



Alexandra Samsen (Autor)
**Humane Glykorezeptoren zur Charakterisierung
tumorassoziierter Glykostrukturen**

Alexandra Samsen

**Humane Glykorezeptoren zur
Charakterisierung tumorassoziierter
Glykostrukturen**



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/689>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

1. Einleitung

Die Glykobiologie ist im Vergleich zur Proteinbiochemie und der klassischen Molekularbiologie ein recht junger Zweig der Biologie. Aufgabe der Glykobiologie ist die Bestimmung der biologischen Funktionen von Kohlenhydraten, die von Proteinen, Membranen und Lipiden getragen werden und die Aufklärung, wie diese Funktionen ausgeführt werden.

Bestandteile humaner Glykoproteine sind acht Monosaccharide, die zur Bildung einer enormen Strukturvielfalt an Oligosaccharidstrukturen zur Verfügung stehen. Bei den Monosacchariden handelt es sich um β -D-Glucose, β -D-Galactose, β -D-Xylose, β -D-Fucose, β -D-Mannose und die Aminosucker N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalactosamin und N-Acetylneuraminsäure. Aus diesen acht Monosacchariden entsteht theoretisch eine 1000 Mal grössere Vielfalt an resultierenden Kohlenhydratstrukturen im Vergleich zu der Anzahl von Proteinen, die aus den 21 Aminosäuren entstehen könnten. Diese Strukturvielfalt kommt durch die vielfältigen Verknüpfungsmöglichkeiten über die Anzahl der zur Verfügung stehenden Hydroxylgruppen und die anomeren Zentren der C1-Atome, über die die Verknüpfung zweier Monosaccharide α - oder β -glykosidisch erfolgen kann, zustande.

Über die Hälfte aller natürlich vorkommenden Proteine sind glykosyliert und nahezu alle Proteine aus humanem Serum (Apweiler et al, 1999; Brooks, 2009; Hanisch, 2001). Sie besitzen eine oder mehrere potentielle Glykosylierungsstellen für die N-/oder O-verknüpfte Glykosylierung. Diese Proteine können an diesen Stellen mit unterschiedlichen Glykanstrukturen glykosyliert werden.

Krebs gehört zu einer der weitverbreitetsten humanen Erkrankungen. Die maligne Transformation epithelialer Zellen ist häufig mit der Veränderung von Glykosylierungs-*Pathways* assoziiert. Die Tumorprogression ist ein mehrstufiger Prozess, der über Jahrzehnte erfolgen kann. Tumoren haben im Allgemeinen einen klonalen Ursprung und entwickeln sich aus einer einzigen Zelle. Entscheidend für eine erfolgreiche Therapie ist eine möglichst frühe Erkennung der malignen Transformation von Zellen. Zur Detektion dieser Veränderungen werden ständig neue *tools* benötigt, die zur Entwicklung neuer, präventiver und therapeutischer Strategien beitragen.

Um Veränderungen der Glykosylierung in Tumoren detektieren zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit humane Glykorezeptoren rekombinant hergestellt und als Sonden zur Untersuchung humaner Tumoren und Normalgewebe eingesetzt.

1.1 Posttranslationale Modifikationen

Die Glykosylierung gehört neben der Phosphorylierung zu den wichtigsten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen. Alle natürlich vorkommenden Zellen sind von einer dichten und komplexen Kohlenhydratschicht überzogen.

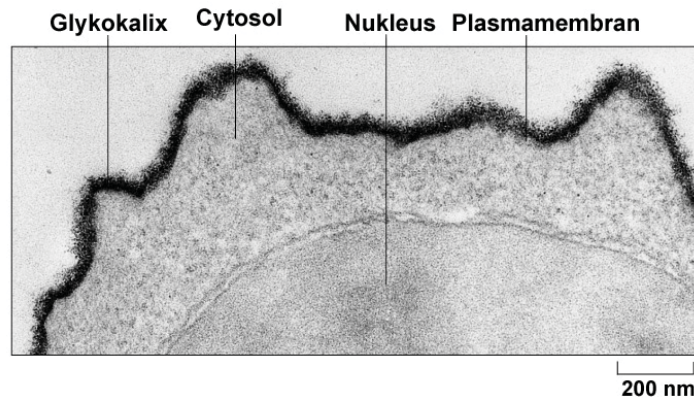


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Glykokalix eines Lymphozyten. Verändert nach (Alberts & Bray, 1994).

Unter der Glykosylierung versteht man die Anheftung und folgende Prozessierung von Kohlenhydraten. Die meisten humanen Plasmamembran- und Sekretionsproteine tragen mindestens eine Kohlenhydratkette. Die Anwesenheit eines Oligosaccharidrestes in sekretierten und membrangebundenen Proteinen erhöht die Löslichkeit in Wasser, trägt zur richtigen Orientierung des Moleküls bei, schützt es vor Proteasen und wird für einen effizienten intrazellulären Transport benötigt (Dall'olio, 1996).

Es gibt drei Hauptklassen von Glykokonjugaten. Glykane, die mit einem Protein über ein Stickstoff- (N-) Atom verknüpft sind (*N-linked*), Glykane, die mit einem Protein über ein Sauerstoff- (O-) Atom verknüpft sind (*O-linked*) und Glykane, die an Lipide gebunden sind. Die häufigsten humanen Oligosaccharide der Glykoproteine sind N- und O-Glykane. Oligosaccharide sind sekundäre Genprodukte, die aus Nukleotidzuckern und phosphorylierten Isoprenabkömmlingen gebildet werden. Für die Biosynthese der Glykane sind hochspezifische Glykosyltransferasen und Nukleotidzuckertransporter essentiell.

1.2 N-Glykosylierung

Die kovalente Verknüpfung von Kohlenhydraten an Proteine erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum. Die N-Glykosylierung kann nur an einem Asparaginrest erfolgen. Es können aber nicht alle Asparagin-Reste ein N-Glykan akzeptieren. Ein N-Glykan ist ein Polysaccharid, das kovalent mit dem Stickstoff der Aminogruppe in der Seitenkette von Asparagin (Asn) verknüpft ist. Die minimale Erkennungs-Sequenz ist Asparagin, gefolgt von einer beliebigen Aminosäure mit Ausnahme von Prolin und endet mit Serin oder Threonin (Asn-X-Ser oder Asn-X-Thr). Somit ist die Aminosäure-Sequenz Asn-X-Ser/Thr ein "Sequon" für eine N-Glykosylierung in einem Protein. Ein „Sequon“ ist eine Sequenz bestehend aus drei aufeinander folgenden Aminosäuren in einem Protein, die als potentielle Anheftungsstelle an ein Polysaccharid, das als N-Glykan bezeichnet wird, dient. Der Begriff wurde wahrscheinlich erstmals von Derek Marshall verwendet (Marshall, 1974). Bei eukaryoten Zellen ist das an ein Asparagin gebundene Oligosaccharid immer ausnahmslos N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und die Verknüpfung erfolgt in der β -Konfiguration. Diese Bindung wird GlcNAc β 1-Asn abgekürzt (Abb. 2) (Taylor & Drickamer, 2006). Alle N-Glykane bestehen aus einer einheitlichen Kern-(Core-) Struktur mit der Sequenz Man α 1-6(Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn-X-Ser/Thr. Sie werden in drei Typen klassifiziert:

High-Mannose: Es sind ausschließlich Mannose Reste mit der *Core*-Region verknüpft.

Komplex: Antennäre Strukturen werden von N-Acetylglucosaminyltransferasen (GlcNAcTs) an die *Core* Region angeheftet.

Hybrid: Am Man α 1-6-Arm der *Core* Region sind ausschließlich Mannose-Reste angeheftet. Eine oder zwei antennäre Strukturen befinden sich am Man α 1-3-Arm.

In Abb. 2 sind Beispiele für jeweils einen Typ dargestellt.

N-Glykane entstehen durch eine komplizierte Biosynthese. Auf ein Protein, das in der dreidimensionalen Struktur vorliegt, wird im Lumen des Endoplasmatischen Retikulum (ER) eine Oligosaccharidvorstufe, bestehend aus 14 Monosaccharideinheiten (eine Glc₃Man₉GlcNAc₂-Struktur), die mit einem Lipid Dolichol verknüpft und an der ER-Membran fixiert ist, als Einheit übertragen. Die weitere enzymatische Prozessierung erfolgt teils im ER und größtenteils im Golgi-Apparat. Im ER werden vom Oligosaccharid der meisten Glykoproteine drei Glucosereste und ein Mannoserest durch Glykosidasen und Mannosidasen entfernt. Im Golgi-Apparat folgt die Anheftung von Glykanresten durch Glykosyltransferasen, um

Verzweigungen und terminale Strukturen zu bilden. Durch dieses sog. „Trimmen“ entstehen aus unreifen Glykoproteinen Hybride und Komplexe Glykane in Glykoproteinen.

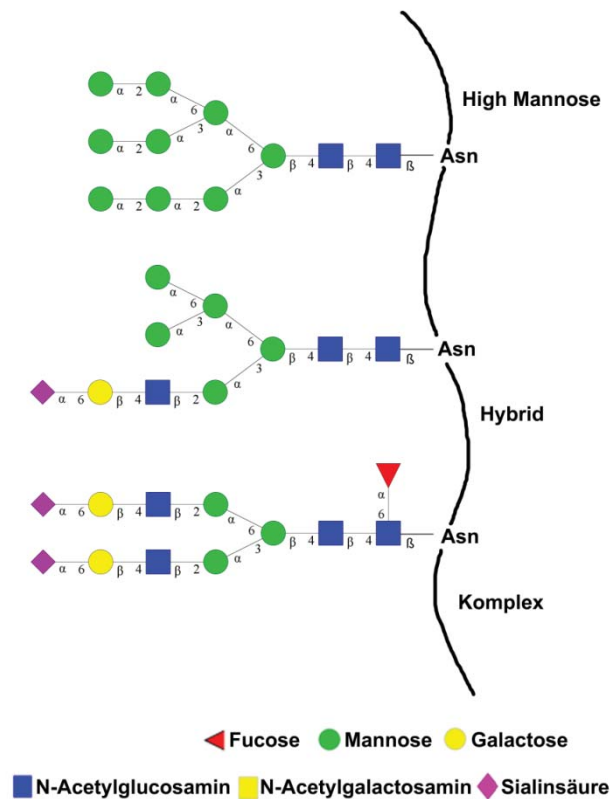

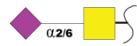

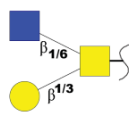

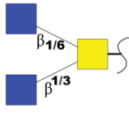





Abb. 2: Schematische Übersicht der unterschiedlichen N- und O-Glykan-Typen in Glykoproteinen. Darstellung in Symbolschreibweise.

1.3 O-Glykosylierung

O-verknüpfte Oligosaccharide sind weitaus seltener an Glykoproteinen als N-verknüpfte Oligosaccharide zu finden. O-glykosylierte Proteine entstehen durch unterschiedliche Protein-Glykan-Verknüpfungen, in denen GalNAc, Fucose, GlcNAc, Mannose, Xylose oder Galactose an die Hydroxylgruppen in den Seitenketten von Serin oder Threonin oder Hydroxyllysin angefügt werden. Die Biosynthese der O-verknüpften Glykoproteine erfolgt im cis- bis trans-Golgi-Apparat (Brockhausen, 1999). O-verknüpfte Glykane besitzen im Gegensatz zu den N-verknüpften Glykanen keine einheitliche Kern- (*Core-*) Struktur, sondern man unterscheidet 7 *Core*-Strukturen (Tab. 1). Die *Core*-Strukturen der O-verknüpften Glykane sind kleiner als die *Core*-Struktur der N-verknüpften Glykane. O-verknüpfte Glykane weisen sehr vielfältige Strukturen auf. Die verbreitetste und einfachste Form O-glykosylierter Proteine, die in Säugetieren bekannt ist, ist vom Mucin-Typ. Hierbei wird N-Acetylgalactosamin (GalNAc) mit

Serin oder Threonin verknüpft. Dieses Glykan wird als Tn-Antigen bezeichnet (Brockhausen, 1999). Mucine sind hoch O-glykosylierte Proteine, die strukturgebenden Bestandteile des Schleims auf den Schleimhäuten (z. B. von Magen, Darm, Augen und Nase). Diese Glykoproteine besitzen durch die Polysaccharide eine hohe Wasserbindungskapazität, wodurch das Protein vor proteolytischem Abbau geschützt wird.

Name	Symbol	Struktur
Tn Epitop		GalNAc α 1 ~Ser/Thr
Sialyl Tn		NeuNAc(α 2-6)GalNAc α 1~Ser/Thr
Core 1 (T- oder TF-Antigen)		Gal(β 1-3)GalNAc α ~Ser/Thr
Core 2		GlcNAc(β 1-6)[Gal β (1-3)]GalNAc α 1~Ser/Thr
Core 3		GlcNAc(β 1-3)GalNAc α 1~Ser/Thr
Core 4		GlcNAc(β 1-6)[GlcNAc(β 1-3)]GalNAc α 1~Ser/Thr
Core 5		GalNAc(α 1-3)GalNAc α 1~Ser/Thr
Core 6		GlcNAc(β 1-6)GalNAc α 1~Ser/Thr
Core 7		GalNAc(α 1-6)GalNAc α 1~Ser/Thr

Tab. 1: Core Strukturen Mucin-Typ O-verknüpfter Glykane. Verändert nach (Brooks, 2009).

1.4 Veränderungen der Glykosylierung bei der Tumorentstehung

Die meisten sekretorischen und membrangebundenen Proteine, die von eukaryoten Zellen exprimiert werden, tragen kovalent gebundene Kohlenhydratketten. Veränderungen dieser Kohlenhydratketten von Glykoproteinen wurden in unterschiedlichen Tumoren beobachtet und sind ein Merkmal von Tumorzellen (Brooks et al, 2008). Da die Kohlenhydratketten essentiell für die Kommunikation zwischen differenzierten Zellen in multizellulären Organismen sind, stellen Veränderungen der Glykanstrukturen die molekulare Grundlage für das abnorme Verhalten von Tumorzellen, wie die Invasion in benachbarte Gewebe und die Metastasierung dar (Kobata & Amano, 2005). Bestimmte Glykanstrukturen sind bereits bekannte Marker für die Tumorprogression (Hakomori, 2002). Es sind einige biosynthetische *Pathways* bekannt, die in Tumor-Zellen häufig verändert sind, sowie Korrelationen zwischen der veränderten Glykosylierung von Tumorzellen und der klinischen Prognose für die betroffenen Patienten.

In der Vergangenheit sind einige Korrelationen zwischen der Veränderung der Glykanstrukturen von Glykoproteinen und Glykolipiden, die von Tumoren exprimiert werden, und der malignen Transformation gezeigt worden. Als prominentes Beispiel wird oft die verstärkte N-Acetylglucosaminyltransferase V- (GlcNAc-TV-) und β 1,6GlcNAc-Verzweigung von N-Glykanen erwähnt (Pierce et al, 1997). Durch eine Überexpression des *Mgat5*-Gens, das GlcNAc-TV kodiert, kommt es zu einer verstärkten Expression von GlcNAc-TV, die die β 1,6GlcNAc-Verzweigung von N-Glykanen während der N-Glykan-Biosynthese im Golgi-Apparat katalysiert. In der Folge kommt es zur Ausbildung verzweigter tri- und tetra-antennärer Oligosaccharid-Strukturen (Abb. 4). Solche zusätzlichen Verzweigungen wurden in klinischen und experimentellen Karzinomen nachgewiesen (Kobata, 1996). Die Expression des *Mgat5*-Gens wird durch den RAS-RAF-MAPK-Signalweg reguliert. Dieser Signalweg ist im Allgemeinen in Tumorzellen aktiviert (Dennis et al, 1999).

In der Folge dieser Verzweigungen sind zudem häufig Polylactosamin-Einheiten, die aus repetitiven Gal β 1,4GlcNAc β 1,3-Einheiten bestehen, zu beobachten, an deren Enden unterschiedliche Glykane, häufig Lewis-Antigene, zu finden sind (van den Eijnden et al, 1988) (Abb. 3). Häufig sind auch terminale Sialinsäuren an diesen Polylaktosamin-Einheiten zu beobachten. Das metastatische Potential von Tumorzellen konnte in sehr vielen Fällen in Zusammenhang mit der verstärkten Anwesenheit von Sialinsäuren von Glykoproteinen auf Zelloberflächen gebracht werden (Dennis et al, 1999). Dennoch sind die biologische Bedeutung und die molekularen Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt (Miyagi, 2008).

Gal β 1,4GlcNAc β 1,6(Gal β 1,4GlcNAc β 1,2)Man α -verzweigte N-Glykane konnten in humanen Karzinomen, wie dem Mammakarzinom, dem kolorektalen Karzinom, Ösophaguskarzinom und dem malignen Melanom verstärkt nachgewiesen werden, wobei diese strukturelle Veränderung der Glykosylierung mit einer schlechten Prognose für die Patienten korreliert werden konnte (Dennis et al, 1999).