

## Abteilung Zelluläre Chemie

■ Direktorin: Prof. Rita Gerardy-Schahn

### Forschungsprofil

Die wissenschaftlichen Themen meiner Gruppe werden durch das Interesse an der Biosynthese und Funktion zellulärer Glycoconjugate gebündelt. Als Glycocalyx (über Proteine und Lipide gebunden) bilden die Zucker den äußeren Saum der tierischen Zelle. Angenäherte Rechnungen haben gezeigt, dass mehr als 70% aller Proteine glycosyliert sind und dass ein Großteil unserer genetischen Information (ca. 3% direkt und ca. 10% indirekt) an der Ausbildung und Regulation des Glycoms beteiligt ist. Diese Zahlen belegen für sich die Bedeutung der zellulären Glycosylierungswege und erfahren eindrucksvolle Bestätigung durch die Schwere der Krankheitsbilder im Komplex der Congenital Disorders of Glycosylation (CDG). CDGs sind sehr seltene, multisystemische Erkrankungen. In allen Fällen treten schwere neuronale Entwicklungsstörungen auf.

Zelluläre Glycotope können situationsabhängig verändert werden. So ist z.B. im Vertebraten die Ausbildung onotogenetischer Muster von der dynamischen Glycosylierung eines Oberflächenproteins abhängig. Entzündungszellen ändern auf Stimulation ihr Glycosylierungsmuster, was sekundär zu Veränderungen im Adhärenz- und Wanderungsverhalten führt (Extravasation aus den Gefäßen, Invasion ins Gewebe). Tumorzellen können durch die Reexpression embryonaler Zuckerstrukturen „Tarnkappen“ ausbilden, mit deren Hilfe sie das Immunsystem unterlaufen. Schließlich ist die Suszeptibilität eines Organismus für Pathogene im Wesentlichen über die anwesenden Zuckerdeterminanten bestimmt.

Wir konzentrieren uns auf die Darstellung zellulärer Glycosylierungswege in der Säugetierzelle, in eukaryontischen Pathogenen (*Aspergillus fumigatus*; *Leishmania major*) und in neuroinvasiven Bakterien. Ein wichtiges Anliegen dabei ist es, neue Zielstrukturen zu definieren, die in der pathophysiologischen Situation als therapeutische Angriffspunkte dienen können.

### Forschungsprojekte

#### Die Kristallstruktur der EndosialidaseNF: Das Ende eines Tarnspiels Teil II

■ Teilnehmer: Dr. Katharina Stummeyer, Dr. Martina Mühlenhoff, Prof. R. Gerardy-Schahn; Kooperationspartner: Dr. Achim Dickmanns und Prof. Dr. Ralf Ficner, Göttingen.

Im Forschungsbericht des Jahres 2002 hatte Frau Dr. Martina Mühlenhoff eine Molekülgruppe vorgestellt, die Endosialidasen, die als hoch spezifische Polysialinsäure-degradierende Enzyme von höchstem Interesse in der Infektions- und Tumorbilogie sind. Mit dem For-

schungsbericht des Jahres 2004 greifen wir diese Thematik erneut auf, da uns im Verständnis der molekularen Mechanismen dieser Enzymklasse ein großer Schritt, die Aufklärung der Kristallstruktur, gelungen ist. Nature Structural and Molecular Biology wird diese Arbeit, die als biochemische Doktorarbeit von Frau Katharina Stummeyer angefertigt wurde, im Januar des Jahres 2005 publizieren.

Zur Erinnerung: Als Polysialinsäure (polySia) bezeichnet man ein Homopolymer, welches aus dem für die tierische Zelle essentiellen Zucker Sialinsäure aufgebaut ist. Über  $\alpha$ 2,8-glycosidische Bindung werden die monomeren Sialinsäurebausteine miteinander verbunden. PolySia ist eine hoch spezifische posttranslationale Modifikation des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls NCAM. So spezifisch der Akzeptor für die polySia ist, so breit gefächert sind ihre Effekte. PolySia ist ein voluminöses, negativ geladenes Molekül. In Anwesenheit von polySia können sich keine stabilen Kontakte zwischen benachbarten Zellen ausbilden. Im Gegenteil, die polySia ist ein Marker für zelluläre Motilität. Die durch polySia geförderte Motilität ist während der Ontogenese vor allem im Verlauf der Neurogenese essentiell. Aber auch im adulten Gehirn brauchen wir polySia, um Plastizität zu erhalten. Zahlreiche Studien bestätigen die Bedeutung des Moleküls bei synaptischer Aktivität bis hin zu Lern- und Gedächtnisleistungen.

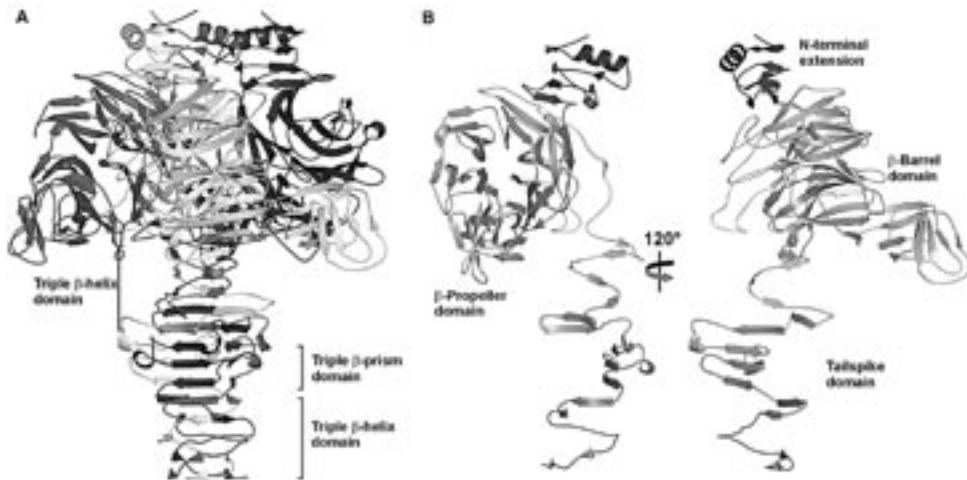
Die polySia hat daneben eine wichtige pathophysiologische Funktion. Sie ist ein Marker für verschiedene aggressive Tumoren neuroectodermalen Ursprungs und ist ein bedeutender Virulenzfaktor neuroinvasiver Bakterien, wie *Escherichia coli* K1 oder *Neisseria meningitidis* Serogruppe B, die Sepsis und Meningitis verursachen. Der Tumor nutzt die Fähigkeit der polySia, Zell-Zell-Kontakte abzuschwächen und so die Ablösung einzelner Zellen vom Primärtumor - der erste Schritt in der Metastasenbildung - zu erleichtern. Darüber hinaus erhöht die polySia die Halbwertszeit der Tumorzellen in der Zirkulation, da tumorspezifische Antigene durch die immunologisch inerte polySia abgeschirmt werden. Diesen Tarneffekt nutzen auch die mit polySia Kapseln ausgestatteten Pathogene und entgehen so dem Angriff des Immunsystems.

Aus Phagen, die polySia bekapselte Bakterien infizieren, konnten die bisher einzigen bekannten Enzyme gewonnen werden, die hoch spezifisch Polysialinsäure degradieren. Diese als Endosialidasen bezeichneten Enzyme hydrolysieren ausschließlich glycosidische Bindungen innerhalb des Polymers. D.h. Endosialidasen greifen die für die Lebensvorgänge unverzichtbaren monosialylierten Glycane nicht an. Endosialidasen sind als Schwanzfibr-Proteine an der Basisplatte der Bakteriophagen lokalisiert und stellen aufgrund ihrer strikten Substratspezifität für polySia ein breit eingesetztes Werkzeug in der Polysialinsäureforschung dar. Neueste Studien demonstrieren zudem das therapeutische und diagnostische Potential dieser Enzyme. So konnte durch Applikation von Endosialidase im Tiermodell (i) die Manifestation einer *E. coli* K1 Meningitis um 90% und (ii) das Metastasierungspotential einer Rhabdomyosarcomlinie auf etwa die Hälfte der Kontrollgruppe gesenkt werden.

In Zusammenarbeit mit Prof. Ralf Ficner, Universität Göttingen, ist es uns erstmals gelungen, die molekulare Struktur einer Endosialidase (endoNF) aufzuklären. Durch die Inkubation der Endosialidase mit löslicher polySia konnten Bindungsstellen für den Zucker im Enzym

sichtbar gemacht werden. Die erhaltene Struktur stellt ein unerwartet komplexes, chimäres Protein vor. Die Genese der EndosialidaseNF zeigt, wie bekannte und bewährte Module durch Neukombination die Grundlage für die Entwicklung einzigartiger Funktionen bilden.

Abb. 1 A zeigt das Homotrimer der EndosialidaseNF. Der an einen Pilz erinnernde Umriss des Moleküls impliziert eine Unterscheidung in Kopf- und Stielregion. Die Kopfregion enthält Strukturelemente wie sie charakteristisch für Exosialidasen („6-bladed  $\beta$ -propeller“) sind, während die Stielregion Elemente aufweist („triple  $\beta$ -helix“), die bisher lediglich für drei weitere Proteine, alle Schwanzfiber-Proteine von Bakteriophagen, beschrieben wurden. Dieser Bereich des Trimers ist durch eine Vielzahl intermolekularer Kontakte zwischen den



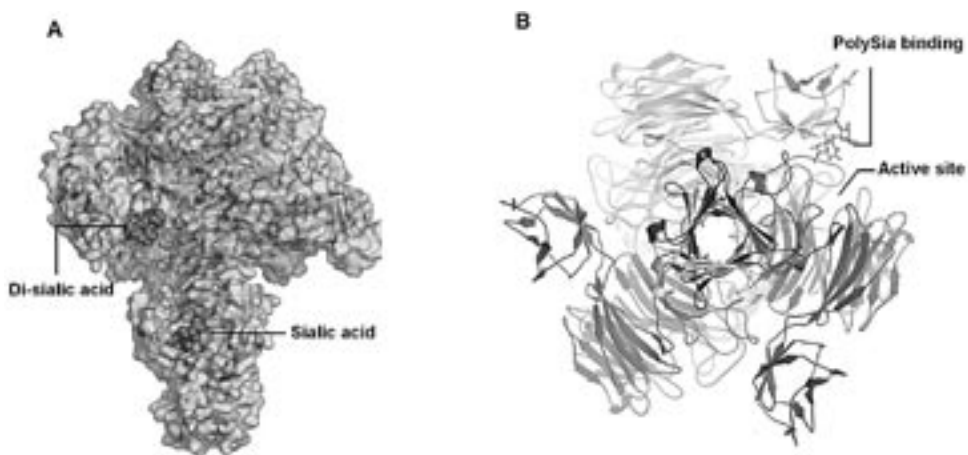
**Abb. 1:** (A) Homotrimer der Endosialidase NF (Aminosäuren 245-911). Jedes Monomer ist aus drei unterscheidbaren Domänen aufgebaut und kombiniert Strukturelemente charakteristisch für Exosialidasen ( $\beta$ -Propeller domain) und Schwanzfiber-Proteine bakteriophagen Ursprungs (Tailspike domain).

drei Untereinheiten charakterisiert, die zu einer außergewöhnlich hohe Stabilität des trimere-n Komplexes (SDS-resistent) führen. Neben seiner stabilisierenden Funktion konnte durch Cokristallisation mit oligomerer Sialinsäure auch eine Beteiligung des Stielbereiches an der Substratbindung gezeigt werden (s. Abbildung 2A).

Die Kopfregion des Homotrimers wird dominiert durch eine  $\beta$ -Propeller Struktur, die typisch für Exo- und Transialidasen ist. Alle bisher bekannten Sialidasen (bakteriellen, viralen und eukaryontischen Ursprungs) weisen dieses Strukturelement auf und beinhalten zudem sechs hoch konservierte Reste in ihrem aktiven Zentrum, die an Substratbindung und/oder Hydrolyse beteiligt sind. Interessanterweise sind zwei dieser Schlüsselreste in der Endosialidase nicht enthalten. Dies deutet klar auf einen abweichenden Reaktionsmechanismus hin, in dem möglicherweise Polysialinsäure in Form einer substratvermittelten Katalyse direkt an der eigenen Hydrolyse beteiligt ist.

Ein vom Sialidase-Propeller abzweigendes  $\beta$ -barrel konnte im Cokristall mit oligomerer Sialinsäure als Substratbindungsstelle identifiziert werden (Abbildung 2). Dabei zeigt die Anordnung von Bindungs- und Hydrolysedomänen deutlich, dass der trimere Komplex die katalytisch aktive Einheit der Endosialidase darstellt. An Bindung und Hydrolyse jedes polySia Moleküls sind mindestens zwei Untereinheiten des Trimers beteiligt. Insgesamt kann das Trimer gleichzeitig drei polySia Moleküle binden.

Im Blickpunkt zukünftiger Projekte wird die nähere Untersuchung des Reaktionsmechanismus der Endosialidasen stehen. Darüber hinaus ermöglicht die Kenntnis der Proteinstruktur die gezielte Beeinflussung der Katalyse- und Bindungseigenschaften des Enzyms.



**Abb. 2:** (A) Homotrimer der endoNF mit gebundenen Sialinsäuremolekülen. Im Cokristall mit oligomerer  $\alpha$ 2,8-verküpfter Sialinsäure konnte zwei Bindungsstellen identifiziert werden - polymeres Substrat (polySia) interagiert vermutlich mit beiden simultan. (B) EndoNF Trimer von der Unterseite betrachtet. Ein dimeres Sialinsäuremolekül gebunden an die  $\beta$ -barrel Domäne des in hellgrau dargestellten Monomers ist gezeigt. In gleicher Position gebundene polySia wird im katalytischen Trimer durch das aktive Zentrum der dunkelgrauen Untereinheit hydrolysiert.

Durch gezielte Mutationen konnten bereits Enzymvarianten hergestellt werden, die eine stark reduzierte oder gar keine katalytische Aktivität mehr besitzen. Interessanterweise sind diese inaktiven Proteine noch in der Lage die polySia mit unveränderter Affinität zu binden. Das weitere Studium dieser Enzyme wird und vermutlich näheren Einblick in den katalytischen Mechanismus der Endosialidasen geben. Wichtig in diesem Zusammenhang ist, dass wir mit den inaktiven Endosialidasen einzigartige, für polySia hoch spezifische Reagenzien generiert haben, für deren Verwendung sich in der Medizin viele Möglichkeiten eröffnen.

## Weitere Forschungsprojekte

**Polysialinsäure: Evaluation eines neuen Werkstoffs als Gerüstsubstanz für die Herstellung artifiziereller Gewebe. Teilprojekt zum Thema: „Purification and recombinant production of polysialic acid.**

■ Leitung: Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn; Förderung: DFG-Forschergruppe

**Polysialinsäure: Evaluation eines neuen Werkstoffs als Gerüstsubstanz für die Herstellung artifiziereller Gewebe. Teilprojekt zum Thema: Studies on the controlled degradation of polysialic acid scaffolds.**

■ Leitung: Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn; Förderung: DFG-Forschergruppe

**Polysialinsäure: Evaluation eines neuen Werkstoffs als Gerüstsubstanz für die Herstellung artifiziereller Gewebe. Teilprojekt zum Thema: Koordination der Forschergruppe und Strukturierung des Aus- und Weiterbildungsprogramms.**

■ Leitung: Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn; Förderung: DFG-Forschergruppe

**Studies on the significance of nuclear localisation of the murine CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase.**

■ Leitung: Dr. Anja-Katharina Münster-Kühnel; Förderung: DFG

**Charakterisierung der Glykosylierungseigenschaften der Polysialyltransferasen ST8SialI und ST8SialIV.**

■ Leitung: Dr. Martina Mühlenhoff; Förderung: DFG

**Funktionelle Charakterisierung der Polysialinsäure-modifizierenden O-Acetyltransferasen von Neisseria meningitidis und Escherichia coli K1.**

■ Leitung: Dr. Martina Mühlenhoff; Förderung: DFG

**Regulation des Wachstums- und Metastasierungspotentials von Neuroblastomen durch Expression und Modifikation des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM).**

■ Leitung: Dr. Martina Mühlenhoff; Förderung: Deutsche Krebshilfe

**Aspergillus fumigatus: Identifizierung von Enzymen im Biosyntheseweg der Galactofuranose“ Teilprojekt im Graduiertenkolleg „Mukosale Erreger- Wirt-Interaktionen, Sprecher Prof. Dr. P. Valentin-Weigand, Tierärztliche Hochschule Hannover.**

■ Leitung: Dr. Hans Bakker, Prof. Dr. Françoise Routier; Förderung: DFG

**Gerichtete Inaktivierung des bifunktionellen Zuckernucleotid Transportproteins für UDP-Xylose und UDP-N-Acetylglucosamin. Teilprojekt im Graduiertenkolleg**

**Charakterisierung pathophysiologischer Versuchstiermodelle“, Sprecher Prof. Dr. H-J. Hedrich, Medizinische Hochschule Hannover.**

■ Leitung: Dr. Birgit Weinhold, Dr. Hans Bakker; Förderung: DFG

**Aufbau säugetierähnlicher Glykosylierungswege in biotechnologisch relevanten Insektenzellen.**

■ Leitung: Dr. Valentina Ritz-Sedlacek; Förderung: HiLF

**Analysis of mice with a targeted mutation in the Pbx4 locus.**

■ Leitung: Dr. Heike Pöpperl; Förderung: HiLF

**Originalpublikationen**

Horstkorte R, **Mühlenhoff M**, Reutter W, Nöhring S, Zimmermann-Kordmann M, **Gerardy-Schahn R**. Selective inhibition of ST8SiaII by unnatural sialic acids. *Exp Cell Res.* 2004; 298:268-74.

**Übersichtsartikel (peer-reviewed):**

Kean EL, **Münster-Kühnel AK**, **Gerardy-Schahn R**. CMP-sialic acid synthetase of the nucleus 2004; *Biochem Biophys. Acta* 1673:56– 65.

**Münster-Kühnel AK**, **Tiralongo J**, Krapp S, **Weinhold B**, **Ritz-Sedlacek V**, Jacob U, **Gerardy-Schahn R**. Structure and function of vertebrate CMP-sialic acid synthetases. *Glycobiology* 2004; 14: 43R–51R.

**Abstracts**

2004 wurden 21 Abstracts publiziert.

**Habilitationen / Promotionen / Diplomarbeiten**

Katharina Stummeyer (Promotion Dr. rer. nat.) „Enzymes involved in biosynthesis

and degradation of poly- $\alpha$ 2,8-sialic acid: structure-function relationships”

Almut Günzel (Dipl. Biochem.) „Struktur-/ Funktionsbeziehungen in eu- und prokaryontischen Polysialyltransferasen“

Imke Oltmann (Dipl. Biochem.) „Vergleichende Charakterisierung von Polysialyltransferasen“

Melanie Oschlies (Dipl. Biochem.) „Einsatz des Hefe Doppel-Hybrid-Systems zur Identifikation von Interaktionspartnern der CMP-N-Acetylneuraminsäure Synthetase“

Philipp Schmalhorst (Dipl. Biochem.) „Deletion des UDP-Galactopyranose-Mutase Gens in *Aspergillus fumigatus*“

David Schwarzer (Dipl. Biochem.) „Charakterisierung Bakteriophagen-assoziiierter Endosialidasen“

Antia Stolz (Dipl. Biochem.) „Charakterisierung der DHHC-Protein abhängigen N-Acetylgalactosaminyltransferase aus *Drosophila melanogaster*“