Spektroskopie ($^1\text{H-NMR-Spektroskopie}$) wie zwei- und dreidimensionale NMR- oder NOE- (nuclear Overhauser enhancement-) Messungen gestatten eine sichere Identifizierung von Zuckerstrukturen wie Sialinsäuren. Ein $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ von N-Acetylneuraminsäure ist in Abbildung 17 gezeigt. Zusätzlich erlauben diese Methoden auch Aussagen über Art und Position von Substituenten am Neuraminsäuregrundgerüst. Allerdings erfordert die Anwendung dieser Technik das Vorliegen nur einer Sialinsäureart, denn eine Vortrennung wie bei der Kopplung der Massenspektrometrie mit der Gaschromatographie ist hier nicht durchführbar.

Die eigentliche Leistungsstärke der NMR-Spektroskopie liegt bei der Analyse komplexer Glykokonjugate bis hin zu Studien von Rezeptor-Ligand-Interaktionen [57, 58]. Auch Oligosaccharide, die z. B. aus der erwähnten HPLC-Fraktionierung erhalten werden, lassen sich mit Hilfe des Konzepts der sogenannten „structural reporter groups“ [59] eindeutig identifizieren. Alle strukturelevanten Angaben, wie sie etwa in Abbildung 4 aufgeführt sind,

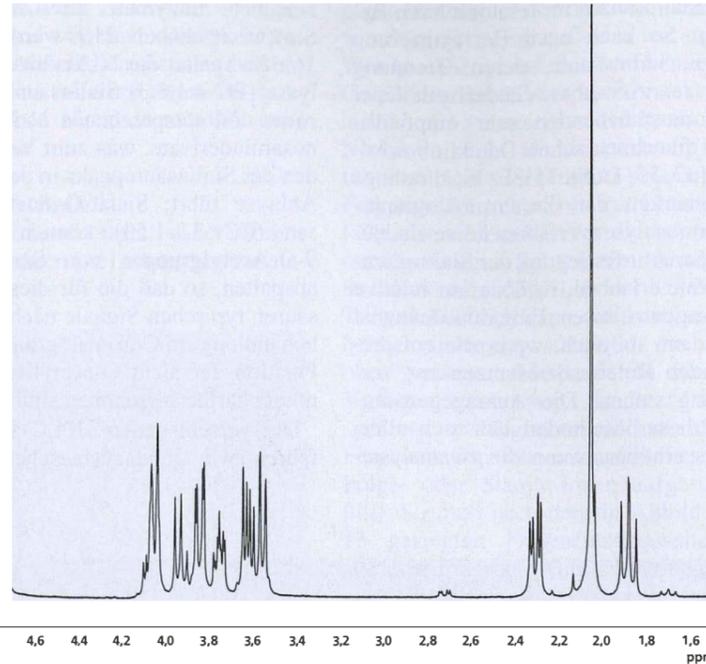


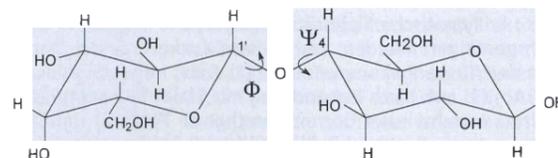
Abb. 17: $^1\text{H-NMR-Spektroskopie}$ von N-Acetylneuraminsäure. Dargestellt ist das 500 MHz $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ von Neu5Ac in D_2O als Lösungsmittel. Das HOD-Signal, das vom Austausch der OH-Protonen gegen Deuterium herrührt, liegt bei etwa 4,8 ppm. Die übrigen Signale stammen von den Ringprotonen bzw. der Methylgruppe im N-Acetylteil des Moleküls und können vollständig zugeordnet werden. Das Aufspaltungsmuster gibt Auskunft über die Konformation des Zuckers.

werden dabei in einer einzigen Analyse erhalten, d.h. Art und Reihenfolge der Monosaccharide sowie Art und Anomerie der Verknüpfung der einzelnen Zuckerreste. Dieser Informationsgehalt eines NMR-Spektrums geht somit weit über die massenspektrometrisch zu erzielenden Aussagen hinaus. Mit dem Arsenal der verfügbaren modernen Methoden der Strukturaufklärung von Glykanen (HPLC, MS, NMR) sind in menschlichem Bronchialsekret über 100 unterschiedliche O-glykosidisch gebundene Kohlenhydratketten identifiziert worden [60].

Mit der Analyse der Primärstruktur von Glykanen sind die Möglichkeiten der NMR-Spektroskopie aber bei weitem noch nicht ausgeschöpft. Da sich nicht nur benachbarte Protonen beeinflussen, sondern auch weiter entfernte

miteinander in Wechselwirkung treten können, sind auch Aussagen über die räumliche Anordnung größerer Struktureinheiten möglich. Dies ist in Abbildung 18 am Beispiel der glykosidischen Bindung in Lactose ($\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$) erläutert. Das Proton am C-1 der Galaktose (H_1') und das Proton am C-4 der Glucose (H_4) treten über die glykosidische Bindung hinweg in Wechselwirkung. Die freie Drehbarkeit der beiden Zuckerreste in ihrer Bindung zum verknüpfenden glykosidischen Sauerstoffatom erlaubt es, zwei Winkel ϕ und ψ zu definieren, die die Anordnung der Monosaccharidreste zueinander angeben. Je nach der Größe der Winkel, die die beiden Monosaccharide relativ zueinander einnehmen, kann die Dipolwechselwirkung der beiden Protonen H_1' und H_4

Abb. 18: Rotationsmöglichkeiten der Monosaccharidreste in Lactose. Der Glucose- und der Galaktoseteil in Lactose sind über die glykosidische Bindung miteinander verknüpft und in diesem Bereich frei drehbar. Damit können sie relativ zueinander unterschiedliche Winkel einnehmen, die ϕ und ψ genannt werden. In aller Regel existieren bestimmte energetisch begünstigte Einstellungsmöglichkeiten für diese beiden Winkel, so daß nur wenige, wohldefinierte Konformationen eingenommen werden können. Diese sind z. B. mit Hilfe der NOE-Spektroskopie bestimmbar.



Tab. 3: Einteilung verschiedener Säugerlektine in Familien aufgrund definierter Strukturmerkmale [3].

Familie	Strukturmerkmal	Kohlenhydratligand	belegbare Funktion
C-Typ	konservierte CRD*	variabel (Mannose, Galaktose, L-Fucose, Heparintetrasaccharid)	Zellerkennung (Bakterien, Hefen, körpereigene Zellen), Initiation von Biosignalketten
I-Typ	Immunglobulin-artige CRD*	variabel (Man ₆ GlcNAc ₂ , HNK-1 Epitop, Hyaluronsäure, α2,3/α2,6-Sialyllactose)	Zell-Zell (Matrix)-Erkennung, Initiation von Biosignalketten
Galektine (S-Typ)	konservierte CRD*	β-Galaktoside	Zell-Zell (Matrix)-Erkennung, Initiation von Biosignalketten
Pentraxine	5 Untereinheiten	zyklische 4,6-Acetale von β-Galaktosiden, Galaktose, sulfatierte und phosphorylierte Monosaccharide	Beteiligung an Abwehrprozessen
P-Typ	homologe, noch nicht genau definierte CRD*	Mannose-6-phosphat-haltige Glykoproteine	Intrazelluläres Routing von markierten Proteinen, z. B. lysosomalen Enzymen

* Domäne für Zuckerkennung (carbohydrate recognition domain)

von unterschiedlicher Intensität sein. Damit kann man über die Messung des NOE-Spektrums Rückschlüsse auf die räumliche Anordnung der einzelnen Saccharidbausteine ziehen [57]. Bei diesem Verfahren wird die Anregungsfrequenz eines Protons eingestrahlt, und die Signale der mit diesem Proton in Dipol-Dipol-Wechselwirkung stehenden anderen Protonen werden aufgezeichnet. Auf diese Weise läßt sich auch die Konformation komplexer N-Glykane, wie sie in allen Zellmembranen von Säugetieren vorkommen (Abb. 4), analysieren. Dabei hat sich gezeigt, daß einzelne Antennen dieser Moleküle nicht zwangsläufig senkrecht von der Membran abstehen, sondern auch flach auf der Membran aufliegen und so Teile der Zelloberfläche abdecken können [61]. Dies gilt auch für einzelne Glykoproteine, so daß ein enges Wechselspiel zwischen einer Zuckerkette und dem Proteinteil bestehen kann. Strukturelle Veränderungen der Glykane, etwa durch die enzymatische Abspaltung von Sialinsäuren, können sich somit auch auf die Konformation des Proteins auswirken, wie für das Serumpentraxin Amyloid P gezeigt worden ist [62]. Dieser Befund kann für eine Reihe von Sialoglykoproteinen Bedeutung haben, bei denen eine Beeinflussung von Aktivitätsparametern durch Sialidasebehandlung belegt ist [63].

Detaillierte Untersuchungen mit zweidimensionaler NMR-Spektroskopie kombiniert mit computergestützten theoretischen Berechnungen haben zudem ergeben, daß Oligosaccharidketten

oft nur eine eingeschränkte Flexibilität besitzen [8]. Bei derartigen Berechnungen werden einzelne φ, ψ-Winkel iterativ geändert und für jede Kombination der relative Energiegehalt bestimmt, so daß sich ein Energiepotentialdiagramm ergibt [57]. Dieses kann neben einem globalen Minimum mehrere lokale Potentialtäler aufweisen. Wenn die Energiebarriere zwischen den zugeordneten Konformationen nicht zu hoch ist, ist auch ein Übergang von einer zur anderen Konformation möglich. Das Vorkommen solcher Energieminima zeigt, daß die Zuckerreste in Glykanketten energetisch häufig eindeutig bevorzugte Konformationen einnehmen und damit die Flexibilität von Glykanen beschränken [8, 57]. Selbst Interaktionen zwischen einzelnen Molekülteilen sind so nachweisbar [58, 64]. Aufgrund derartiger Berechnungen, die auf der Basis von NMR-Messungen und teilweise auch von Röntgenstrukturanalysen angefertigt wurden, kann man Oligosaccharide also ebensowenig wie Proteine oder Nukleinsäuren als ausschließlich polar und beliebig flexibel betrachten. Auf der Grundlage einer solchen verlässlichen Baustein- und Konformationsanalyse von Glykanen können nun die Fragen, welche Bedeutung diese Moleküle als Erkennungssignale haben und wie sich dieses Wissen pharmazeutisch nutzen läßt, besprochen werden.

Erkennung

Die zunächst an das Peptidgerüst gehafteten Glykanketten sind für die

Transportvorgänge wichtig, die mit der Prozessierung, Proteinfaltung und Zuordnung zu bestimmten Zellkompartimenten in Zusammenhang stehen. So werden lysosomale Enzyme, wie in Abbildung 2 gezeigt, durch Mannose-6-phosphat markiert und durch zwei sogenannte P-Typ-Lektine, die dieses Signal erkennen, sortiert [3, 12]. Reife Glykanstrukturen wie die in Abbildung 8 dargestellten Lewis-Epitope, die am Ende einzelner Ketten gebildet werden, scheinen dagegen interzelluläre Interaktionen beeinflussen zu können. Neben den genannten P-Typ-Lektinen gibt es weitere Lektinfamilien, die in Tabelle 3 zusammen mit den ihnen zugeschriebenen Funktionen aufgelistet sind.

Entwicklung eines antigrippalen Wirkstoffs

Wie schon ausführlich in vorhergehenden Beiträgen gezeigt worden ist [1, 6], können Neoglykokonjugate eingesetzt werden, um Lektine in Geweben zu detektieren. Diese Interaktion von (Lektin-)Rezeptor und (Kohlenhydrat-)Ligand kann durch das Zusammenspiel von chemischer Synthese und biochemischer Testung in Verbindung mit strukturanalytischen Verfahren wie NMR-Spektroskopie oder Röntgenstrukturanalyse optimiert werden. Ein eindrucksvolles Beispiel für ein solches „drug design“ ist die Entwicklung eines in der klinischen Erprobung befindlichen Wirkstoffes gegen virusbedingte grippale Infekte.

Influenza-A-Viren besitzen auf ihrer Oberfläche drei für die Infektion notwendige Glykoproteine: die Sialidase, die bisweilen auch noch als „rezeptorzerstörendes Enzym“ bezeichnet wird (siehe Tab. 1), das Fusionsprotein und das Hämagglutinin [21]. Für das Eindringen der Viren in die Wirtszellen und damit für die Infektion ist vermutlich zuerst die Bindung der Viren an Sialinsäure-haltige Glykokonjugate auf der Zelloberfläche erforderlich. Nachdem das Hämagglutinin diese Anheftung bewirkt hat, tritt für die folgende Aufnahme des Virus in die Zelle das Fusionsprotein in Aktion. Die Sialidase wird schließlich benötigt, um nach dem Ausschleusen der intrazellulär gebildeten Viruspartikel aus der Zelle die Sialinsäuren von der Zelloberfläche abzuspalten, damit die neuen Viruspartikel nicht mit ihrem Hämagglutinin an der Zelle haften bleiben. Nur die Dissozia-

tion von der Zelle ermöglicht es ihnen, neue Zellen zu infizieren [21]. Eine Hemmung dieser Aktivitäten wird damit zu einer verringerten Infektiosität führen können. Als Ansatzpunkt der im folgenden beschriebenen Arbeiten diente die virale Sialidase.

2,3-Dehydro-N-acetyl-neuraminsäure (Neu5Ac2en, Abb. 12) ist ein seit langem bekannter, auch in menschlichen Sekreten vorkommender kompetitiver Inhibitor für Sialidasen, dessen physiologische Bedeutung allerdings nicht sicher bekannt ist. Die Konformation dieses natürlichen Inhibitors ist durch NMR-Spektroskopie aufgeklärt worden. Die zusätzliche Verfügbarkeit von Röntgenstrukturdaten der viralen Sialidase erlaubte eine Anpassung dieser beiden räumlichen Strukturen in einer Computersimulation („molecular docking“) [65]. Dabei ergab sich, daß der Zucker durch das Einfügen eines basischen Substituenten am C-4-Atom besser in das aktive Zentrum des Enzyms

(Abb. 19) passen müßte. Das 4,5-Di-desoxy-4-guanidino-5-trifluoracetyl-Derivat des natürlichen Inhibitors wurde entsprechend dem in Abbildung 21 wiedergegebenen Syntheschema hergestellt und zeigte erwartungsgemäß eine deutlich bessere Inhibition der Sialidase als die Ausgangssubstanz, was

Abb. 20: Darstellung des Sialinsäure-bindenden Peptidfragments aus menschlichem Sarkolektin. Die nach Behandlung von Sarkolektin mit Cyanbromid erhaltenen Peptide wurden in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und entweder durch Silberfärbung sichtbar gemacht (a) oder auf Nitrocellulosemembranen übertragen („blotting“) und dann mit einer Lösung, die markiertes Lymphokin (macrophage migration inhibitory factor, MIF) enthält, überschichtet. Danach werden die Peptide, die MIF binden, sichtbar gemacht (b). Das Verfahren wird als „ligand blotting“ bezeichnet. Die Molekularmassen (kD) von Referenzproteinen sind am linken Rand angegeben.

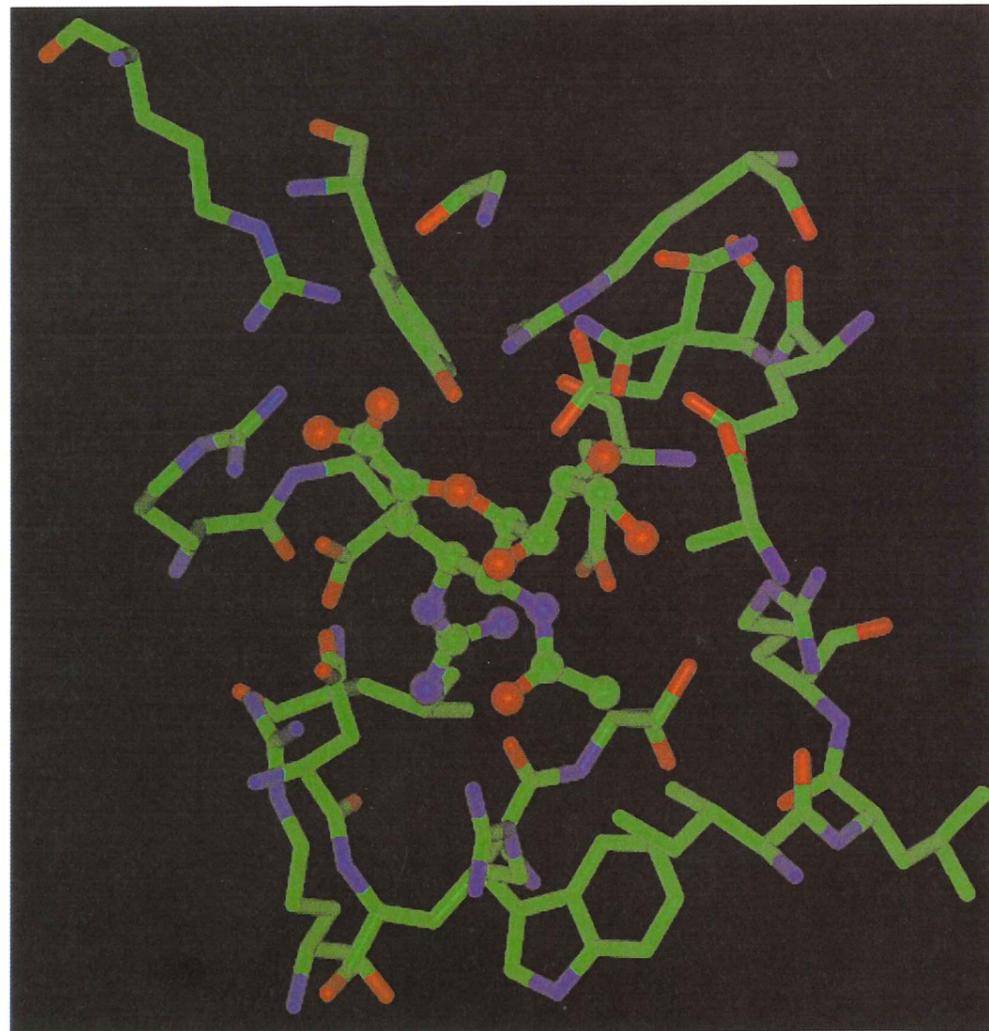
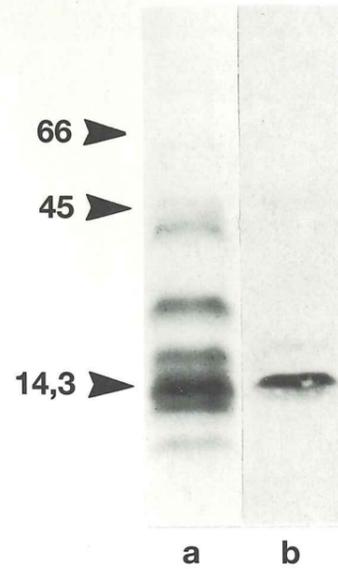


Abb. 19: „Molecular drug design“. In der Abbildung sind einzelne Aminosäurereste des aktiven Zentrums der Sialidase aus Influenza-A-Viren als farbige Stäbchen dargestellt. Die Anordnung wurde aus der Röntgenstrukturanalyse dieses Enzyms erhalten. Die Konformation des 4-Guanidinderivats von Neu5Ac2en ist als farbiges „stick and ball“-Modell wiedergegeben und der Proteinkonformation angepaßt. Der natürlich vorkommende Sialidase-Inhibitor Neu5Ac2en trägt eine OH-Gruppe anstelle der Guanidinfunktion am C-4 und paßt sich der Faltung des Proteins im Bereich des aktiven Zentrums weniger gut an, so daß die Inhibition der enzymatischen Aktivität geringer ist.

seine klinische Testung rechtfertigt [66]. Diese gezielte Synthese eines pharmazeutischen Wirkstoffes aufgrund von Strukturdaten eines aktiven Proteinzentrums ist ein Beispiel für den erfolgreichen Einsatz des „computer-assisted drug design“.

Glykomimetika

Grundlage dieser Methode ist es, Kontaktpunkte für hydrophile und hydrophobe Wechselwirkungen von Liganden mit dem Protein so zu positionieren, daß die sich ergebende Interaktion

Abb. 21: Synthese eines viralen Sialidase-Inhibitors. Das Schema gibt die Synthese von 2,3-Dehydro-N-trifluoracetyl-4-desoxy-4-guanidoneuraminsäure aus 2,3-Dehydro-N-acetyl-4-azido-4-desoxy-neuraminsäuremethylester wieder (Boc = t-Butyloxycarbonyl). Diese Verbindung wurde als Inhibitor der viralen Sialidase eingesetzt. Ähnliche Derivate befinden sich gegenwärtig in der klinischen Testung als Antigrippemittel [66].

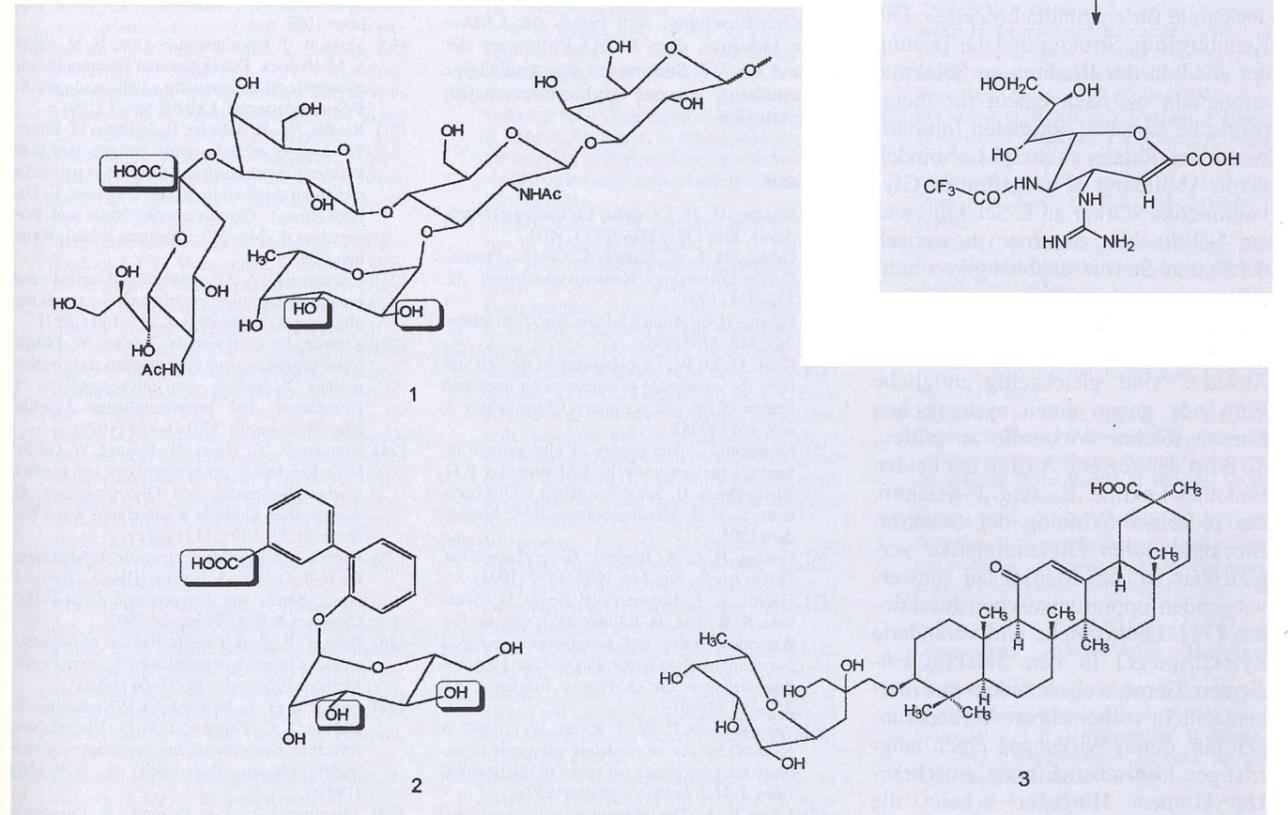
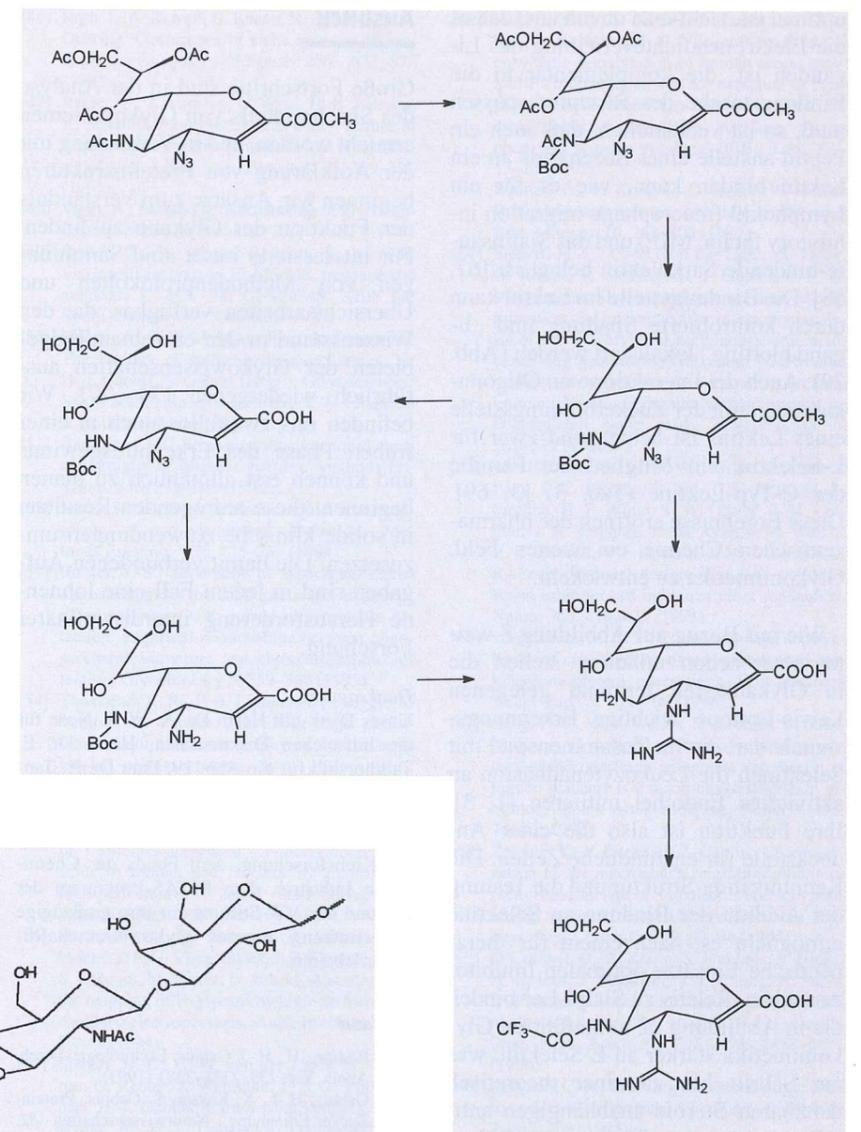


Abb. 22: Sialyl-Lewis^x und potente Glykomimetika. Mit den Verbindungen 2 und 3 wurden zwei synthetische Zuckerderivate hergestellt, deren Affinität zu E-Selektin 1,5- bzw. 5fach höher ist als die des Bindungspartners Sialyl-Lewis^x (1). Die Gruppen, die die strukturelle Analogie der Verbindungen 1 und 2 ausmachen, sind farblich gekennzeichnet. Die Glykomimetika wurden aufgrund der durch NMR-Spektroskopie erhaltenen Konformation von Sialyl-Lewis^x, der Modelle zur Kontaktbildung zwischen Selektin und seinen Liganden sowie eingehender Computermodellierung entwickelt.

optimal ist. Geht man davon aus, daß es die Elektronendichteverteilung des Liganden ist, die komplementär in die Bindungstasche des Rezeptors passen muß, so ist verständlich, daß auch ein Peptid anstelle eines Saccharids an ein Lektin binden kann, wie es für ein Lymphokin (macrophage migration inhibitory factor, MIF) und das Sialinsäure-bindende Sarkolektin belegt ist [67, 68]. Die Bindungsstelle im Lektin kann durch kontrollierte Spaltung und „ligand blotting“ lokalisiert werden (Abb. 20). Auch die Interaktion von Oligonucleotiden mit der Zuckerbindungsstelle eines Lektins ist belegt, und zwar für L-Selektin, ein Mitglied der Familie der C-Typ-Lektine (Tab. 3) [3, 69]. Diese Ergebnisse eröffnen der pharmazeutischen Chemie ein weites Feld, Glykomimetika zu entwickeln.

Wie mit Bezug auf Abbildung 8 weiter oben schon erläutert, stellen die in Glykanketten terminal gelegenen Lewis-Epitope wichtige Erkennungssignale dar, die im Zusammenspiel mit Selektinen die Leukozytenadhäsion an aktiviertes Endothel initiieren [1, 3]. Ihre Funktion ist also die einer Andockstelle für entzündliche Zellen. Die Kenntnis ihrer Struktur und die Testung der Avidität der Bindung an Selektine ermöglicht es, nach einem für therapeutische Einsätze optimalen Inhibitor zu suchen. Relativ zu Sialyl-Le^x binden die in Abbildung 22 aufgeführten Glykomimetika stärker an E-Selektin, was ein Schritt hin zu einer theoretisch denkbaren Steroid-unabhängigen antiinflammatorischen Therapie ist [70].

Neben der Fortentwicklung dieses Ansatzes sind gleichzeitig mögliche Einwände gegen einen systemischen Einsatz solcher Wirkstoffe zu prüfen. So führt der gezielte Ausfall der beiden Endothel-Lektine E- und P-Selektin, der in seiner Wirkung der Selektin-Blockade durch Glykomimetika vergleichbar ist, bei Mäusen zu schwerwiegenden opportunistischen Infektionen [71]. Leukozytose und veränderte Zytokinpiegel in den Selektin-defizienten Tieren weisen zudem auf markante, nicht vorhersehbare Veränderungen hin, deren Wirkungen einen langfristigen klinischen Einsatz einschränken können. Hingegen scheint die kurzfristige Anwendung solcher Inhibitoren der Adhäsion von Leukozyten zur Begrenzung eines Schadens bei fokaler zerebraler und myokardialer Ischämie denkbar [72, 73].

Ausblick

Große Fortschritte sind in der Analyse des Saccharidteils von Glykoproteinen erreicht worden, und in Verbindung mit der Aufklärung von Proteinstrukturen beginnen wir, Ansätze zum Verständnis der Funktion der Glykane zu finden. Für interessierte Leser sind Sammlungen von Methodenprotokollen und Übersichtsarbeiten verfügbar, die den Wissensstand in den einzelnen Teilgebieten der Glykowissenschaften ausführlich wiedergeben [74–77]. Wir befinden uns zweifellos noch in einer frühen Phase des Erkenntnisgewinns und können erst allmählich zu planen beginnen, diese aufregenden Resultate in solide klinische Anwendungen umzusetzen. Die damit verbundenen Aufgaben sind in jedem Fall eine lohnende Herausforderung interdisziplinärer Forschung.

Danksagung:

Unser Dank gilt Herrn Dr. A. W. L. Nose für die hilfreichen Diskussionen, Herrn Dr. E. Tajkhorshid für die Abb. 19, Frau Dr. H. Tapert für die Hilfe bei der Anfertigung der Grafiken, sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Dr.-Mildred-Scheel-Stiftung für Krebsforschung, dem Fonds der Chemischen Industrie, dem INTAS-Programm der EU und der VW-Stiftung für ihre großzügige Unterstützung unserer glykowissenschaftlichen Arbeiten.

Literatur

- Rüdiger, H., H.-J. Gabius: Lectinologie. Dtsch. Apoth. Ztg. 133, 2371–2381 (1993).
- Gabius, H.-J., K. Kayser, S. Gabius: Protein-Zucker-Erkennung. Naturwissenschaften 82, 533–534 (1995).
- Gabius, H.-J.: Animal lectins. Eur. J. Biochem. 243, 543–576 (1997).
- Cook, G. M. W.: Glycobiology of the cell surface: the emergence of sugars as an important feature of the cell periphery. Glycobiology 5, 449–461 (1995).
- Montreuil, J.: The history of glycoprotein research, a personal view. In: J. Montreuil, J. F. G. Vliegthart, H. Schachter (Hrsg.): Glycoproteins, S. 1–12. Elsevier Science B.V., Amsterdam 1995.
- Gabius, H.-J., A. Bardosi: Neoglykoproteine. Dtsch. Apoth. Ztg. 134, 1964–1971 (1994).
- Gabius, S., K. Kayser, N. V. Bovin, N. Yamazaki, S. Kojima, H. Kaltner, H.-J. Gabius: Endogenous lectins and neoglycoconjugates: a sweet approach to tumor diagnosis and targeted drug delivery. Eur. J. Pharm. Biopharm. 42, 250–261 (1996).
- von der Lieth, C.-W., T. Kozar, W. E. Hull: A (critical) survey of modeling protocols to explore the conformational space of oligosaccharides. J. Mol. Struct., in press (1997).
- Laine, R. A.: The information-storing potential of the sugar code. In: H.-J. Gabius, S. Gabius (Hrsg.): Glycosciences: Status and Perspectives, S. 1–14. Chapman & Hall, Weinheim 1997.
- Vliegthart, J. F. G., J. Montreuil: Structure of N-linked glycans. In: J. Montreuil, J. F. G. Vliegthart, H. Schachter (Hrsg.): Glycoproteins,

- S. 20–100. Elsevier Science B.V., Amsterdam 1995.
- Brockhausen, I., H. Schachter: Glycosyltransferases involved in N- and O-glycan biosynthesis. In: H.-J. Gabius, S. Gabius (Hrsg.): Glycosciences: Status and Perspectives, S. 79–113. Chapman & Hall, Weinheim 1997.
- Sharon, N., H. Lis: Glycoproteins: structure and function. In: H.-J. Gabius, S. Gabius (Hrsg.): Glycosciences: Status and Perspectives, S. 133–162. Chapman & Hall, Weinheim 1997.
- O'Connor, S. E., B. Imperiali: Modulation of protein structure and function by asparagine-linked glycosylation. Chemistry & Biology 3, 803–812 (1996).
- Shakin-Eshleman, S. H., S. L. Spitalnik, L. Kasturi: The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-glycosylation efficiency. J. Biol. Chem. 271, 6363–6366 (1996).
- Verbert, A.: Biosynthesis of N-linked glycoproteins. In: J. Montreuil, J. F. G. Vliegthart, H. Schachter (Hrsg.): Glycoproteins, S. 111–222. Elsevier Science B.V., Amsterdam 1995.
- Pavelka, M.: Topology of glycosylation – a histochemist's view. In: H.-J. Gabius, S. Gabius (Hrsg.): Glycosciences: Status and Perspectives, S. 115–120. Chapman & Hall, Weinheim 1997.
- Ponnambalam, S., G. Banting: Protein secretion: sorting sweet sorting. Curr. Biol. 6, 1076–1078 (1996).
- Parodi, A. J.: The UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase and the quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. Trends Glycosci. Glycotechnol. 8, 1–12 (1996).
- Hathaway, H. J., B. D. Shur: Transgenic approaches to glycobiology. In: H.-J. Gabius, S. Gabius (Hrsg.): Glycosciences: Status and Perspectives, S. 507–517. Chapman & Hall, Weinheim 1997.
- Varki, A., F. Hooshmand, S. Diaz, N. M. Varki, S. M. Hedrick: Developmental abnormalities in transgenic mice expressing a sialic acid-specific 9-O-acetyltransferase. Cell 65, 65–74 (1991).
- Reutter, W., R. Stäsche, P. Stehling, O. Baum: The biology of sialic acids: insights into their structure, metabolism and function in particular during viral infection. In: H.-J. Gabius, S. Gabius (Hrsg.): Glycosciences: Status and Perspectives, S. 245–259. Chapman & Hall, Weinheim 1997.
- Cumming, D. A.: Glycosylation of recombinant protein therapeutics: control and functional implications. Glycobiology 1, 115–130 (1991).
- Köttgen, E., C. Bauer, W. Reutter, W. Gerok: Neue Ergebnisse zur biologischen und medizinischen Bedeutung von Glykoproteinen. I. Grundlagen und interdisziplinäre Aspekte. Klin. Wochenschr. 57, 151–159 (1979).
- Köttgen, E., C. Bauer, W. Reutter, W. Gerok: Neue Ergebnisse zur biologischen und medizinischen Bedeutung von Glykoproteinen. II. Ausgewählte klinische Fachgebiete. Klin. Wochenschr. 57, 199–214 (1979).
- Kopitz, J.: Glycolipids: structure and function. In: H.-J. Gabius, S. Gabius (Hrsg.): Glycosciences: Status and Perspectives, S. 163–189. Chapman & Hall, Weinheim 1997.
- Patel, T. P., R. B. Parekh: Release of oligosaccharides from glycoproteins by hydrazinolysis. Methods Enzymol. 230, 57–66 (1994).
- Berger, E. G., E. Buddecke, J. P. Kamerling, A. Kobata, J. C. Paulson, J. F. G. Vliegthart: Structure, biosynthesis and functions of glycoprotein glycans. Experientia 38, 1129–1162 (1982).
- Tarentino, A. L., T. H. Plummer, Jr.: Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from *Flavobacterium meningosepticum*. Methods Enzymol. 230, 44–57 (1994).
- Jacob, G. S., P. Scudder: Glycosidases in struc-

- tural analysis. Methods Enzymol. 230, 280–299 (1994).
- Ishii-Karakasa, I., H. Iwase, K. Hotta, Y. Tanaka, S. Omura: Partial purification and characterization of an endo- α -N-acetylgalactosaminidase from the culture medium of *Streptomyces* sp. OH-11242. Biochem. J. 288, 475–482 (1992).
- Tauber, R., C.-S. Park, A. Becker, R. Geyer, W. Reutter: Rapid intramolecular turnover of N-linked glycans in plasma membrane glycoproteins. Extension of intramolecular turnover to the core sugars in plasma membrane glycoproteins of hepatoma. Eur. J. Biochem. 186, 55–62 (1989).
- Suzuki, T., K. Kitajima, S. Inoue, Y. Inoue: Occurrence and potential functions of N-glycanases. In: H.-J. Gabius, S. Gabius (Hrsg.): Glycosciences: Status and Perspectives, S. 121–131. Chapman & Hall, Weinheim 1997.
- Kamerling, J. P., G. J. Gerwig, J. F. G. Vliegthart, J. R. Clamp: Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. Biochem. J. 151, 491–495 (1975).
- Hounsell, E. F.: Methods for glycoconjugate analysis. In: H.-J. Gabius, S. Gabius (Hrsg.): Glycosciences: Status and Perspectives, S. 15–29. Chapman & Hall, Weinheim 1997.
- Hardy, M. R., R. Townsend: High-pH anion-exchange chromatography of glycoprotein-derived carbohydrates. Methods Enzymol. 230, 208–225 (1994).
- Reutter, G., H.-J. Gabius: Sialic acids. Structure – analysis – metabolism – occurrence – recognition. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 377, 325–342 (1996).
- Reutter, G., R. Schauer: Determination of sialic acids. Methods Enzymol. 230, 168–199 (1994).
- Reutter, G., R. Pfeil, S. Stoll, R. Schauer, J. P. Kamerling, C. Versluis, J. F. G. Vliegthart: Identification of new sialic acids derived from glycoprotein of bovine submandibular gland. Eur. J. Biochem. 134, 139–143 (1983).
- Kamerling, J. P., J. F. G. Vliegthart, J. Vink: Mass spectrometry of pertrimethylsilyl neuraminic acid derivatives. Carbohydr. Res. 33, 297–306 (1974).
- Bergwerff, A. A., S. H. D. Hulleman, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegthart, L. Shaw, G. Reutter, R. Schauer: Nature and biosynthesis of sialic acids in the starfish *Asterias rubens* – Identification of sialo-oligomers and detection of S-adenosyl-L-methionine – N-acetylneuraminic acid 8-O-methyltransferase and CMP-N-acetylneuraminic acid monooxygenase activities. Biochimie 74, 25–37 (1992).
- Reutter, G., R. Schauer: Comparison of electron and chemical ionization mass spectrometry of sialic acids. Anal. Biochem. 157, 39–46 (1986).
- Reutter, G., R. Schauer: Enzymic methods of sialic acid analysis. Methods Carbohydr. Chem. 10, 29–39 (1994).
- Varki, A.: Diversity in sialic acids. Glycobiology 2, 25–40 (1992).
- Klotz, F. W., P. A. Orlandi, G. Reutter, S. J. Cohen, J. D. Haynes, R. Schauer, R. J. Howard, P. Palese, L. H. Miller: Binding of *Plasmodium falciparum* 175-kilodalton erythrocyte binding antigen and invasion of murine erythrocytes requires N-acetylneuraminic acid but not its O-acetylated form. Mol. Biochem. Parasitol. 51, 49–54 (1992).
- Krauss, J. H., K. Himmelspach, G. Reutter, R. Schauer, H. Mayer: Structural analysis of a novel sialic acid-containing trisaccharide from *Rhodobacter capsulatus* 37b4 lipopolysaccharide. Eur. J. Biochem. 204, 217–223 (1992).

- Roth, J., A. Kempf, G. Reutter, R. Schauer, W. J. Gehring: Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*. Science 256, 673–675 (1992).
- Reutter, G., J. Aumann, U. Wyss, H. B. Jansson, R. Schauer: *Panagrellus redivivus* – failure to find evidence for the occurrence and biosynthesis of sialic acids. Exp. Parasitol. 73, 389–395 (1991).
- Varki, A.: Metabolic radiolabeling of glycoconjugates. Methods Enzymol. 230, 16–32 (1994).
- Reutter, G., W. Wagner-Redeker, R. Schauer: Sialic acid analysis by EI-MS/MS, methane and ammonia CI-MS, and CI-MS/MS. XIIth Int. Symp. Carbohydr., Yokohama 1990.
- Hooper, L. V., S. M. Manzella, J. U. Baenziger: The biology of sulfated oligosaccharides. In: H.-J. Gabius, S. Gabius (Hrsg.): Glycosciences: Status and Perspectives, S. 261–276. Chapman & Hall, Weinheim 1997.
- Baenziger, J. U.: High-performance liquid chromatography of oligosaccharides. Methods Enzymol. 230, 237–249 (1994).
- Hase, S.: High-performance liquid chromatography of pyridylaminated saccharides. Methods Enzymol. 230, 225–237 (1994).
- Rohrer, J. S.: Separation of asparagine linked oligosaccharides by high pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection: empirical relationships between oligosaccharide structure and chromatographic retention. Glycobiology 5, 359–360 (1995).
- Townsend, R. R., P. H. Lipniunas, C. Bigge, A. Ventom, R. Parekh: Multimode high performance liquid chromatography of fluorescently labeled oligosaccharides from glycoproteins. Anal. Biochem. 239, 200–207 (1996).
- Hara, S., M. Yamaguchi, Y. Takemori, K. Furuhashi, H. Ogura, M. Nakamura: Determination of mono-O-acetylated N-acetylneuraminic acids in human and rat sera by fluorimetric high-performance liquid chromatography. Anal. Biochem. 179, 162–166 (1989).
- Hermentin, P., R. Doenges, R. Witzel, C. H. Hokke, J. F. G. Vliegthart, J. P. Kamerling, H. S. Conradt, M. Nimtz, D. Brazel: A strategy for the mapping of N-glycans by high-performance capillary electrophoresis. Anal. Biochem. 221, 29–41 (1994).
- Siebert, H.-C., C.-W. von der Lieth, M. Gilletron, G. Reutter, J. Wittmann, J. F. G. Vliegthart, H.-J. Gabius: Carbohydrate-protein interaction. In: H.-J. Gabius, S. Gabius (Hrsg.): Glycosciences: Status and Perspectives, S. 291–310. Chapman & Hall, Weinheim 1997.
- Siebert, H.-C., M. Gilleron, H. Kaltner, C.-W. von der Lieth, T. Kozar, N. V. Bovin, E. Y. Korchagina, J. F. G. Vliegthart, H.-J. Gabius: NMR-based, molecular dynamics- and random walk molecular mechanics-supported study of conformational aspects of a carbohydrate ligand (Gal β 1-2Gal β 1-R) for an animal galectin in the free and in the bound state. Biochem. Biophys. Res. Commun. 219, 205–212 (1996).
- Vliegthart, J. F. G., L. Dorland, H. van Halbeek: High-resolution ¹H-NMR spectroscopy as a tool in structural analysis of carbohydrates related to glycoproteins. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 41, 209–374 (1983).
- Klein, A., C. Carnoy, J. M. Wieruszkeski, G. Strecker, A. M. Strang, H. van Halbeek, P. Roussel, G. Lamblin: The broad diversity of neutral and sialylated oligosaccharides derived from human salivary mucins. Biochemistry 31, 6152–6165 (1992).
- Montreuil, J.: Spatial structures of glycan chains of glycoproteins in relation to metabolism and function. Survey of a decade of research. Pure Appl. Chem. 56, 859–877 (1984).
- Siebert, H.-C., S. André, G. Reutter, H.-J. Gabius, R. Kaptein, J. F. G. Vliegthart: Effect of enzymatic desialylation of human serum amyloid P component on surface exposure of laser photo CIDNP (chemically induced dynamic nuclear polarization)-reactive histidine, tryptophan and tyrosine residues. FEBS Lett. 371, 13–16 (1995).
- Reutter, W., E. Köttgen, C. Bauer, W. Gerok: Biological significance of sialic acids. Cell Biol. Monogr. 10, 263–305 (1982).
- Siebert, H.-C., C.-W. von der Lieth, X. Dong, G. Reutter, R. Schauer, H.-J. Gabius, J. F. G. Vliegthart: Molecular dynamics-derived conformation and intramolecular interaction analysis of the N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid-containing ganglioside GD1a and NMR-based analysis of its binding to a human polyclonal immunoglobulin G fraction with selectivity for O-acetylated sialic acids. Glycobiology 6, 561–572 (1996).
- von Itzstein, M., W.-Y. Wu, G. B. Kok, M. S. Pegg, J. C. Dayson, B. Jin, T. V. Phan, M. L. Smythe, H. F. White, S. W. Oliver, P. M. Colman, J. N. Varghese, D. M. Ryan, J. M. Woods, R. C. Bethell, V. J. Hotham, J. M. Cameron, C. R. Penn: Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. Nature 363, 418–423 (1993).
- von Itzstein, M., P. M. Colman: Design and synthesis of carbohydrate-based inhibitors of carbohydrate-protein interactions. Curr. Opin. Struct. Biol. 6, 703–709 (1996).
- Zeng, F. Y., W. Y. Weiser, H. Kratzin, B. Stahl, M. Karas, H.-J. Gabius: The major binding protein of the interferon antagonist sarcolectin in human placenta is a macrophage migration inhibitory factor. Arch. Biochem. Biophys. 303, 74–80 (1993).
- Zeng, F. Y., V. Gerke, H.-J. Gabius: Characterization of the macrophage migration inhibitory factor-binding site of sarcolectin and its relationship to human serum albumin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 200, 89–94 (1994).
- O'Connell, D., A. König, S. Jennings, B. Hicke, H.-L. Han, T. Fitzwater, Y.-F. Chang, N. Varki, D. Parma, A. Varki: Calcium-dependent oligonucleotide antagonists specific for L-selectin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 5883–5887 (1996).
- Bertozi, C. R.: Cracking the carbohydrate code for selectin recognition. Chemistry & Biology 2, 703–708 (1995).
- Frenette, P. S., T. N. Mayadas, H. Rayburn, R. O. Hynes, D. D. Wagner: Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. Cell 84, 563–574 (1996).
- Morikawa, E., S.-M. Zhang, Y. Seko, T. Toyoda, T. Kirino: Treatment of focal cerebral ischemia with synthetic oligopeptide corresponding to lectin domain of selectin. Stroke 27, 951–956 (1996).
- Seko, Y., Y. Enokawa, T. Nakao, H. Yagita, K. Okumura, Y. Yazaki: Reduction of rat myocardial ischemia/reperfusion injury by a synthetic selectin oligopeptide. J. Pathol. 178, 335–342 (1996).
- Gabius, H.-J., S. Gabius (Hrsg.): Lectins and Glycobiology. Springer-Verlag, Heidelberg 1993.
- Hounsell, E. F. (Hrsg.): Glycoprotein Analysis in Biomedicine. Humana Press, Totowa 1993.
- Montreuil, J., J. F. G. Vliegthart, H. Schachter (Hrsg.): Glycoproteins. Elsevier Science B.V., Amsterdam 1995.
- Gabius, H.-J., S. Gabius (Hrsg.): Glycosciences: Status and Perspectives. Chapman & Hall, Weinheim 1997.