

2 Einleitung

Kohlenhydrate haben in der Zelle und im Organismus der Vertebraten unterschiedliche Aufgaben, sei es als Energiespeicher (Glykogen) oder als Grundbaustein der DNS (Desoxyribonukleinsäure). Sie sind außerdem bei Eukaryonten mit Lipiden und Proteinen verbunden, die in der Glykokalyx der Zelle angereichert sind, wo sie eine Rolle bei der Zellerkennung spielen (Abb.2.1). Sie können aber auch Strukturformer bei der Zellwand von Pflanzen (Cellulose) oder Bakterien (gram negative Bakterien besitzen Lipopolisaccharide auf ihrer Oberfläche) (Hagge et al. 2006) sein. Gram negative Bakterien haben ebenfalls eine dicke Zuckerschicht, die für sie Schutz und Anhaftungshilfe ist (Mayberry-Carson et al. 1984). Die Glykokalyx, ein Zuckergerüst an der Zelloberfläche, bestimmt die Zelloberflächenbeschaffenheit der Zelle, die sehr wichtig für die Erkennung lebenswichtiger Faktoren, wie Wachstumsfaktoren, andere Zellen, Proteine, Botenstoffe oder Pathogene ist. Sie besteht aus unterschiedlichen Zuckerstrukturen, die mit membranverankerten Proteinen oder Lipiden verlinkt sind (Paulson 1989). Neben den normalen Proteinrezeptoren können diese Strukturen auch rezeptorähnliche Funktionen übernehmen und auch selbst als Ligand agieren.

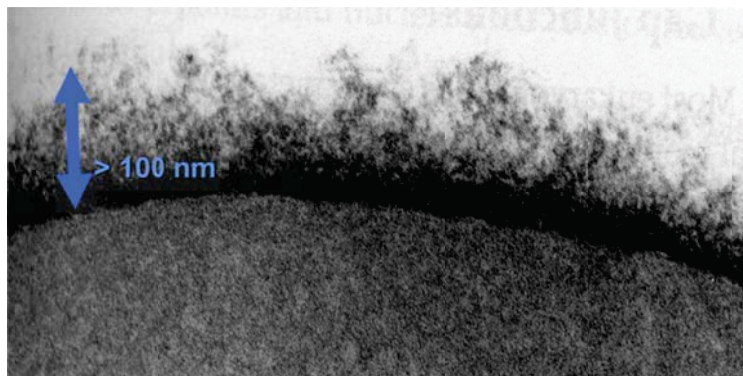


Abbildung 2.1 | TEM Bild der Glykokalyx

2.1 Die Glykokalyx der Zelloberfläche

Man unterscheidet bei den Glykanen zwischen zwei Arten: Den *N*-gebundenen Glykanen, die ein Glukosamin an einem Asparagin des Proteins assoziieren und die *O*-gebundenen, auch Mucin-artig genannt (Chen et al. 2008), die ein Galaktosamin an die OH-Gruppe von Serin oder Threonin anlagern (Voet and Voet 2004) (Abb.2.2). Die *O*-gebundenen Glykane kommen in dem Schleim unterschiedlicher Organismen vor, daher der Name (*mucus*: lat. Schleim).

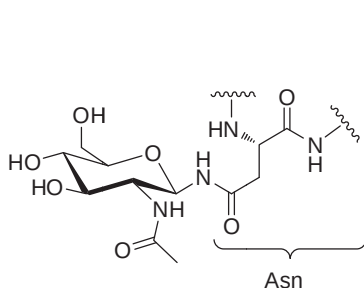
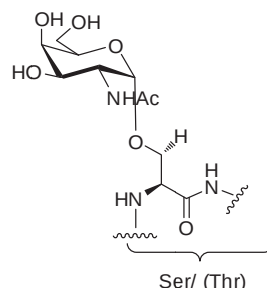


Abbildung 2.2| A, *N*-gebundenes Glykan



B, *O*-gebundenes Glykan (auch: Mucin-artig)



Es wird zwischen Proteoglykanen, mit den oben beschriebenen langkettigen, sulfatierten Polysacchariden und Glykoproteinen, mit verzweigtkettigen Zuckerstrukturen, unterschieden. Die Glykoproteine sind im Vergleich zu den Proteoglykanen verzweigtkettiger aufgebaut und haben weniger Sulfatreste. Die dritte große Gruppe bilden die Glykolipide, mit Lipidanker. Die Kontrolle über die Expression der Glykostrukturen erfolgt posttranskriptional durch die Expression von beispielsweise Glykosyltransferasen und posttranslational in ER und Golgi-Apparat (Ohtsubo and Marth 2006). Die Polypeptidkette wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat durch enzymatische Reaktionen posttranslational prozessiert.

2.1.1 Glykoproteine

Die Synthese der verzweigtkettigen Zucker startet im ER (Abb.2.3). Dafür ist das Molekül Dolichol entscheidend, welches mit seinen lipophilen Isopreneinheiten in der ER-Membran verankert ist und auf cytosolischer Seite zwei Phosphatreste bindet (Voet and Voet 2004; Sharon and Spiegel 1993). Es gibt für jede Zuckeraddition an die Kette eine eigene Glykosyl- oder eben Mannosyltransferase. Dabei wird zunächst außen an der ER-Membran Dolicholdiphosphat hydrolysiert und an das so entstandene Dolicholmonophosphat werden zwei *N*-Acetylglukosamineinheiten angehängt (aktiviert durch UDP), des weiteren fünf Mannose-Einheiten (aktiviert durch GDP). Dann folgt ein Schritt, dessen Mechanismus unbekannt ist: Die Translokation des Dolichol-PP-Oligosaccharids von der cytosolischen Seite in das Lumen (Jessell et al. 1990; Cummings 2009). Mit diesem Mechanismus werden auch neue, an Dolicholmonophosphat gebundene Zucker in das Lumen geschleust, wo sie dann an die bereits bestehende Zuckerkette addiert werden. Zunächst transferieren Mannosyltransferasen vier weitere Mannosereste, dann erfolgt die Anlagerung von drei Glucoseresten. Zuletzt wird die Kette an ein Protein gebunden, dass durch die Anlagerung eines Ribosoms in das ER-Lumen translatiert wurde. Die enzymatische Reaktion von Oligosaccharidtransferasen basiert auf einer Struktur im Zielprotein, bei der Asparagin durch seine Amidgruppe mit der Hydroxylgruppe eines Threonins eine Wasserstoffbrücke ausbildet (bei *N*-gebundenen Glykoproteinen). Die Amidgruppe nimmt als Nucleophil die Oligosaccharidkette auf. Das wird von einem basischen Rest der Oligosaccharidtransferase katalysiert. Diese Reaktion kann durch ein Epoxyethyl-Glycin in der Proteinkette unterbunden werden, das die Base des Enzyms kovalent bindet und damit das Enzym blockiert. Bevor das Glykoprotein an den Golgi Apparat weitergeleitet wird, muss seine Proteineinheit im ER richtig gefaltet werden. Das geschieht durch den Calnexin/Calregulin- Zyklus, der mit dem Abbau von zwei Glucoseresten durch α -Glukosidase I und II beginnt. Das membrangebundene Calnexin (CNX) und das im Lumen befindliche Calregulin (CRT), beide Lektine, sind in der Lage das ungefaltete Glykoprotein so zu binden, dass die Proteinfaltung erlaubt ist und es nicht zum verfrühten Transport zu dem Golgi Apparat oder zur Degradation kommt. Löst sich das Protein zu früh, so sind beide Lektine in der Lage, es nochmals zu glykosilieren und wieder zu binden. Ebenso ist an CNX und CRT die Thioloxydoreduktase ERp57 assoziiert, die den korrekten Einbau von Disulfidbrücken katalysiert.

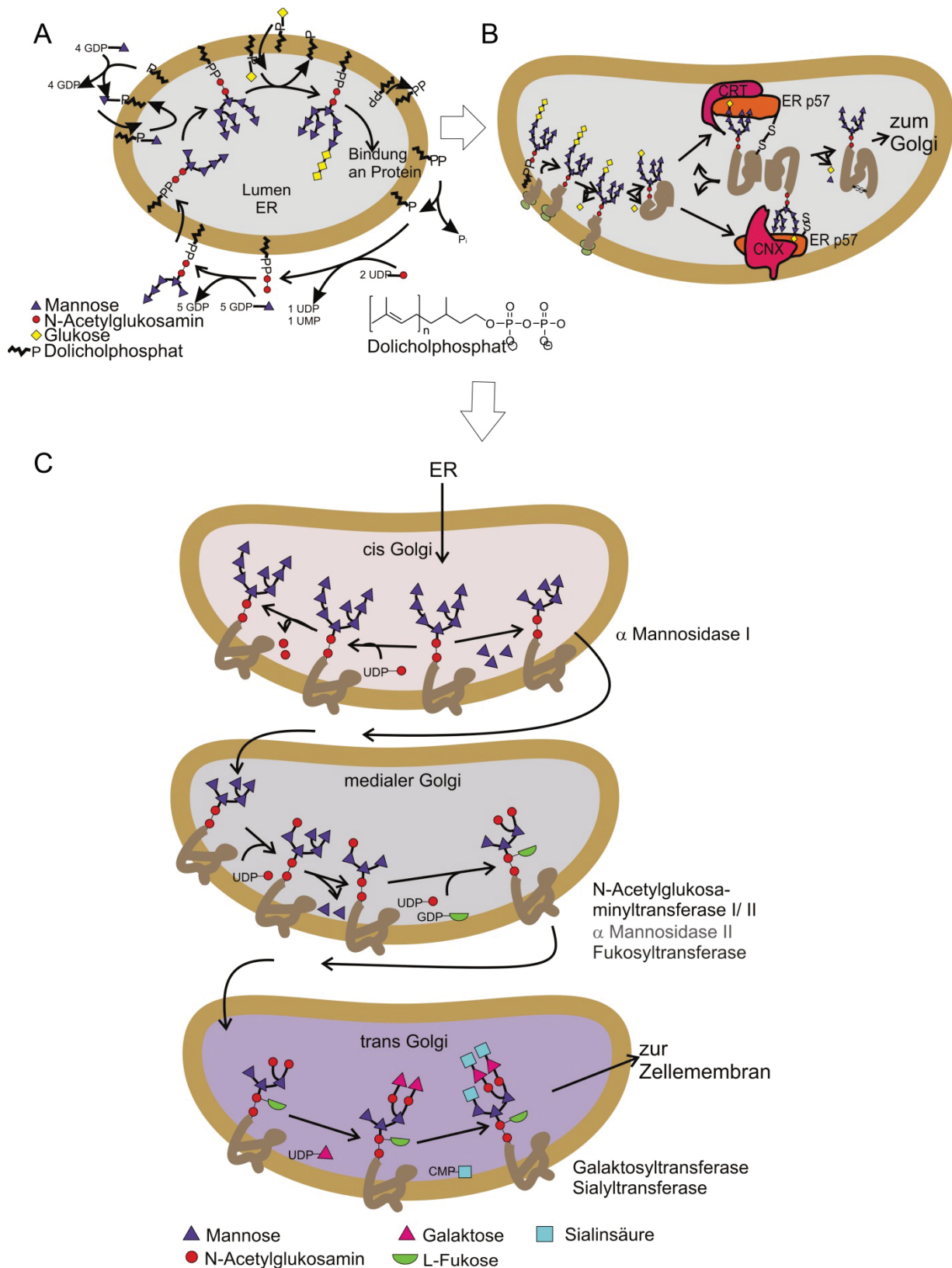


Abbildung 2.3 | Glykoproteinsynthese (nach (Voet and Voet 2004)) A, Der Aufbau von Glykoproteinen im ER erfolgt zunächst über die Bindung von Dolicholipophosphat B, Vor dem Transport zu dem Golgi-Apparat durchlaufen die Glykoproteine den sogenannten Calnexin/Calregulin-Zyklus: Bevor das Protein das ER verlässt, kann es durch Calnexin und Calregulin gebunden werden. Diese beiden Lektine binden ERp57, eine Thioloxidoreduktase, die die Disulfidbrückenbindung erleichtert. C, Glykoproteinaufbau im Golgi Apparat.



Sobald das Protein richtig gefaltet ist und eine α -1,2-Mannosidase einen Mannoserest entfernt hat, erfolgt der vesikuläre Transport zu dem Golgi-Apparat. Dieser gliedert sich in *cis*- medialer- und *trans*-Golgi. In dem *cis*-Golgi Bereich ist die α -Mannosidase aktiv, welche zunächst einen Mannoserest abbaut. Der Transport zum medialen und *trans*- Golgi erfolgt vesikulär. Im medialen Golgi kann *N*-Acetylglukosamin (*N*-acetylglukosamintransferase I und II) oder Fukose (Fukosyltransferase) addiert werden. Im *trans*-Golgi erfolgt die Anlagerung von Fukose, Galaktose (Galaktosyltransferase) und Sialinsäure (Sialyltransferase) (Iozzo 1998; Jessell et al. 1990). Glykoproteine, die in Lysosomen abgebaut werden sollen, erhalten bereits im *cis*- Golgi *N*-Acetylglukosaminphosphatreste (*N*-Acetylglukosaminphosphotransferase) und schließlich Phosphatreste (α -*N*-Acetylglukosaminidase). Mittels Exozytose gelangen die fertig prozessierten Glykoproteine dann an die Zelloberfläche (Abb.2.3,C). Durch die unterschiedlichen Prozessierungsmöglichkeiten im medialen- und *trans*-Golgi, erreichen die Glykoproteine eine sehr hohe Diversität.

Deren Oligosaccharide werden in drei Gruppen unterteilt:

- 1.Oligosaccharide mit viel Mannose, sie besitzen zwei bis neun Mannosereste
- 2.Komplexe Oligosaccharide, mit viel Galaktosamin, Sialinsäure und Fukose
- 3.Hybrid-Oligosaccharide, die viel Mannose und auch Fukose, Sialinsäure (Abb.2.4) und Galaktosamin besitzen

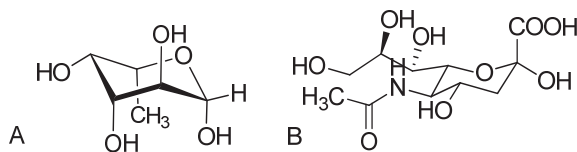


Abbildung 2.4 | A, Fukose B, Sialinsäure (auch: Neuraminsäure genannt)

Glykoproteine spielen in der Entwicklung des Nervensystems eine wichtige Rolle, da sie Erkennungsmoleküle für die Zell-Zell Interaktion binden. Ein prominentes Beispiel ist NCAM (Neural-cell-adhesion-molecule) und dessen Adhäsion zu Sialinsäure (Drake et al. 2008). Migration, Cytokin-Antwort und Differenzierung sind davon abhängig.

2.1.2 Proteoglykane

Proteoglykane (PGs) bestehen aus einem die Zellmembran durchspannenden Proteinrückgrat und den sogenannten anionischen Glykosaminoglykanen. Diese sind eine Form der komplexen Kohlenhydrate, die ihrerseits meist aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten bestehen, an die eine Aminogruppe gebunden ist (Weis 1997). Mindestens ein Kohlenhydrat besitzt eine negativ geladene Carboxyl- oder Sulfat-Gruppe. Zusammen mit einem Zellmembran-durchspannenden Proteinrückgrad bilden die Glykosaminoglykane, die auch als Gleitmittel in Gelenken oder als Strukturbestandteil des Bindegewebes vorkommen, die Glykokalyx. Aufgrund der Carboxylat- und Sulfatgruppen sind sowohl die Glykosaminoglykane als auch die durch sie modifizierten Proteoglykane stark negativ geladen und können elektrostatische Wechselwirkungen mit positiv geladenen Interaktionspartnern eingehen (Hacker et al. 2005). Diese setzen sich aus bis zu 1000



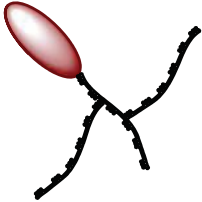
repetitiven Disaccharideinheiten zusammen, die im Allgemeinen aus einer Uronsäure (oxidiertes Monosaccharid) und einem sulfatierten Aminosucker (Glykosamin) zusammengesetzt sind. Anhand der Komposition ihres Disaccharids unterscheidet man zwischen Heparin und Heparansulfat- (HS), Chondroitinsulfat- (CS), Dermatansulfat- (DS), sowie Keratansulfat- (KS) Proteoglykanen (Gabius 2009; Voet and Voet 2004; Bernfield et al. 1999; Yanagishita and Hascall 1992) (Abb.2.6) Hyaluronsäuren bilden ein Grundgerüst für das Bindegewebe. Dabei ist nach heutigen Erkenntnissen nur eine lineare Sequenz von 5-6 Monosacchariden für die Erkennung von anderen Bindungspartnern notwendig. Die außerordentliche Spezifität von Zellerkennungsprozessen wird daher durch die große Heterogenität der Proteoglykan-Familie begründet. Zu einer ausgeprägten Heterogenität führt sowohl die Variabilität im Ausmaß der Sulfatierung als auch der Grad der Epimerisierung der (Mono)saccharide (Bishop et al. 2007). Befindet sich z.B. viel Iduronsäure in den Heparansulfaten, so bilden sich komplexe helikale Strukturen aus. Betrachtet man allein die Proteoglykane, so bekommt man eine Diversität von über 4000 Pentasacchariden als Erkennungssequenzen (Heparin/Heparansulfat = 2916, Chondroitinsulfat/Dermatansulfat = 999, Keratansulfat = 64, Hyaluronan = 2). Zusammen mit den ca. 3000 möglichen Erkennungssequenzen von zahlreichen *N*- und *O*-Glykanen und Glykolipiden kommt man auf eine Diversität von möglichen 7000 Erkennungssequenzen im humanen Glykom, wobei diese Anzahl wahrscheinlich noch deutlich nach oben korrigiert werden muss, da verzweigte Glykostrukturen in heutigen Schätzungen nicht berücksichtigt wurden. Die Bindungsaffinitäten von Mono- bis Trisacchariden, wie sie in kleinen Glykanen vorkommen, sind gering ($K_d = 10^{-3} - 10^{-6}$ m), wohingegen sie bei den Pentasaccharid-erkennungsmotiven deutlich höher sind ($K_d = 10^{-6} - 10^{-8}$ m) (Hacker et al. 2005). Ein Proteoglykan kann auch mehr als einen Typ von Glykosaminoglykan-Ketten tragen, die bei multivalenten Wechselwirkungen eine Rolle spielen. Dadurch kann es zu einer Bindungsaffinitätssteigerung um mehrere Größenordnungen durch Quervernetzungen auf der Zelloberfläche kommen, obwohl die eigentliche Bindungsaffinität der isolierten Bindungspartner *in vitro* niedrig ist.

Die Proteoglykane werden vier Gruppen zugeordnet (Sasisekharan and Myette 2003; Gabius 2009; Schaefer and Schaefer 2010) (Tab.2.1 und Abb 2.5).

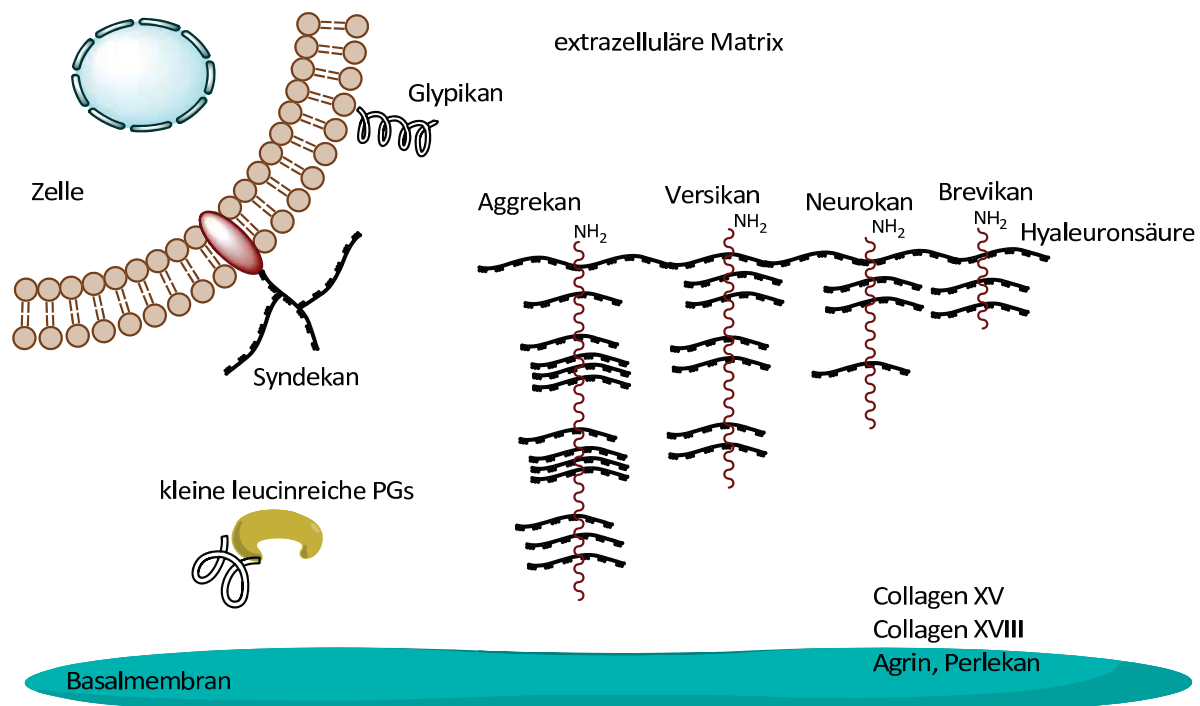
1. Syndekane: Das Proteinrückgrad kreuzt die Zellmembran, diese können als Korezeptoren, auch bei der Erkennung von Viren agieren, und haben durch ihre intrazelluläre Domäne Einfluss auf Signalwege innerhalb der Zelle oder sind mit dem Cytoskelett verbunden. (enthalten HS und CS)
2. Glypikane: Lipidanker; haben wie Syndekane extrazellulären und intrazellulären Bereich und können dort auch Funktionen übernehmen. (enthalten ebenfalls HS und CS). Bei Vertebraten sind derzeit sechs Gene für Glypikane bekannt (Fico 2007). Der Proteinanker besitzt eine cysteinreiche Domäne.
3. Membrangebundene PGs: Das Protein ist innerhalb der extrazellulären Matrix lokalisiert. Sie haben die Eigenschaft sich zu glykanfreien Komponenten der extrazellulären Matrix zu verknüpfen und so eine selektive Barriere für Makromoleküle bilden. (HS) Bilden die sogenannte Basallamina.
4. Extrazelluläre PGs: Diese PGs besitzen eine hohe Viskosität, Elastizität und können große Mengen an Wasser speichern. Des Weiteren sind sie an der Zelladhäsion, Proliferation beteiligt. Auch an der extra-zellulären



Matrix von Nervenzellen besitzen sie eine stabilisierende Funktion.
(enthalten meist CS, DS und HS, KS)

Bezeichnung	Masse des Proteins in kDa (kiloDalton)	Besonderheiten
Syndekane 	32-46 kDa	Sie können zusätzlich Proteasen und Proteasehemmer binden und haben so einen Einfluss auf die Blutgerinnung (Bindung von Antithrombin III). Vier unterschiedliche Syndekane können sich untereinander in ihrer Wirkung ergänzen und vertreten.
Glypikane	59-70 kDa	Das Grundprotein bindet an ein Glykosylphosphatidylinositol.
Extrazelluläre PGs Aggrecan (ZNS /Blutgefäße/ Knorpel) Brevikan (ZNS) Neurokan (ZNS) Versikan (ZNS / Blutgefäße / Haut / Knorpel)	210-250 kDa 145 kDa 136 kDa 260 kDa	Große Aggregate von CS binden Hyaluronsäuren und werden durch Lektine stabilisiert.
Biglykan (mit CS/ DS) Dekorin (mit CS/ DS) Asporin Lumikan (mit KS) Fibromodulin (mit KS) PRELP (mit KS) Keratokan (KS) Osteoadherin (KS) Epiphykan (CS/DS) Opticin Osteoglykan (KS)	38 kDa 36 kDa 42 kDa 38 kDa 42 kDa 44 kDa 38 kDa 42 kDa 36 kDa 35-45 kDa 35 kDa	Kleine Leucin-reiche PGs, Interagieren mit vielen Makromolekülen wie Collagen VI, XII und XIV. (ECM2 und ECMX gerade kürzlich entdeckt) Prolin und Arginin reich (PRELP)
<i>Chondroadherin (KS)</i> <i>Nyctalopin</i> <i>Tsukushi</i> <i>Podokan</i> <i>Podokan-like protein 1</i>	36 kDa 50 kDa 40 kDa 70 kDa 57 kDa	Keine klassischen Merkmale wie Proteinomologien und Cystein-reiche Regionen
Membrangebundene PGs (nicht hyaleuronsäureassoziiert) Perlekan (BM; Bindegew.) Agrin (BM; Muskeln, Nieren) Collagen XVIII (BM) Collagen IX (ZNS /Knorpel) Collagen XV (BM) Testikan (Gehirn/ Knorpel) Phosphakan (ZNS)	450 kDa 215 kDa 187 kDa 65,84,72 kDa 225-250 kDa 45 kDa 200-250 kDa	Perlekane haben drei HS- Ketten und können mit Wachstumsfaktoren interagieren; Ihre Menge ist bei Down-Syndrom Patienten reduziert und sie scheinen an der Bildung des Encephalons involviert zu sein. Agrin ist an der Bildung der neuromuskulären Verbindungen und an der Acetylcholinaggregation im synaptischen Spalt beteiligt, besitzt zwei HS- Ketten. Collagen XVIII besitzt Einfluss auf die Augenentwicklung im Alter und auf den Ionenaustausch durch die Membran (Gabius 2009).

(ZNS: Zentrales Nervensystem
BM: Basalmembran auch:
Basallamina)

Tabelle 2.1 | Gliederung der Proteoglykane, ihre Bezeichnungen, Lokalisation und Besonderheiten.**Abbildung 2.5 | Schematische Übersicht über die Klassen und die Lokalisation der Proteoglykane nach Schaefer (Schaefer and Schaefer 2010)**

Die Glykosylierung der Proteoglykangrundstruktur ist im Vergleich zu der Glykosylierung der Glykoproteine (oben beschrieben) nicht auf nur eine Grundstruktur aufgebaut. Die Synthese beginnt mit der Translation der Proteine und dem anschließenden Anlagern einer Urnsäure, bei Heparansulfat von Xylulose durch UDP-glukuronyltransferasen, UDP-galaktosyltransferasen und UDP-xylosyltransferasen. Die Kettenverlängerung erfolgt über Glykosyltransferasen (*N*-acetylglaktosamintransferase, *N*-acetylglukosamintransferase, Glukuronyltransferase oder β -galaktosyltransferase). Bei HS mit dem Anlagern von zwei Galaktoseresten, einer Glukuronsäure und einem Glukosaminrest. Substrate der Transferasen sind Monosaccharide, die mit UDP aktiviert sind und meist aus dem Pentosephosphatweg stammen, diese werden dann aus dem Cytoplasma in das ER importiert oder direkt an das Ende einer wachsenden Glykosaminoglykankette oder ein Polypeptid angeheftet. Iduronsäure entsteht durch Epimerisierung der Glukuronsäure entlang des wachsenden Stranges. Für die Phosphorylierung mit *N*-Sulfat der Ketten und die vorherige Entfernung eines Acetylrestes ist ein bestimmtes Enzym zuständig: eine Sulfotransferase. Der Sulfatrest entstammt einem 3' Phosphoadenosin-5'phosphosulfat, das durch die Zusammenlagerung von ATP und Sulfat gebildet wird (Lin 2004; Gabius 2009; Vreys and David 2007). Der Abbau der Proteoglykane wird meist von extrazellulären Metalloproteasen ausgelöst, die das Protein abschneiden. Es kann auch vorkommen, dass bei oxidativen, inflammatorischen Prozessen reaktive Sauerstoffspezies diese Arbeit übernehmen. Die Reste werden von den Zellen phagozytiert und in späten Endosomen, den Lysosomen durch Proteasen, Sulfatasen und Glykosidasen weiter verdaut und in die Einzelbestandteile zerlegt. Bis jetzt wurde bei dem Menschen eine Heparanase I entdeckt, die in der Lage ist durch Proton katalysierte Hydrolyse die Heperan/Heparinsäureketten zu schneiden (Vreys and David 2007). Eine Störung dieser Enzyme resultiert in einer Akkumulation von Oligosacchariden und kann zu ernsthaften Beschwerden, wie der Hurler- oder Hunter-Krankheit führen, die geistige Behinderungen und Sehschwäche zur Folge haben.

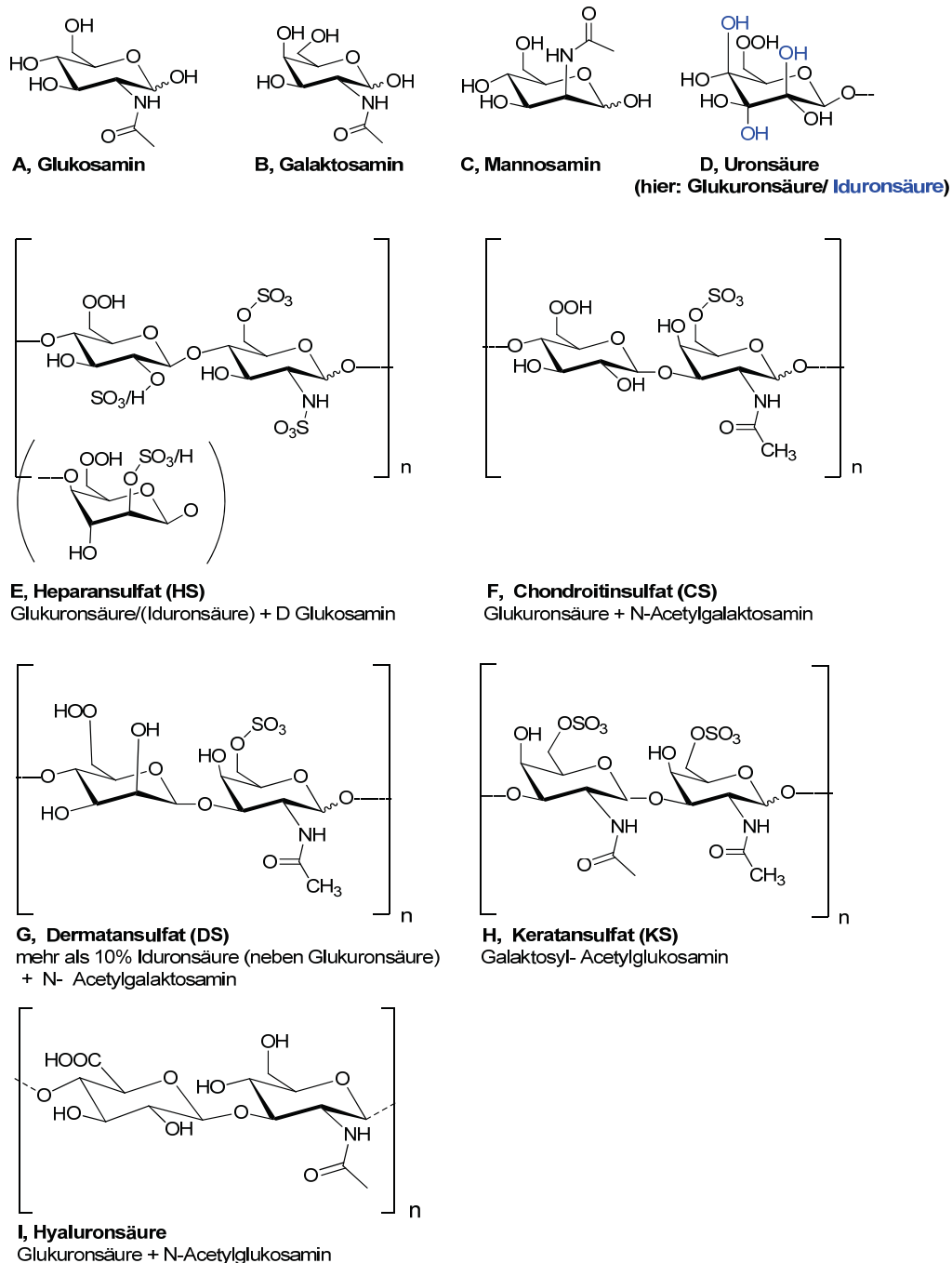


Abbildung 2.6 | Unterschiedliche Proteoglykanstrukturen

Es sind die Dissaccharideinheiten der unterschiedlichen bekannten Proteoglykanstrukturen dargestellt.

2.1.3 Glykolipide

Unter dem Oberbegriff Glykolipid bezeichnet man Glycerolipide und Glykosphingolipide. Erstere besitzen ein Glycerin und letztere meist ein Ceramid- Rückgrad, an dem Fettsäuren und Zucker angehängt werden können. Die Ganglioside sind Glykosphingolipide mit Sialinsäuren an Stelle der Glukose (Abb.2.7, C). Sulfatide sind Glykosphingolipide mit Sulfatresten an der Saccharideinheit. Diesen kurzen sialinhaltigen Glykostrukturen und den Gangliosiden werden Zellerkennungsprozesse zugeordnet. Dieser Oligosaccharidanteil wird auf der Außenseite der Zellmembran präsentiert, wo er für biologische Prozesse wie Zell-Adhäsion oder Zell-Zell-Interaktionen von Bedeutung ist.



Ganglioside finden sich vor allem in den Zellmembranen des zentralen Nervensystems. Sialinsäuren sind hier z.B. Bestandteil der sogenannten Sialyl-Lewis^x-Struktur, eines Tetrasaccharids, das nicht nur für die eigentliche Zellerkennung von z.B. Toxinen und Viren, sondern auch für verschiedene Signaltransduktionsprozesse von Bedeutung ist (Silva et al.).

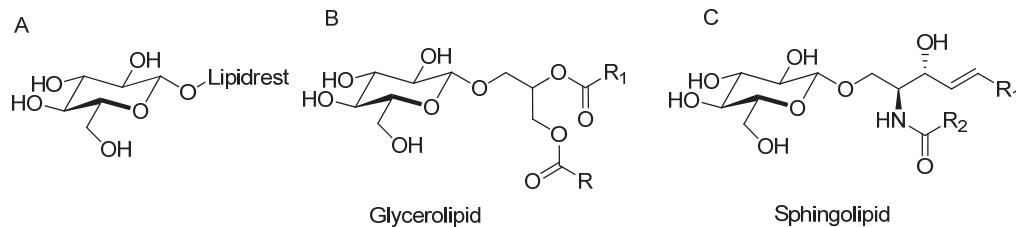


Abbildung 2.7 | A, Glykolipid B, Glycerolipid C, Glykosphingolipid

Die Synthese der Glycerolipide erfolgt an der Oberfläche des ER im Cytoplasma mit Hilfe der *N*-acetylglukosaminyltransferase, die an ein Phospholipid oder Phosphatidylinositol eine Zuckereinheit bindet. Es folgen (bei Phosphatidylinositol) weitere elf Schritte bei denen beispielsweise drei Mannosereste und auch Peptide angehängt werden können. Die Aufgaben der Glykolipide unterscheiden sich von denen der Proteoglykane dahingehend, dass diese Proteine wie Enzyme oder Rezeptoren fest in ihrer extrazellulären Membran binden können. Sie können auch Heparansulfate binden, oder wie die Glykosphingolipide als Anlaufstelle für Antigene dienen, haben also auch Einfluss auf das Immunsystem. Sie binden auch Zuckerstrukturen, die für die Ausbildung der Blutgruppen verantwortlich sind. Sie interagieren als Transporteinheit für Antigene bei T-Zellen, da sie im Vergleich zu normalen Phospholipiden eine größere Stabilität aufweisen und in der Zelle kompaktere Vesikel bilden können. Sie haben daher auch Einfluss auf das Nervensystem, bei dem sie oft der Bestandteil des vesikulären Transportsystems sind. Der Abbau erfolgt durch Sialidasen, Hexosaminidasen und letztlich durch Ceramidasen in den Lysosomen. Wie bei den Glykoproteinen und Proteoglykanen sind Krankheiten bekannt, die auf fehlerhaften Abbau der Glykolipide zurückzuführen sind, wie die Sandhoff-Krankheit, die zu geistigen und motorischen Zerfall führt (Hexosaminidasemutation) (Kolter and Sandhoff 2006).

2.2 Weitere Aufgaben der Glykokalyx

Es gibt einige Hinweise darauf, dass die Glykokalyx an vielen Zellerkennungsprozessen beteiligt ist. Hier sollen einige Beispiele gegeben werden. Die Proteine, die Glykanstrukturen binden können, nennt man im Allgemeinen Lektine. Eine Bindung an Lektine kann zu deren Aktivierung oder Inhibierung führen. Diese Zuckerstrukturen scheinen zelltypspezifisch zu sein und ändern sich oft aufgrund von Zelldifferenzierung oder pathogenen Prozessen, wie der Tumorbildung. Krebszellen besitzen beispielsweise mehr einfache Zucker auf ihrer Oberfläche als normale Körperzellen (Agard and Bertozzi 2009). Die Zuckerstrukturen können auch in die Signalkaskade von Oberflächenrezeptoren eingreifen. Ein Beispiel ist die Bindung und Erkennung des Wachstumsfaktors FGF (fibroblast growth factor) durch einige wenige definierte Saccharide (Hexasaccharid). Oder die Bindung von EGF (epidermal growth factor) und HGF (hepatocyte growth factor), die den Rezeptor stabilisiert (Forsten-Williams et al. 2008; Lin 2004). FGF2, ein Wachstumsfaktor der an der Angiogenese und Tumorstadium beteiligt ist, wird von einem Octasaccharid des Heparansulfats



gebunden und kann erst durch den Abbau von HS aktiviert werden (Vreys and David 2007; Sasisekharan and Myette 2003). Die Vielfalt in der Zusammensetzung der einzelnen Glykostrukturen ist der Grund für eine Vielzahl an Erkennungsmustern, die eine hohe Spezifität aufweisen. Es ist bekannt, dass die Strukturen der Blutgruppen A und B auf den roten Blutkörperchen, die für den Antigen-Kontakt wichtig sind, auf bestimmte verzweigte Glykanstrukturen zurückzuführen sind (Watkins 1999). Das Immunsystem profitiert auch von Glykan-Lektin Bindungen, so findet die Interaktion der Rezeptoren von T-Zellen mit den Rezeptoren der Antigen präsentierenden Zelle durch die Erkennung spezifischer Glykanstrukturen statt (van Kooyk and Rabanovich 2008). Die Selektine, die Leukozyten an der Blutgefäßwand binden und somit ihre Aktivierung einleiten, sind bestimmte Glykoproteine, die im Golgi-Apparat eigens dafür aufgebaut werden (Lowe 2003). Zuckerstrukturen sollen sogar Auswirkungen auf die Erkennung des Embryos in der Gebärmutter haben (Aplin 1991). Die individuelle Oberflächenbeschaffenheit von Zellen ist essentiell für die Erkennung vieler lebenswichtiger Faktoren. Zu diesen Faktoren gehören ganze Zellen, Proteine, Wachstumsfaktoren, und Botenstoffe sowie auch Pathogene und Wirkstoffe (Schaefer and Schaefer 2010). Die Erkennung solcher Faktoren ist hochspezifisch und individuell für jeden Zelltyp und basiert häufig auf Interaktionen mit entsprechenden Rezeptoren auf der extrazellulären Seite der Zellmembran. So binden die Proteoglykane Dekorin, Biglykan und Fibromodulin den TNF β (transforming growth factor β). Biglykan wird häufig von Makrophagen sekretiert und bindet an TLR2 (Toll-like receptor 2). Bei humanen embryonalen Stammzellen wurde eine unterschiedliche Glykandekoration der Asparagin-(N-) gebundenen Glykane während der Differenzierung festgestellt (Satomaa et al. 2009). Da Stammzellen in Kultur oft andere Zellen zum Überleben brauchen, ist die intrazelluläre Matrix, deren Hauptbestandteil Kohlenhydrate sind, essentiell für ihren Stoffwechsel verantwortlich. Wie vorher schon erwähnt bindet auch FGF an die Glykokalyx. Diese hat somit eine starke Wirkung auf die Differenzierung der Zellen (Du and Yarema 2010). Notch-Rezeptoren, die für die laterale Wachstumsinhibition für Zellorientierung im Gewebe zuständig sind, werden durch kleine fukosylierte Glykane ergänzt. Über diese findet die Bindung an Rezeptoren der Nachbarzellen statt, die dann dadurch in ihrer Differenzierung beeinflusst werden. Glykane sind essentiell für das Umfeld migrierender Zellen, da sie in der extrazellulären Matrix einen schleimigen, nicht festen Film bilden können. Das gilt auch für Mikroorganismen. So kann eine starke Vernetzung durch Heparansulfat die Migration stoppen, aber auch Wasser speichern und so Migration begünstigen (Morris 1993). Die Glykokalyx von Endothelzellen taucht immer wieder in der Literatur als natürliche Barriere für Proteine und Schutz vor microbiellen und Blutgefäß- Krankheiten auf (Becker et al. 2010; Noble et al. 2008). Auch als Anlaufstelle für viele Enzyme, die im Blut beispielsweise für die Adhäsion von Blutplättchen und anderen Leukozyten gebraucht werden (van den Berg et al. 2006). Weitere Moleküle mit denen sie interagiert ist Antithrombin III (Blutgerinnung), Heparin-Co Faktor II (Thrombinantagonist), FGF, VEGF der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (Wachstumsfaktoren für Angiogenese) oder LDL (Cholesterol- und Triglyceridtransport), TGF (transforming growth factor), Chemokine und Interleukine (Bishop et al. 2007). VLDL scheint von Zellen mit der Hilfe von Proteoglykanen als „Fänger“ in Fettzellen aufgenommen zu werden (Wilsie et al. 2005). Die Glykokalyx in Endothelzellen sorgt aber auch dafür, dass rote Blutkörperchen sich nicht an Gefäßwänden absetzen können (Reitsma et al. 2007). Auch für den Nährstofftransport zwischen Blutgefäßen und dem Gewebe ist sie zuständig (Dvorak 2010; Gautam et al. 2001). Ihre Dicke variiert von einigen Nanometern bis hin zu 3 μ m und wird durch pH-Wert, Ionenkonzentration in ihrem Umfeld oder ihrer Biosynthese bestimmt (Henrich et al. 2010). Bei Abbau dieser Strukturen kommt es zu vermindertem Nahrungstransport über das Blut, und Akkumulation von Blutplättchen, letztendlich zu einer Atherothrombose. Die Zusammenlagerung von Plaque bei Alzheimerpatienten



erfolgt auch durch Anlagerung der Proteine an Heparansulfatketten (Bishop et al. 2007). Es kann auch zu Entzündungen des Gewebes kommen. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Sepsis die Dicke der endothelialen Glykokalyx im Vergleich zu gesunden Patienten abnimmt und sich so auch leichter Ödeme bilden können (Henrich et al. 2010). Die Barrierefunktion kann von der dünneren Glykokalyx nicht mehr übernommen werden. Bei Diabetespatienten taucht ebenfalls eine verringerte Dicke der Glykokalyx in den Blutgefäßen auf. Auch in der Niere sind Zuckerstrukturen auf den Zellen eine natürliche Filtrationsbarriere. Die Glypikane der Proteoglykane scheinen einen Einfluss auf die Embryonalentwicklung bei Zebrafischen und *Xenopus* zu haben (Fico 2007). Sie sind an der Signaltransduktion durch Rezeptorinteraktion auf der Zelloberfläche beteiligt. Bei Mäusen mit Glypikan-Gen Defekt kommt es zu Zysten in der Niere und zu abnormaler Größe. In Fliegen und Mäusen wurden Defekte im Hedgehog- Signalweg, einem Signalweg, der wichtig für die Embryonalentwicklung ist, festgestellt (Beckett et al. 2008). Das scheint an der Interaktion eines Glypikans mit dem Hedgehog-Rezeptor zu liegen. Dieses bindet über Lipoproteinpartikel auch Hedgehog und ist somit eine Konkurrenz für den eigentlichen Rezeptor. Ein weiterer Signalweg, der für die Entwicklung, die Proliferation und die Differenzierung der Zelle wichtig ist, ist der Wnt-Signalweg. Glypikane, Syndekane und Perlekane sind in der Lage als Co-Aktivatoren des Wnt-Rezeptors zu fungieren (Kikuchi et al. 2009). Da Glypikane auch bei der Entwicklung von Nervenzellen in *Xenopus* beteiligt sind, liegt die Vermutung nahe, dass sie auch beim Menschen einen Einfluss auf die Entwicklung des Gehirnes haben. Die Proteoglykane haben einen Einfluss auf die Endozytose von kationischen Molekülen (Poon and Gariepy 2007). Glypikane und Syndekane scheinen dabei Clathrine zu unterstützen, der Mechanismus ist allerdings noch nicht bekannt. Agrin, ein Proteoglykan der Basallamina, hat Einfluss auf die Retinaentwicklung an Zebrafischembryonen (Liu et al. 2008). Ein negativer Aspekt liegt in dem Zusammenhang der Bindung von Glykanstrukturen zu Wachstumsfaktoren bei Krebszellen, sie begünstigen dadurch die Proliferation, können aber auch einen therapeutischen Ansatz haben. Die Glykostrukturen auf der Zelloberfläche, die für die Zellerkennung und die Immunantwort wichtig sind, können bei Krebszellen so mutiert sein, dass die Zelle für das Immunsystem sozusagen „unsichtbar“ wird (van Kooyk and Rabanovich 2008). Die Migration von Metastasen setzt voraus, dass die extrazelluläre Matrix abgebaut wird. Es wurde nachgewiesen, dass maligne Tumore in der Lage sind mehr Heparanase I zu exprimieren, um HS zu schneiden (Vreys and David 2007) und so die Metastasierung zu begünstigen. Angiogenese wird durch höhere Heparanase I-Spiegel in Endothelzellen ebenfalls unterstützt. Onkogene, die in der Zelle bei Krebs auf jeden Fall mutiert sind, wie Wachstumsrezeptoren, können durch O-GlcNAc stimuliert werden. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über den Einfluss von Proteoglykanen auf die Krebsentwicklung (Tab. 2.2). Im Einzelfall von Heparansulfat sind die unterschiedlichen Zuckerstrukturen genauer untersucht worden (Tab.2.3.). Auch die Hyaluronsäuren haben einen Einfluss auf die Krebsentwicklung. Es gibt Hinweise darauf, dass eine hyaleuronreiche Umgebung, Metastasierung bei Tumoren begünstigt (Shuster et al. 2002; Lokeshwar et al. 1997; Pham et al. 1997). Das Glykoprotein CD44, das ein Rezeptor für Zellwachstum und bei vielen Krebsarten mutiert ist, ist ein prominenter Rezeptor für Hyaleuronsäure. So konnte durch den Verdau von Hyaleuronsäure das Tumolvolumen bei Mäusen reduziert und die Expression von CD44 verändert werden. Erhöhte Level von Hyaleuronsäure im Urin gelten als Nachweis für beispielweise Leberkrebs.



Proteine	Ihre normale Funktion	Bindende Glykostruktur	Effekte bei Fehlregulation	Krebsarten
FGF,HGF und andere Onkogene	Proliferation Apoptose-inhibition	HS Hexasaccharid <i>N</i> -Glykane Glykosphingo-lipide <i>O</i> -GlcNAc <i>O</i> -Glykane	Tumorstadium, Metastasierung Signalkontrolle durch lipid rafts in Membran Onkogen-phosphorylierung Galaktosebindung und Apoptoseinhibition	Lunge, Leber, Niere, Brust, Gehirn, Prostata Pankreas Pankreas, Darm
Wnt, hedgehog	Differenzierung	HS	Tumorstadium, keine Differenzierung	Darm, Brust, Gehirn, Bindegewebe
E-Cadherin Zell-Zell-Kontakte	Anheftung Zellverband	<i>N</i> -Glykane <i>O</i> -Glykane Glykosphingo-lipide CS	Metastasierung und Tumorstadium Inhibition der Zell-Zell-Kontakte Tumorstadium Tumorstadium	Brust, Darm Brust, Magen, Eierstöcke Haut, Nerven, Brust Haut, Lunge
Interleukin-8, Interferon-γ	Immunantwort	HS Glykosphingo-lipide	Inhibition der körpereigenen Immunantwort	Brust, Eierstöcke, Prostata, Lunge
Endostatin, VEGF, Thrombospondin	Angiogenese	HS <i>N</i> -Glykane	Tumorstadium	Eierstock, Blase, Prostata
P-Selektin, Paminin, Fibronectin	Zelladhäsion	HS	Tumorstadium, Metastasierung, keine Differenzierung	Brust, Eierstock, Prostata, Magen
Collagen, Elastase	Extracelluläre Matrix	HS	Tumorstadium, Metastasierung	Brust, Lunge, Prostata, Magen, Darm
Heparanase	Heparansulfat-abbau	HS	Tumorstadium, Metastasierung	Haut, Pankreas
Glykosyltransferasen	Heparinbiosynthese	HS	Tumorstadium	Knochen, Leber
Hyaluronidase	Hyaluronabbau		Tumorstadium wurde reduziert	
Hyaluronsäure	Zellanheftung in extrazellulärer Matrix		Tumorstadium-Migration und Zell-Adäsion	

Tabelle 2.2 | Proteoglykane bei der Krebsentwicklung nach (Sasisekharan and Myette 2003; Fuster and Esko 2005)

Daraus resultierend wurden einige Medikamente entwickelt, die die Glykane von Krebszellen betreffen, deren Wirkung auf die Glykokalyx jedoch nicht im Hochdurchsatzverfahren getestet wurde. Einige unterbinden die Stabilisation der Rezeptoren durch HS oder die Anlagerung der Tumore durch Selektinbindung, wirken also auf Proteinaktivität und Glykanstruktur. Andere therapeutische Reagenzien bestehen aus Saccharidstrukturen (Shriver et al. 2004), die komplett neu synthetisiert werden, oder chemisch modifizierte Saccharidstrukturen sind. Viele polykationische Transportsysteme wie z.B. Liposomen, Polymere etc. sowie auch die zellpenetrierenden Peptide und

deren Mimetika assoziieren aufgrund ihrer positiven Ladung mit der Zellmembran über elektrostatische Wechselwirkungen (Wender et al. 2008). Seit Kurzem ist bekannt, dass sie weniger mit den Lipiden als mit den negativ geladenen Proteoglykanstrukturen der Zelloberfläche wechselwirken, da die meisten Zellen nicht geladene oder zwitterionische Lipide wie z.B. Sphingomyelin oder Phosphoethanolamin auf der Außenseite der Plasmamembran präsentieren, die eine neutrale Nettoladung der äußeren Membran ergeben, wohingegen sich auf der zytosolischen Seite eher negativ geladene Lipide wie z.B. Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylcholin (PC) und die Phosphatidylinositolphosphate (PIPs) befinden (Ding et al. 2001). Proteoglykane und besonders Heparansulfat dagegen besitzen negativ geladene Zuckerbausteine wie z.B. sulfatiertes *N*-Acetylgalaktosamin etc..

Ursache	Mechanismus	Krebsarten
Endosulfatase Herunterregulierung	Mehr HS Bindung an FGF2 HGF und EGF	Eierstöcke, Brust, Leber, Pankreas, Darm, Nieren
Stärkere Glypikan-1 Expression	HS Bindung von FGF2 an FGF und Bindung von HS bindendem EGF and EGF Sowie HFG- Rezeptorbindung	Pankreas Brust, Eierstöcke, Blase
Syndekan 1 Bindung an HGF	HGF Bindung und MET- Aktivierung (Wachstumsrezeptor)	Blut
Stärkere Perlekan Expression	VEGF Reservoir (nicht ganz klar)	Haut
Perlekan und Syndekanexpression durch PDGF (Thrombozyten-Wachstumsfaktor)	Wahrscheinlich erhöhte Produktion von Matrix Proteoglykanen	Bindegewebe

Tabelle 2.3 | Heparansulfat und Krebsentwicklung Ursachen und Auswirkungen nach (Fuster and Esko 2005)

In der Literatur gibt es viele Hinweise darauf, dass kationische und polykationische Transporter eine hohe Bindungsaffinität zu Glykosaminoglykanen besitzen (Ziegler and Seelig 2008), kationische Peptide, wie die zellpenetrierenden Peptide, DNA-Transfektionsreagenzien oder kationische Lipide. Dazu gehören auch kationische Peptidomimetika wie z.B. die zellpenetrierenden kationischen Peptide, die von uns an Zellen getestet werden sollen. Sie haben im Gegensatz zu den Peptiden ihre Seitenkette am Stickstoff und nicht am α -Kohlenstoffatom (Abb.2.8).

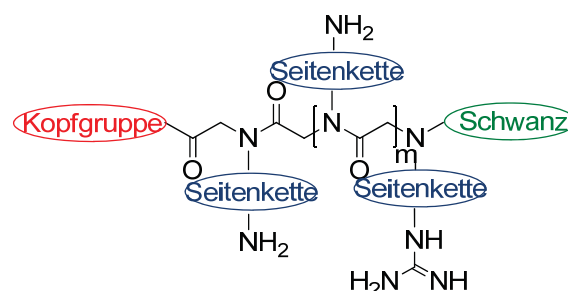


Abbildung 2.8 | Peptoidstruktur, Schema

Zur Visualisierung der Peptide als Wirkstofftransporter können diese gleichzeitig an Fluorophore gekuppelt werden, um die Interaktion mit der Glykokalyx zu visualisieren. Ihre zelluläre Aufnahme aufgrund der Interaktion mit Zuckerstrukturen ist jedoch noch nicht bekannt, da bis jetzt noch keine Strukturen detektiert worden sind, die mit diversen Wirkstofftransportern interagieren. Mit der synthetischen Glykobiologie, die Zuckerstrukturen mit der Hilfe von Enzymen nachbaut, können weitere Einblicke in den Metabolismus gewonnen werden (Czlapinski and Bertozzi 2006). Zu den kationischen Wirkstofftransportern, die nach ersten Studien mit der Glykokalyx interagieren, gehören auch polykationische Liposomen, wie sie zur Transfektion von Nukleinsäuren oder anderen Wirkstoffen verwendet werden (Resina et al. 2009). Viele dieser kationischen, liposomalen Systeme transfizieren nur bestimmte Zellkulturen, was darauf schließen lässt, dass die Glykostrukturzusammensetzung der Zellen eine wichtige Rolle spielt. Die Aufklärung der Interaktionen solcher polykationischer Liposomen oder anderen Strukturen mit der Glykokalyx wäre daher von großem Interesse für ein spezifisches Targeting verschiedener Zelllinien oder Gewebe.

2.3 Salvage Pathway

Die Verstoffwechselung der Zucker in Bestandteile der Glykokalyx verläuft über den sogenannten Salvage Pathway. Diese Glykosylierung verschiedener Proteine ist eine Form von posttranslationeller Modifikation. Dabei wird der Zucker phosphoryliert (Phosphorylasen) und an Uridindiphosphat (UDP) gebunden, je nach Zucker wird auch Cytidinmonophosphat (bei ManAz) angelagert. Der Zucker wird in einem weiteren Schritt durch Transferasen auf ein Protein oder andere zelluläre Bestandteile wie z.B. Lipide gebunden. Das geschieht am endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat. Glukose wird oft an ein Serin angehängt und ist daher *O*-verknüpft (Boyce et al. 2011). Eine UDP-galaktose-4-epimerase kann vor der Proteinbindung auch Galaktosamin in Glukosamin umwandeln und umgekehrt.

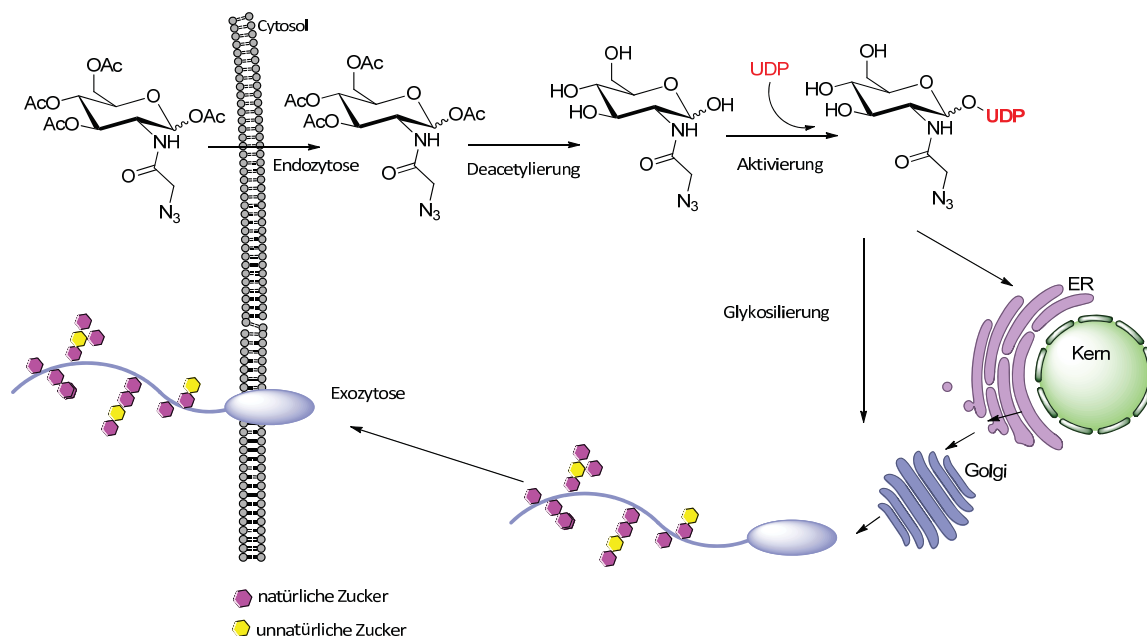


Abbildung 2.9| Aufnahme und Einbauweg von Zucker und Aufbau von Glykanen/Proteoglykanen: Salvage pathway. Der Zucker wird zunächst durch Endozytose aufgenommen, deacetyliert, je nach Zucker z.B. mit UDP aktiviert und dann glykosyliert. Durch Exozytose wird der Zucker wieder an die Zelloberfläche gebracht.



Nach Anlagerung weiterer Saccharidmonomere werden die modifizierten Proteine zur Plasmamembran transportiert, wo sie die Zuckerketten auf der extrazellulären Seite präsentieren. Da das Glykom nicht genetisch kodiert ist sondern Zuckerstrukturen in der Regel als posttranslationale Modifizierungen von Proteinen und „Lipiden“ generiert werden, ist es trotz vieler Einzelstudien bisher nicht gelungen, die Rolle des Glykoms bei Zellerkennungsprozessen umfassend zu klären. Die Manipulation der Proteine, die bei Glykosylierungsprozessen beteiligt sind, ist noch nicht umfassend durchgeführt worden, so dass Vorhersagen der Beteiligung verschiedener Zuckerstrukturen an Zellerkennungsprozessen nur bedingt möglich sind. Eine Topologisierung der Glykostrukturen der Zelloberfläche sowie eine umfassende Analyse der an ihrer Synthese beteiligten Proteine und Enzyme würde die Analyse der Zellerkennung deutlich stärken. Das ist nicht nur im Hinblick auf die Krebsforschung interessant, sondern auch im Hinblick auf unterschiedliche Krankheiten, die aus einem gestörten Glykan Auf- und Abbau resultieren. Es gibt Hinweise darauf, dass sich die Glykokalyx von Tumorzellen von der Glykokalyx gesunder Zellen unterscheidet. So wurden aus Tumorzellen isolierte Glykane mit Massenspektrometrie auf ihre Zusammensetzung untersucht (Nakano et al. 2006; Yamada et al. 2011; Nakano 2006). Es konnten gemeinsame Zuckerstrukturen auf verschiedenen Zelllinien festgestellt werden. Diese waren verzweigt-kettige Glykoproteine. Im Allgemeinen besitzt eine Tumorzelle jedoch mehr Monosaccharidstrukturen. Schon bei gesunden Zellen ist die hohe Variabilität der Glykane vorhanden und schwierig zu detektieren. Im Moment geht man von 3000 Glykanerkennungssequenzen und zusätzlich 4000 verschiedenen Pentasaccharidsequenzen aus (Cummings 2009).

2.4 Das Mapping der Proteoglykane (Methodik)

2.4.1 Click Chemie und Biologie

Zuckerstrukturen auf der Zelloberfläche sind eine Form von posttranslationaler Modifikation und können daher nicht durch eine genetische Analyse kartiert werden. Sie werden heute vornehmlich massenspektrometrisch untersucht. Diese Form der Analytik ist sehr genau, da eine genaue Kartierung mit allen zusätzlichen Modifikationen erfolgen kann, sie ist jedoch sehr aufwendig. Eine weitere Methode ist die bioorthogonale Markierung mit Hilfe von bioorthogonal-modifizierten Zuckervorläufern (Hang et al. 2003; Vocadlo et al. 2003; Dube et al. 2006; Laughlin et al. 2006; Prescher and Bertozzi 2006a; Baskin et al. 2007; Laughlin et al. 2008; Agard and Bertozzi 2009). Bioorthogonale Markierungen basieren auf der Verstoffwechselung von unnatürlichen Vorläufermolekülen, die die Eigenschaften der Zellen nicht verändern den Stoffwechsel und die Abläufe innerhalb und außerhalb der Zelle nicht stören. Bioorthogonale Modifizierung sind Molekülstrukturen, die in der Natur nicht oder nur selten vorkommen wie z. B. die Azide (Prescher and Bertozzi 2005; Schilling et al. 2011). Es konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden, dass eine Modifizierung von Zuckerstrukturen mit einer Azidfunktionalität biokompatibel ist und zur bioorthogonalen Markierung von Zuckerstrukturen gut geeignet ist (Prescher and Bertozzi 2005; Schilling et al. 2011). Nach Einbau der azid-modifizierten Monomere in die Glykokalyx können diese mit Hilfe einer 1,3-dipolaren Cycloaddition nach Huisgen (R.Huisgen 1963) oder der sogenannten Click-Reaktion mit einem modifizierten Alkin zu einem Triazol abreagieren (Huisgen 1963, 1976; Tornøe et al. 2002; Kolb et al. 2001; Rostovtsev et al. 2002; Himo et al. 2005; Hawker et al. 2007; Lutz 2007; Moorhouse and Moses 2008; Meldal and Tornøe 2008). Click-Reaktionen haben den Vorteil bioorthogonal zu sein. Diese Click-Reaktionen finden daher eine Vielzahl an Anwendungen in der