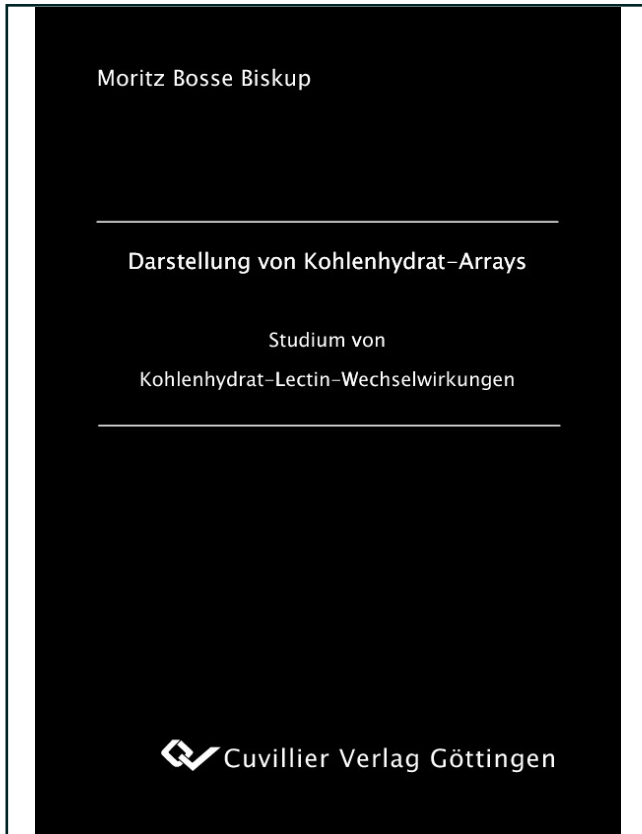




Moritz Bosse Biskup (Autor)
Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays
Studium von Kohlenhydrat-Lectin-Wechselwirkungen



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2062>

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

In den letzten Jahren haben die Aktivitäten im Bereich der Glycobiologie und der Kohlenhydratchemie zugenommen. Durch Fortschritte in der Aufklärung natürlicher Kohlenhydratstrukturen, in der Synthese zunehmend komplexer Kohlenhydrate oder deren Mimetika, sowie wegen ersten therapeutischen Anwendungen auf Kohlenhydratbasis werden zunehmend rascher Einblicke in die vielfältigen Rollen der Kohlenhydrate in biologischen Systemen gewonnen¹. Diese Entwicklung stellt neue Anforderungen an die Entwicklung und Etablierung neuer synthetischer, aber auch analytischer Methoden.

1.1 Kohlenhydrate

Kohlenhydrate, Saccharide, sind, bezogen auf die Masse, die am häufigsten vorkommenden Biomoleküle. Sie werden in Mengen von einigen 100 Milliarden Jahrestonnen durch Photosynthese produziert. Die photosynthetisch gewonnene Energie wird in Form der Kohlenhydrate chemisch gespeichert und steht den Organismen durch Glycolyse wieder zur Verfügung².

Die Bezeichnung „Kohlenhydrat“ stammt aus dem 18. Jahrhundert und lässt sich auf die allgemeine Summenformel $C_n(H_2O)_n$ der meisten Saccharide zurückführen. Man schloss daraus, dass es sich um Wasseraddukte / Hydrate der Kohle handele. Rasch zeigte sich jedoch, dass Kohlenhydrate Alkohol- und Carbonylfunktionalitäten enthalten. Daher werden heutzutage Monosaccharide als

Aldehyd- (vgl. **A1**, **A2**, **A3**) oder Keton-Derivate (vgl. **A4**) von Polyhydroxyalkoholen mit Kettenlängen von wenigstens drei Kohlenstoffatomen definiert, die in der Regel in Form der cyclischen Halbacetale vorliegen (siehe Abbildung 1.1). Ferner zählt man deren Derivate, die man durch Oxidation zu Zuckersäuren, durch Reduktion zu Polyalkoholen oder durch Derivatisierung der Hydroxygruppen erhalten kann, zu den Kohlenhydraten; so erhält man Aminozucker (vgl. **A5**), Desoxyzucker (vgl. **A6**), phosphorylierte oder sulfatierte Zucker. Verknüpft man zwei Monosaccharide unter Wasserabspaltung führt dies zu Disacchariden (vgl. **A7** oder **A8**); wird dies fortgesetzt erhält man Oligo- oder Polysaccharide³. Kohlenhydrate bilden neben den Lipiden, Peptiden und Nucleinsäuren eine weitere Klasse an bedeutenden Naturstoffen. Die Polysaccharide gehören neben den Proteinen und Nucleinsäuren zu den bedeutendsten natürlichen Makromolekülen^{2,4}.

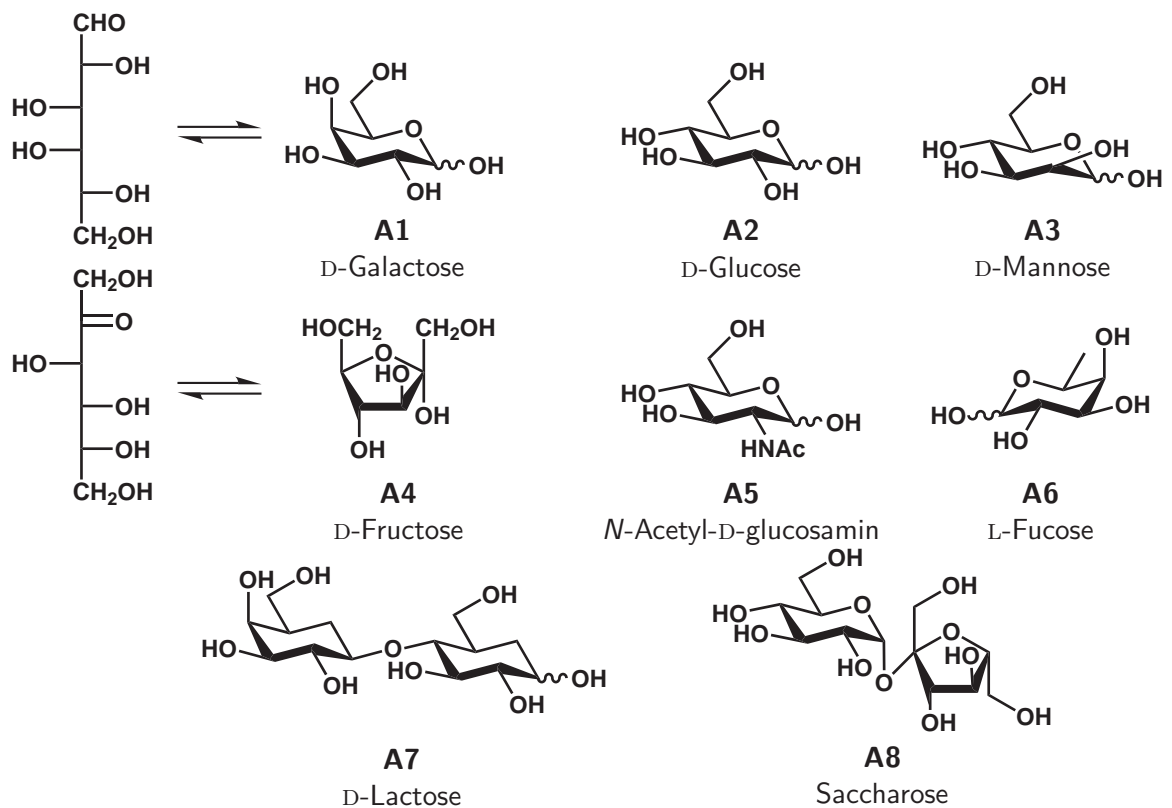


Abbildung 1.1: Einige einfache Kohlenhydrate.

1.1.1 Vorkommen von Saccharidstrukturen

Das Vorkommen und die Strukturen der großen Polysaccharide, wie zum Beispiel Chitin, Cellulose, Stärke oder Glykogen, sind seit langem bekannt. Diese aus mehreren hunderten oder tausenden einzelnen Saccharidbausteinen aufgebauten Polysaccharide haben ihre Bedeutung als Energiespeicher oder als Bestandteil von Zellgerüsten. Ihre Struktur ist bestimmt durch die repetitive, einheitliche Verknüpfung einzelner Monosaccharide oder kurzer Wiederholungssequenzen zu langen, teils verzweigten Ketten. Neben der Erforschung von Chemie und Struktur dieser Makromoleküle, lag lange Zeit ein Schwerpunkt der Kohlenhydratchemie in der Aufklärung der Stereochemie der Monosaccharide und ihrer einfachen Oligomere. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die systematischen Arbeiten von E. FISCHER, die Ende des neunzehnten Jahrhunderts die ersten Synthesen sowie die relativen Zuweisungen der Stereochemie von Zuckern ermöglichten⁵⁻⁹, sowie die im Jahre 1951 erfolgte Zuordnung der absoluten Konfiguration von Rubidiumtartrat durch J. M. BIJVOET¹⁰.

Der Erforschung der Strukturen komplexerer Oligosaccharide kam jedoch erst deutlich später Interesse zu. Zwar sind vereinzelte Berichte über das Auffinden komplexerer Zuckerstrukturen aus den Dreißiger Jahren des letzten Jahrhunderts vorhanden; so zum Beispiel von A. NEUBERGER, der eine Substanz beschreibt, die Asparaginsäure, D-Mannose und D-Glucosamin enthält¹¹. Dies ist eine der ersten Beschreibungen eines „Glykokonjugates“ in der Fachliteratur. Die Erkenntnis NEUBERGERS, dass Konjugate einer Oligosaccharidstruktur, einem Glycan, mit einem Aglycon in der Natur weit verbreitet vorkommen, setzte sich jedoch erst in der Mitte des letzten Jahrhunderts durch. Zuvor hielt man die bei der Isolierung von Proteinen anfallenden Zucker oftmals für Verunreinigungen. Heute weiss man, dass solche Glykokonjugate in allen Organismen vorkommen und dass sie eine Vielzahl an Aufgaben innerhalb der Zellen und Organismen innehaben².

Am weitesten verbreitet sind die Konjugationen von Zuckern mit Lipiden zu Glycolipiden und mit Proteinen zu Glycoproteinen. Glycoproteine sind Proteine, die kovalent gebundene Kohlenhydratstrukturen tragen. Man geht heute davon aus, dass mehr als die Hälfte aller Proteine glycosyliert sind^{2,12}. Die Glycanreste finden sich in allen biologischen Bereichen, in Proteinklassen unterschiedlichster Arten, bei Enzymen, Transporter- und Rezeptorproteinen, bei Hormonen und Strukturproteinen. Der Anteil des Glycans am Molekulargewicht kann von verschwindend gering (< 1 % im Collagen) bis zu deutlich überwiegend (> 90 % im Glykogen) reichen². Die Verknüpfung der Glycane mit dem Proteinstrang erfolgt in der Regel *N*-glycosidisch über die Aminofunktion der Seitenkette von Asparagin oder *O*-glycosidisch über die Hydroxyfunktionen in den Seitenketten von Threonin oder Serin¹³. Seltener sind C-glycosidische Verknüpfungen¹⁴.

Glycane als Informationsträger

In den Doppellipidschichten der Zellmembran findet sich eine Vielzahl an Glykokonjugaten, die ihre Glycanstrukturen in den interzellulären Raum hinein präsentieren; so zum Beispiel membranständige Glycoproteine, Glycolipide oder Glycosylphosphatidylinositole. Diese Kohlenhydratstrukturen auf der Zellmembran bilden die *Glycocalix*, eine Hülle aus Zuckermolekülen, die die Zelle umgibt (vgl. Abbildung 1.2)². Eine Besonderheit der Glycanstrukturen ist ihre hohe

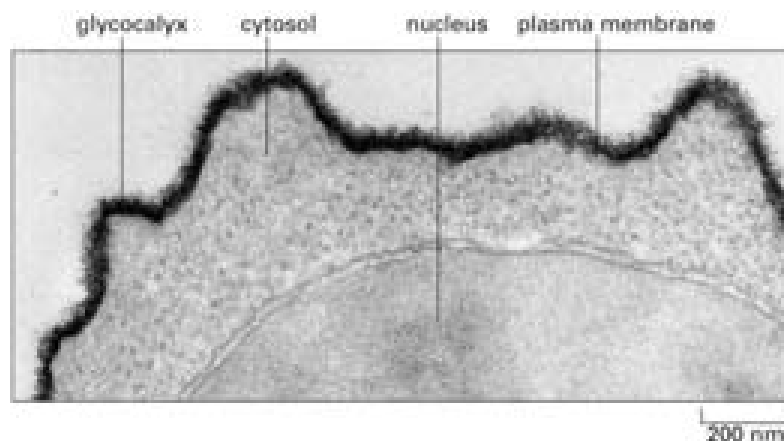


Abbildung 1.2: Schnitt durch eine Zelle, die Glycocalix ist am Zellrand zu erkennen¹⁵.

Tabelle 1.1: Anzahl der Konstitutionsisomeren bei Peptiden und Kohlenhydraten

Zahl der monomeren Einheiten	Konstitution	Oligopeptide	Oligosaccharide
2	AA / AB	1 / 2	11 / 20
3	AAA / ABC	1 / 6	120 / 720
4	AAAA / ABCD	1 / 24	1424 / 34 560
5	AAAAA / ABCDE	1 / 1290	17872 / 2 144 640

strukturelle Vielfalt, sowie die Komplexität der von ihnen ausgebildeten Strukturen. Vergleicht man die einzelnen Bausteine biologischer Makromoleküle, so fällt auf, dass Nucleinsäuren und Proteine aus bifunktionellen Monomereinheiten bestehen. Nucleotide tragen an ihrer 3'-Position eine Hydroxygruppe und an der 5'-Position einen Phosphorsäureester, während Aminosäuren eine Carboxylgruppe und α -ständig hierzu eine Aminogruppe tragen; dies führt zu linearen Oligomeren. Kohlenhydrate hingegen haben mehrere chemisch nahezu äquivalente Alkoholfunktionen, sowie eine Halbacetalfunktion; dies lässt eine Vielzahl unterschiedlicher Verknüpfungsmöglichkeiten bei der Kettenverlängerung zu, einschließlich der Möglichkeit, Verzweigungen zu bilden. Zusammen mit der hohen Zahl stereogener Zentren pro Monosaccharid führt dies zu einer rasch anwachsenden Zahl an Isomeren. Bereits beim Einsatz von fünf verschiedenen Monosacchariden sind über zwei Millionen Oligosaccharide möglich (vgl. Tabelle 1.1)¹⁶⁻¹⁸. Diese strukturelle Vielfalt wird in der Natur zur Ablage, bzw. Speicherung von Informationen genutzt und erklärt das ubiquitäre Erscheinen von Glycokonjugaten, sowie die vielen, von ihnen wahrgenommenen Aufgaben¹⁹.

Das von F. CRICK postulierte *Zentrale Dogma der Molekularbiologie*, dass die Weitergabe von Information ausgehend vom Erbgut zum Protein erfolgt und dass diese Weitergabe templatbasiert ist²⁰, gilt nicht für die Glycanstrukturen einer Zelle. Vielmehr wird das Glycom, die Gesamtheit der Glycanstrukturen einer Zelle, dynamisch durch Enzyme aufgebaut, die Kohlenhydratbindungen knüpfen (Glycosyltransferasen), wandeln (Glycosylisomerasen) oder spalten (Glycosidasen). Somit bestimmt sich die Struktur eines Glycoproteins durch die im

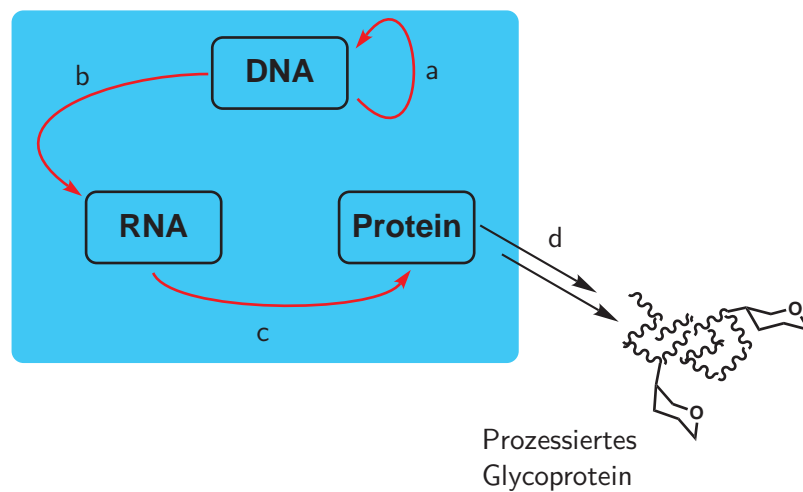


Abbildung 1.3: Schematischer Ablauf der Informationsweitergabe bei der Synthese eines Glycoproteins. Templatbasierte Schritte (grau hinterlegt) Replikation (a), Transcription (b) & Translation (c). Posttranslationale Modifikationen (d).

Erbgut fixierte Aminosäuresequenz des Peptidrückgrats (vgl. blau hinterlegter Teil der Abbildung 1.3), gefolgt von einer Vielzahl posttranslationaler Prozessierungen des Polypeptids zum fertigen Protein. Solche posttranslationalen Änderungen beinhalten proteolytische Spaltungen der Aminosäuresequenz, sowie kovalente Modifikationen (z. B. die Glycosylierung). Der nichttemplatgesteuerte Auf- und Umbau ermöglicht eine Variation der Glycanstruktur, je nach Alter oder Zustand der Zelle.

1.1.2 Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen

Kohlenhydrate in der molekularen Erkennung

Die in den Glycanen der Zelloberfläche gespeicherte und so der Umgebung präsentierte Information bestimmt eine Reihe physiologischer und pathologischer Prozesse. Diese, zur Wechselwirkung mit anderen Molekülen zur Verfügung stehenden Teile der Oberflächen einer Struktur, nennt man Epitope. Die Verwertung, d.h. die Entzifferung der Information erfolgt durch nichtkovalente Wech-

selwirkungen der Epitope der Glycanstrukturen mit anderen Strukturen im biologischen System; so zum Beispiel durch Wechselwirkungen mit kohlenhydratprozessierenden Enzymen, Antikörpern oder Lectinen. In Abbildung 1.4 ist eine Auswahl möglicher Wechselwirkungspartner für Glycokonjugate gezeigt.

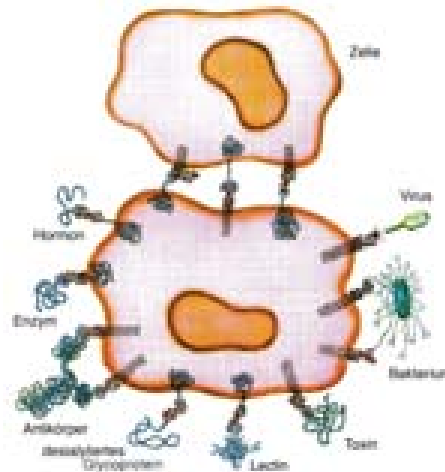


Abbildung 1.4: Mögliche Wechselwirkungspartner für Glycokonjugate²¹.

Zu den Prozessen, an denen solche Wechselwirkungen beteiligt sind, zählen unter anderem der intrazelluläre Transport und die Lokalisation von Glycoproteinen, sowie deren Abbau aus dem Blutkreislauf. Von speziellem Interesse für diese Arbeit sind die Wechselwirkungen der auf Zelloberflächen lokalisierten Glycane mit der extrazellulären Matrix. Hierzu gehören Zellerkennungsvorgänge im Verlauf der Entwicklung, bei der Rekrutierung von Leukozyten zu Entzündungsherden, das Erkennen von Wirtszellen bei viralen oder bakteriellen Infektionen oder bei der Bildung von Tumor-Metastasen^{22–26}.

Multivalente Wechselwirkungen

Die Wechselwirkungen von Kohlenhydratepitopen untereinander, aber auch mit anderen Molekülen, sind in aller Regel nicht-kovalenter Natur. Die Affinitäten solcher Wechselwirkung sind im Vergleich zur Stärke einer kovalenten Bindung

gering (so liegen die Gleichgewichtskonstanten der Bindung von einzelnen Kohlenhydratepitopen an Proteine (K_I) im milli- bis mikromolaren Bereich^{27,28}). Dennoch werden bei Experimenten zur Kohlenhydrat-Kohlenhydrat- oder Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung selektive, stark ausgeprägte Bindungen beobachtet¹⁸. Bei Bindungsuntersuchungen in biologischen Systemen treten in der Regel nicht vereinzelt Wechselwirkungen zwischen zwei einzelnen Molekülen auf, vielmehr weisen die beteiligten Einheiten (Zelle, Protein, Antikörper) mehrere gleichartige Liganden, bzw. Rezeptoren auf. Solche Teilchen, die mehrere gleichgeartete Bindungsstellen besitzen, nennt man multivalent^{29,30}. Bei der Interaktion multivalenter Teilchen werden die einzelnen schwachen, jedoch selektiven Wechselwirkungen verstärkt; man erhält starke Bindungen mit hoher Selektivität. Solche Wechselwirkungen sind in Abbildung 1.5 schematisch dargestellt.

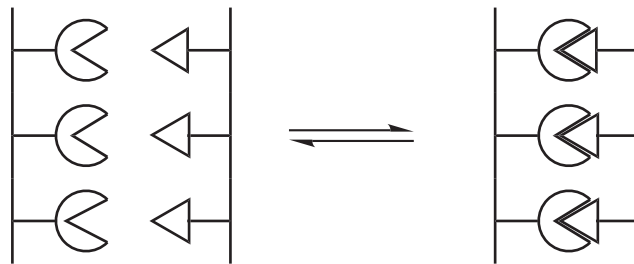


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Interaktion multivalenter Teilchen²⁹.

Weiterhin ist in multivalenten Komplexen zusätzlich zu den in Summe starken Wechselwirkungen der Ligand-Rezeptor-Paare eine Unterstützung der Komplexbildung durch Kooperativitätseffekte möglich. Dieses Phänomen tritt bei multivalenten Bindungen auf, wenn die Bindung eines ersten Liganden die Bindung weiterer Liganden begünstigt (positiver homotroper allosterischer Effekt). Zurückzuführen ist dies entweder auf Änderungen der Konformation des Rezeptors nach dem ersten Bindeereignis, oder auf die Anwesenheit eines weiteren Liganden eines polyvalenten Binders im richtigen Abstand zur nächsten Bindestelle. Ferner sind die folgenden Bindungsereignisse entropisch begünstigt, da

der wesentliche Entropieverlust (Zusammenlagern zweier Teilchen) bereits beim ersten Binden erfolgte.

Lectine

Ein Protein, das Kohlenhydrate bindet, wurden erstmals vor 140 Jahren im Giftserum der Klapperschlange entdeckt und *Agglutinin* genannt, da es rote Blutkörperchen zum Zusammenklumpen bringt³¹. Am Ende des neunzehnten Jahrhunderts isolierte man Proteine mit ähnlichen Eigenschaften aus Pflanzen³². Mittlerweile hat man in vielen anderen Organismen, von Viren und Bakterien bis zu Pflanzen und höheren Tieren, Proteine mit kohlenhydrat-bindenden Eigenschaften nachgewiesen. In der Literatur hat sich für Proteine dieser Art der Sammelname *Lectine* eingebürgert³³. Seit der Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts ist ein stetig steigendes Wachstum der Lectin-Forschung zu beobachten²⁴. Die aktuelle Definition von Lectinen lautet: „*Alle Proteine mit kohlenhydrat-bindenden Domänen, die keine Enzyme oder Immunoglobuline sind, werden als Lectine bezeichnet.*“¹⁹ Aufgrund dieser umfassenden Definition und ihrer weiten Verbreitung gehören zu den Lectinen viele verschiedene Proteine. Sie können je nach Bedarf unter verschiedenen Gesichtspunkten sortiert werden; zum Beispiel nach Herkunft, Sequenzhomologie, Molekulargewicht oder Art des gebundenen Kohlenhydrates. Bei Untersuchungen von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen hat sich eine Lectinklassifizierung nach gebundenem Kohlenhydratepitop durchgesetzt. Aufgrund dieser Spezifität werde Lectine nach dem Monosaccharid, das sie mit der höchsten Affinität binden, in fünf Klassen eingeteilt: D-Mannose, D-Galactose / N-Acetyl-D-galactosamin, N-Acetyl-D-glucosamin, L-Fucose und N-Acetylneuraminsäure. Dies sind zugleich die in Glycanstrukturen am häufigsten auftretenden Zucker. In dieser Arbeit kommen je ein Vertreter der ersten drei Klassen zum Einsatz:

- **Concanavalin A (ConA)**, ein mannosebindendes Lectin,
- **Erdnuss Agglutinin (PNA)**, ein galactosebindendes Lectin,