

WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER



Arzneimittel und Kohlenhydrate: Glycobiologie

Institut für
Pharmazeutische Biologie und Phytochemie
der Universität Münster



Gängige Arzneimittel auf Kohlenhydratbasis: Aminoglycosid-Antibiotika

Struktur: Basische Oligosaccharide (Tri- und Tetrasaccharide) mit dem typischen Baustein
2-Desoxystreptamin

Streptomycingruppe:

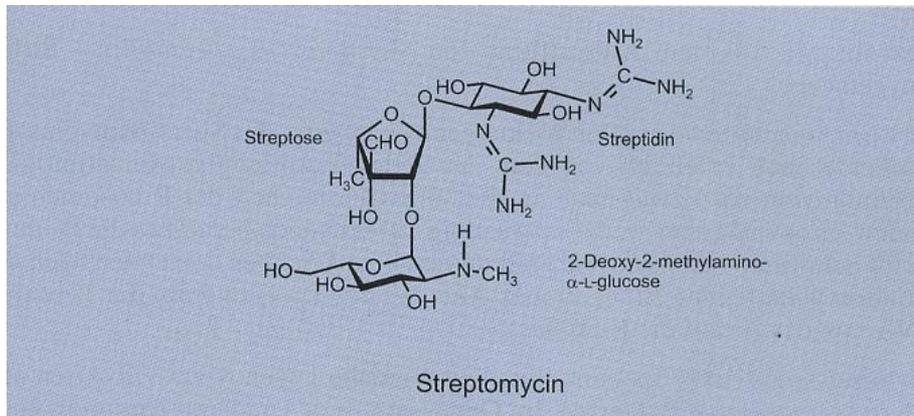
Streptomycin

Kanamycin-Gentamycin-Gruppe:

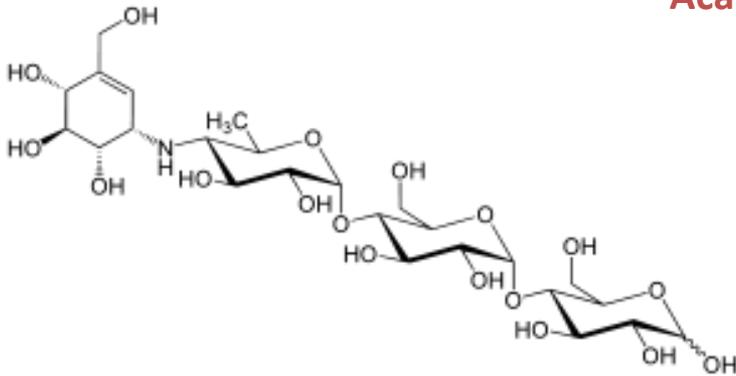
Kanamycin, Gentamycin, Amikacin, Sisomicin,
Tobramycin

Neomycingruppe:

Neomycin, Paromycin



Acarbose Glucobay®



Biotechnologische Gewinnung aus
Bakterien der Gattung *Actinoplanes*

Bausteine:

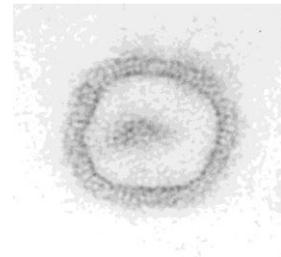
- Ungesättigtes Cyclitol verknüpft über eine N-Brücke mit:
- 4-Amino-4,6-dideoxyglucose
- Maltose (Glu- α -1,4-Glu)

Antidiabetikum (Zusatztherapie zur Diät) mit antihyperglycämischer Wirkung.

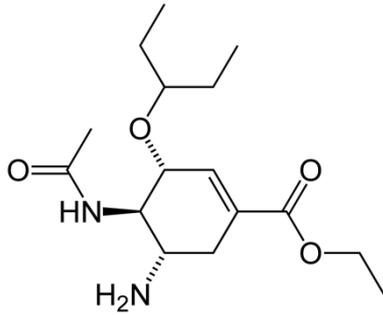
Durch **Hemmung der α -Glucosidasen** im Darm (Saccharase, Maltase, Dextrinase, Amylasen etc.) wird der Abbau von KH vermindert. Hohe Blutzuckerspiegel nach dem Essen (postprandial) werden vermieden. Die Insulinsekretion wird nicht verändert. Acarbose bewirkt selbst keine Hypoglycämie.

Resorption 1-2 %, Spaltprodukte werden teilweise resorbiert.

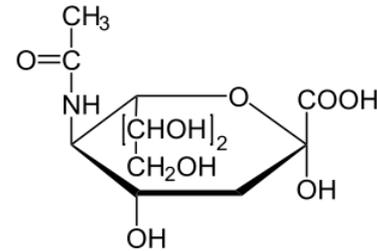
NW: GI-Störungen (Flatulenz)



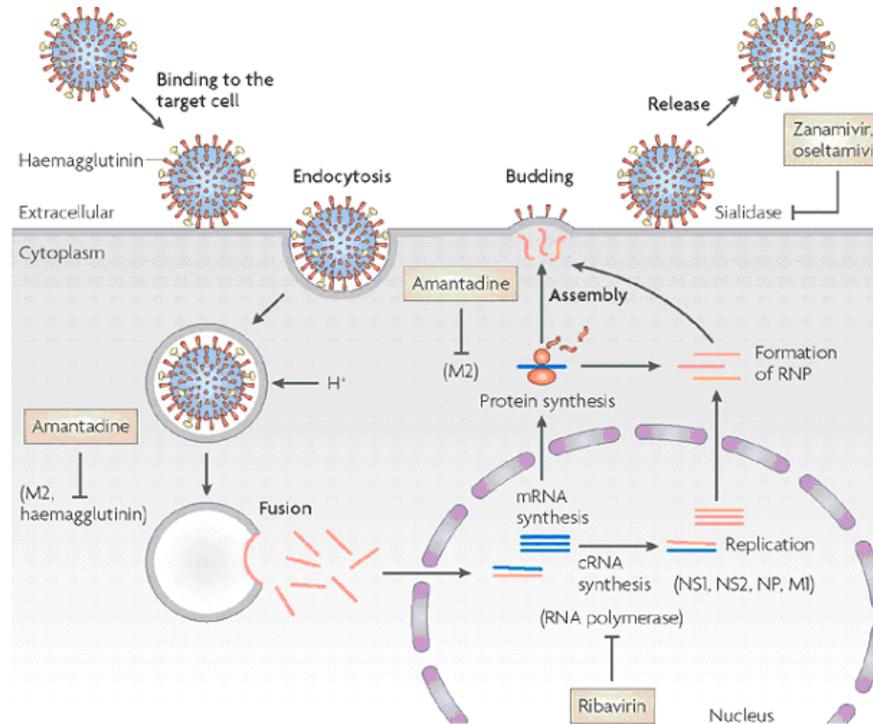
Neuraminidase-Inhibitoren: Oseltamivir, Zanamivir



Oseltamivir



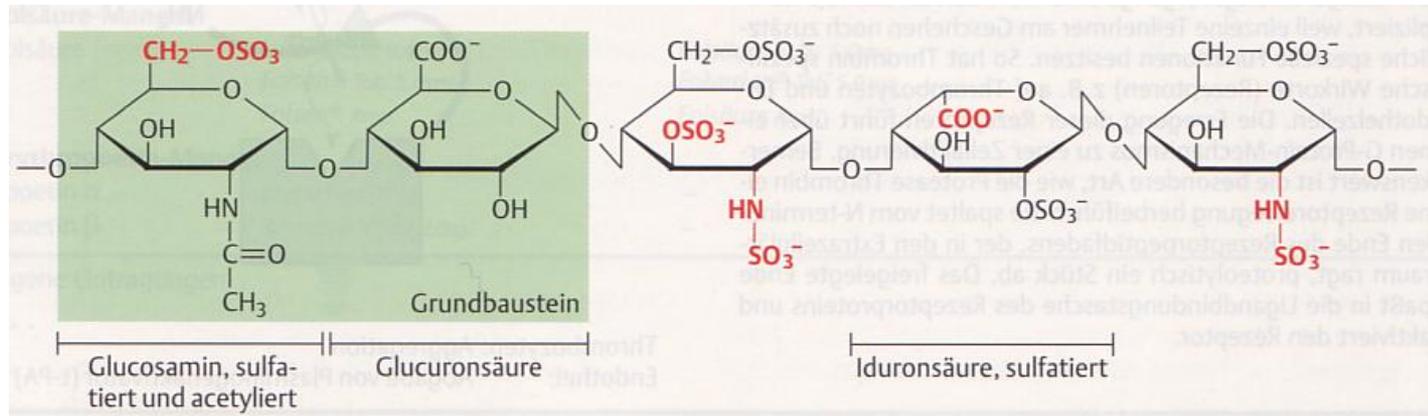
N-Acetyl-Neuraminsäure



Heparine

Biosynthetischer Aufbau

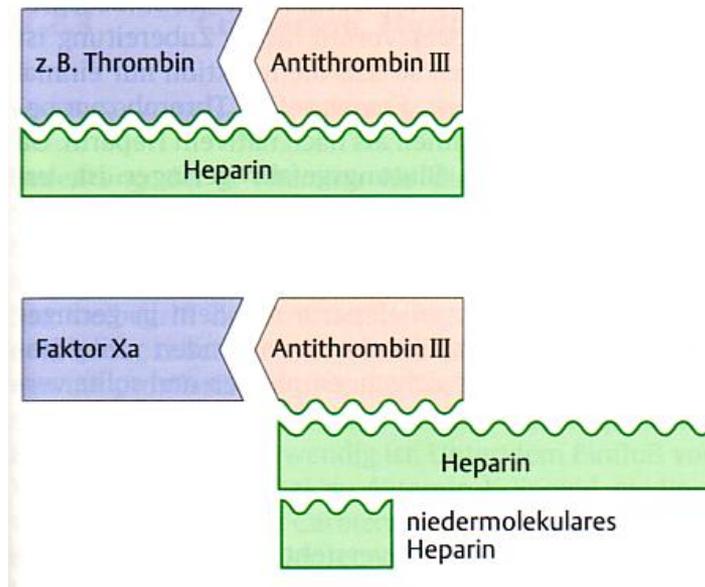
- ⇒ • Bildung eines Start- und Trägerproteins aus Ser, Gly
- ⇒ • Anheftung einer Tetrasaccharidsequenz als Spacer
- ⇒ • Aufbau der PS-Kette an den letzten Zucker des Spacer-Tetrasaccharids
- ⇒ • repetitierendes Disaccharid: β -D-Glucuronsäure-(1 \rightarrow 4) α -D-N-Acetylglucosamin ---



- ⇒ sekundäre Modifikation der PS-Kette: Deacetylierung, Sulfatierung, Epimerisierung
 - GlucAc \rightarrow α -L-Iduronsäure \rightarrow α -L-Iduronsäure-sulfat
 - GlucNAc \rightarrow Glu-Amin-Sulfat \rightarrow Glu-Amin-N,6-disulfat \rightarrow Trisulfat
- alle Ausgangszucker, alle Zwischenprodukte, alle Endzucker finden sich im Heparin wieder
 - ⇒ Abspaltung des 60-100kDa PS vom Trägerprotein
- ⇒ enzymatische Hydrolyse zu kleineren Bruchstücken (5-25 kDa)

Gewinnung aus Darmschleimhaut, Schlachtabfälle

Antithrombotikum: Verstärkung der hemmenden Wirkung des Thrombinsuppressors
Antithrombin III

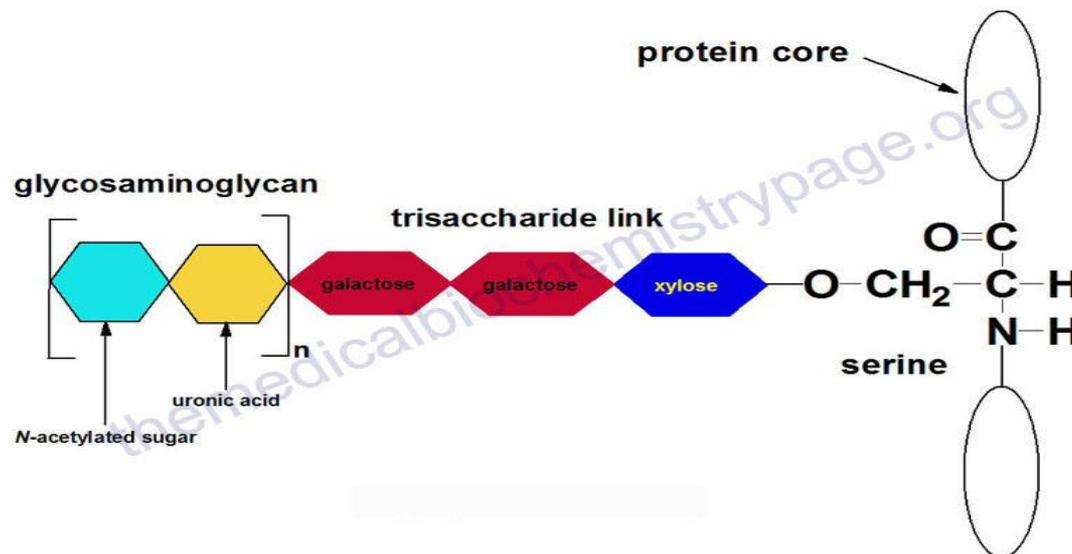


Gerinnungsfaktor-abhängige Förderung der Anti-thrombinwirkung durch Heparin. Während Heparin normalerweise mit beiden Bindungspartnern Kontakt aufnimmt (oben), fördert es die Inaktivierung von Faktor Xa durch Antithrombin III, indem es nur mit letzterem interagiert – dazu reichen auch Heparin-Fragmente: niedermolekulares Heparin

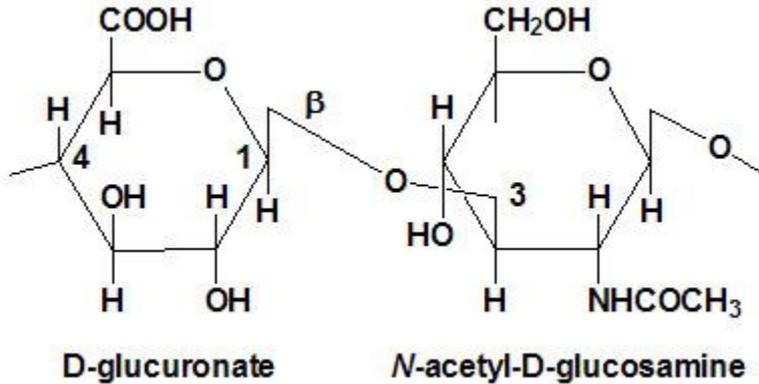
Glycosaminoglycans (GAGs)

- not in plants
- extracellular matrix: collagen and elastin fibres embedded in a gel-like matrix from glycosaminoglycans (mucopolysaccharides)
- unbranched, linear
- alternating uronic acids mixed with amino sugars, often decorated with SO_4
- Hyaluronic acid, chondroitin, dermatan, keratan, heparan, heparin etc.

Glycosaminoglycane (GAGs): meist gebunden an Trägerproteine (\Rightarrow Proteoglycan)

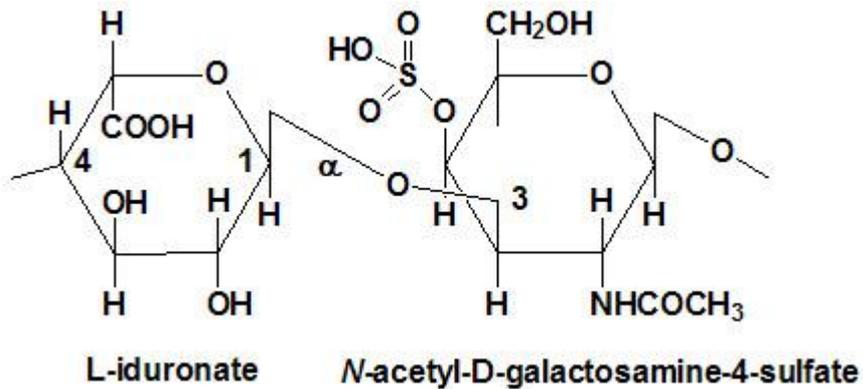


Animale und humane Proteoglycane (GAGs, Glucosaminglycane)



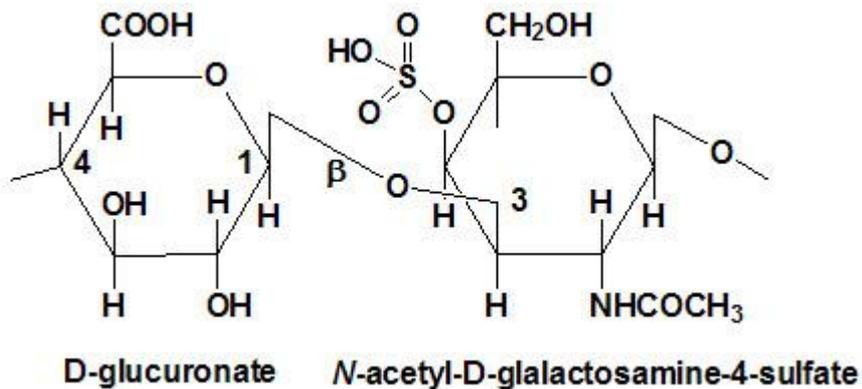
Hyaluronsäure:

D-Glucuronsäure + GlcNAc, $\beta(1, 3)$



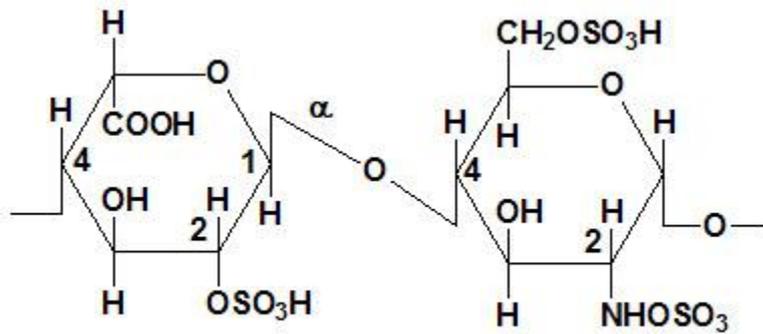
Dermatansulfate:

L-Iduronsäure, sulfatiert
+ GalNAc-4-sulfate, $\alpha(1, 3)$



Chondroitin 4- und 6-sulfate:

D-Glucuronsäure
und GalNAc-4- oder 6-sulfat, $\beta(1, 3)$



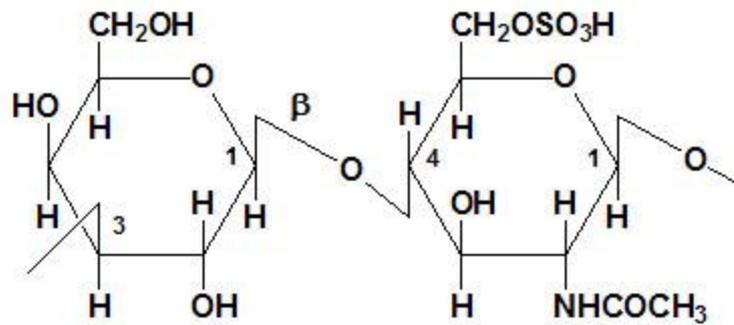
L-iduronate-2-sulfate

N-sulfo-D-glucosamine-6-sulfate

Heparin, Heparan sulfates:

Glucuronsäure, und Iduronsäure-sulfat
und N-sulfo-D-glucosamine-6-sulfate
 $\alpha(1, 4)$

(heparans < sulfate than heparins)



D-galactose

N-acetylD-glucosamine-6-sulfate

Keratan sulfates:

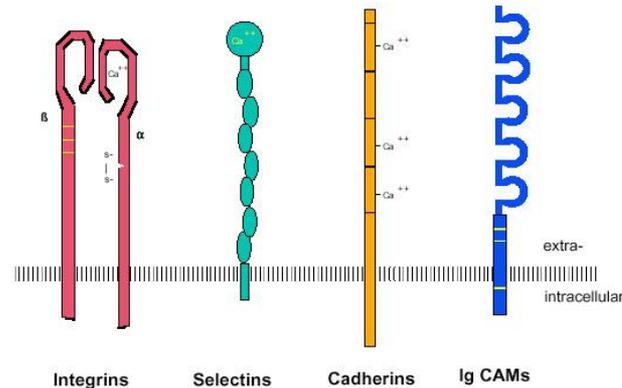
galactose + GlcNAc-6-sulfate
 $\beta(1, 4)$

	Localization	Comments
Hyaluronate	synovial fluid Extracellular matrix connective tissue	large polymers, shock absorbing
Chondroitin sulfate	cartilage, bone, heart valves	most abundant GAG
Heparan sulfate	basement membranes, components of cell surfaces	contains higher acetylated glucosamine than heparin
Heparin	component of intracellular granules of mast cells lining the arteries of the lungs, liver and skin	more sulfated than heparan sulfates
Dermatan sulfate	skin, blood vessels, heart valves	
Keratan sulfate	cornea, bone, cartilage aggregated with chondroitin sulfates	

Adhäsionsrezeptoren und Inflammation

Cell adhesion molecules (CAMs)

Transmembranäre
Glycoproteine
4 Familien



Selektine: Lektin-artige Rezeptoren, die heterotypische Zell-Zell-Adhäsion durch Bindung an sialylierte Glykane vermitteln. Sie werden auf Leukozyten, Plättchen und Endothelzellen exprimiert. Während entzündlicher Prozesse initiieren Selektine die Interaktion von Leukozyten mit Endothelzellen, das "Rollens", dem das Auswandern der Zellen aus dem Blut ins Gewebe folgt.

Cadherine: sind homotypische Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle von Epithelzellen. In der Zonula adherens bilden sie enge Zell-Zell-Verbindungen, welche als selektive Diffusionsbarrieren dienen. In diesen Kontaktstellen stehen sie mit dem Cytoskelett in Verbindung. Sie sind essentiell für die Entwicklung und den Erhalt von Gewebestrukturen, insbesondere von epithelialen Interaktionen, vermitteln aber auch Signale.

Integrine: Heterodimere; auf praktisch allen Zellen exprimiert. Zellwachstum, Differenzierung, Immunantworten, Wundheilung, Tumorentstehung.

Integrine binden andere membranständige Adhäsionsrezeptoren auf benachbarten Zellen, beispielsweise Proteine der Ig-Superfamilie, oder Proteine der extrazellulären Matrix. Integrine sind Heterodimere bestehend aus einer α- und einer β-Kette, die nicht-kovalent miteinander verknüpft sind.

Selektine: Lektine (kohlenhydratbindende Membranproteine, die weder Antikörper noch Enzyme sind)

Binden calciumabhängig an Kohlenhydratstrukturen, die an einem Proteingerüst oder Lipidträger fixiert sind.

Vorkommen: Leukozyten-vaskuläres System.

L-Selektin: auf Leukozyten

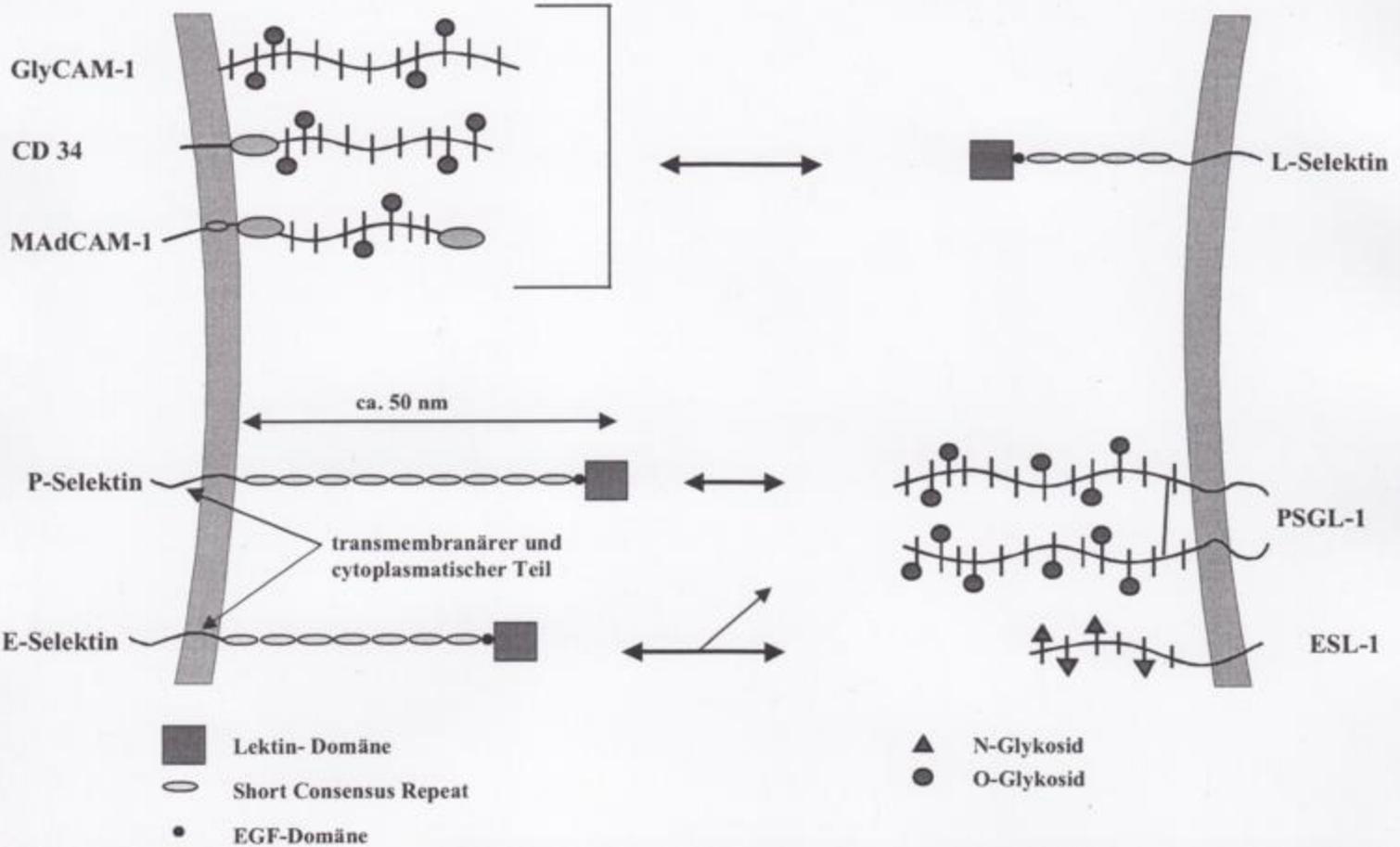
E-Selektin: auf Endothelzellen

P-Selektin: auf Plättchen, aber auch auf Endothel.

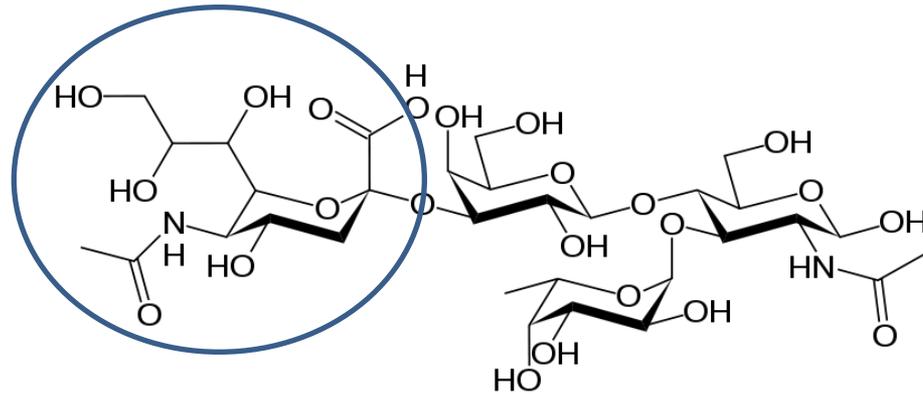
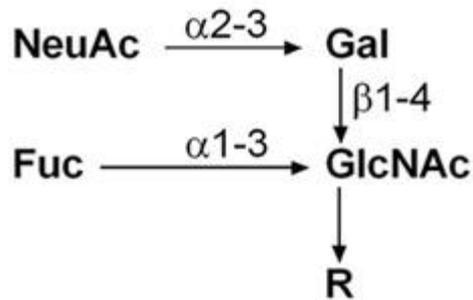
Komplementärer Bindungspartner: häufig Sialyl-Lewis C Tetrasaccharid-Sequenz

Endothelzelle

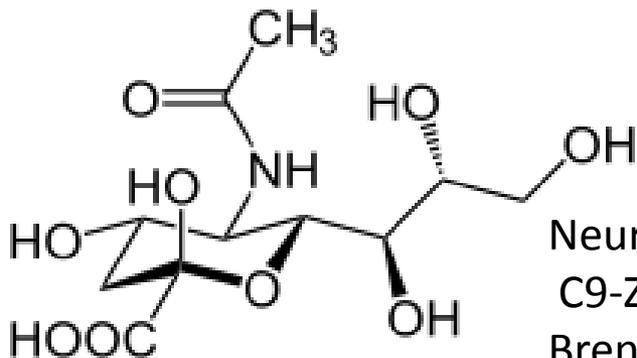
Leukozyt



Sialyl-Lewis X: Bindungspartner zu Selectin E

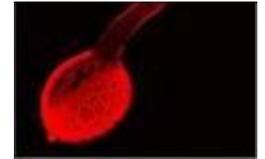
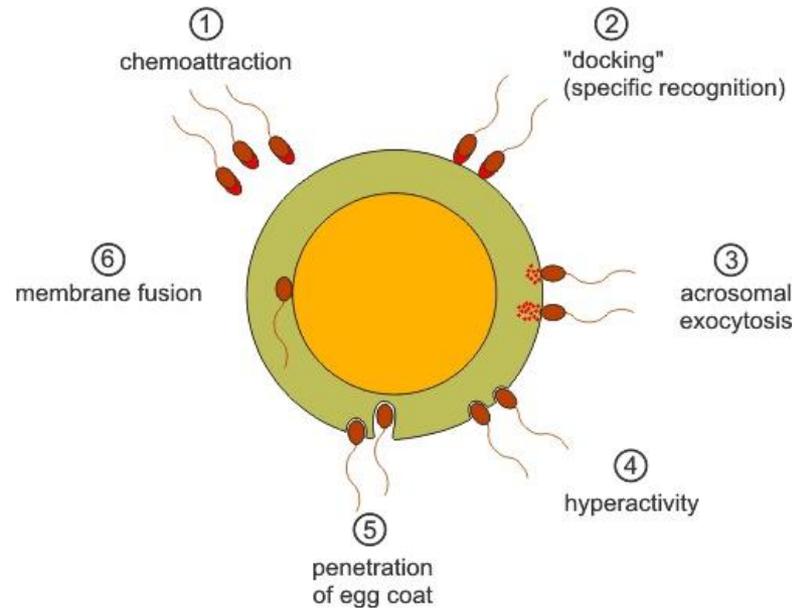
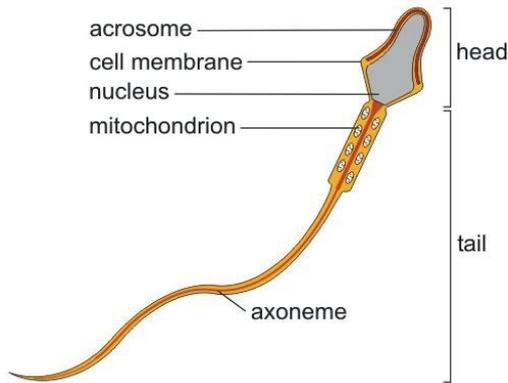


Coating von Liposomen mit Sialyl-Lewis X inhibiert die Selectin-abhängige Zelladhäsion in entzündlichen Prozessen, bei Metastasierungen etc.



Neuraminsäure syn. Sialinsäure
C9-Zucker aus acetyliertem Hexosamin +
Brenztraubensäure

Sperma-Eizelle Interaktion



Interaktion einer 1,4-Galactosyltransferase des Spermiums mit dem ZP3 Glycoprotein der Eizellen auf der *Zona pellucida*:

Oligosacchariderkennung als Voraussetzung zur Befruchtung

Antiadhäsive Glykokonjugate gegen pathogene Bakterien

Beispiel: *Helicobacter pylori*

Bakterielle, rezeptorvermittelte Adhäsion an Zielzelle

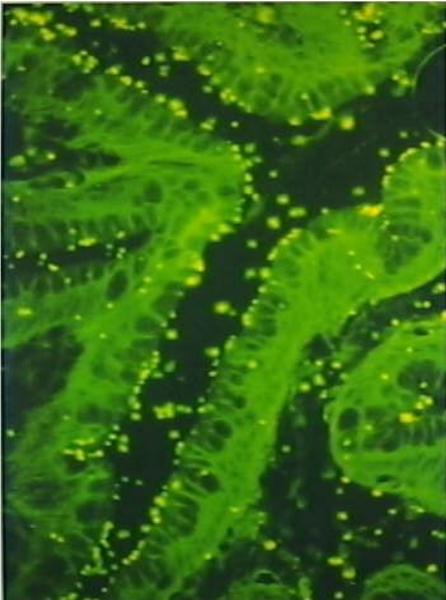
Adhäsine



Anheftung

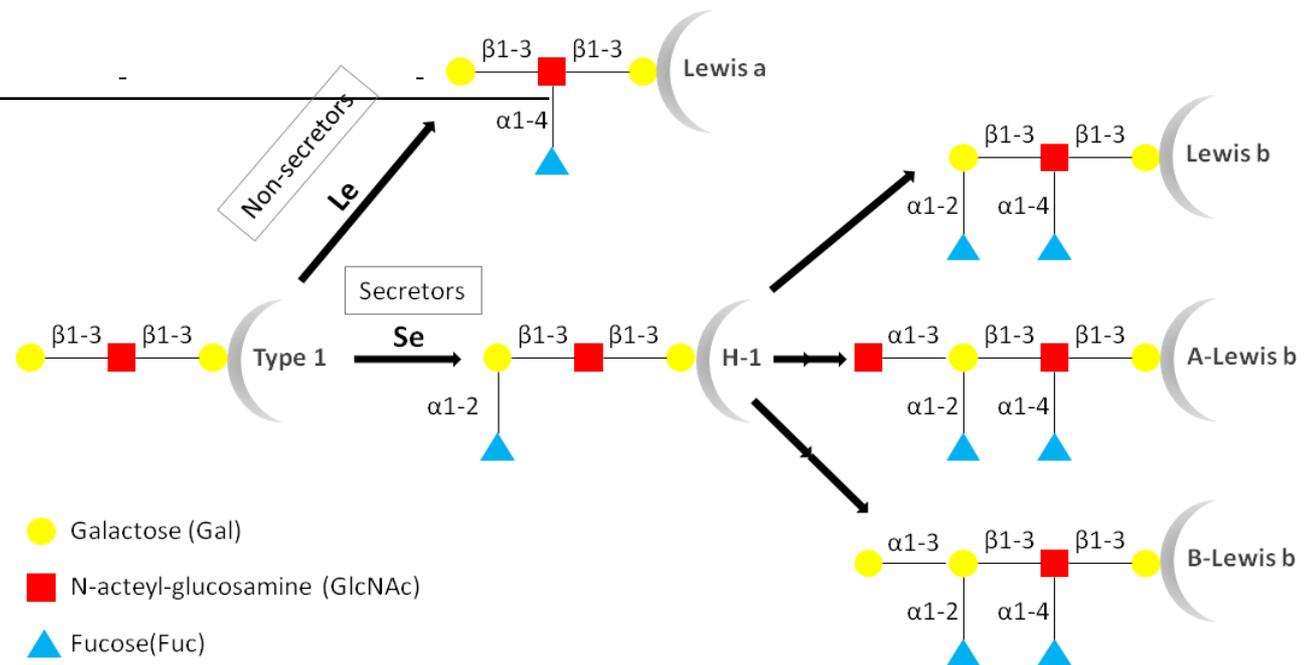


Aktivierung Virulenzfaktoren (z.B. VacA, CagA)

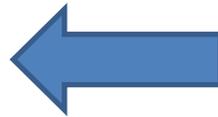
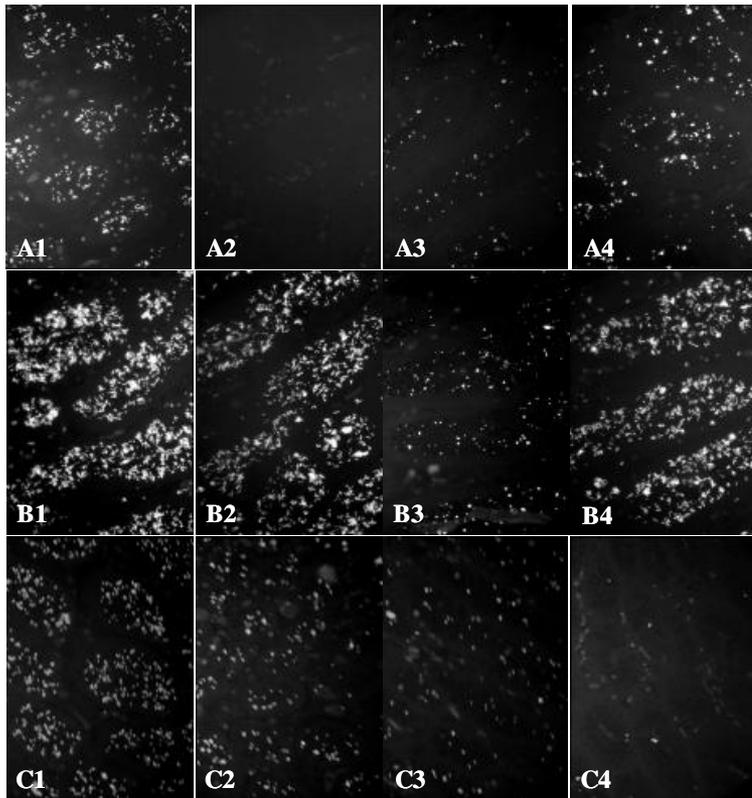


Bakterielle Adhäsine von *H. pylori* und ihre komplementären Bindungspartner

Adhesin	BabA	SabA	HpaA
Targets reported for adhesin interactions	H-1	Sialyl-Lewis ^a	3'-Sialyllactose
	Lewis ^b	Sialyl-Lewis ^x	Sialyl-Lewis ^x
	A-Lewis ^b	Laminin	Lactosylceramide
	B-Lewis ^b	MUC7	Fetuin (α_2 -HS-Glycoprotein)
	MUC5AC	MUC5B*	-
	MUC5B*	-	-
	gp-340	-	-

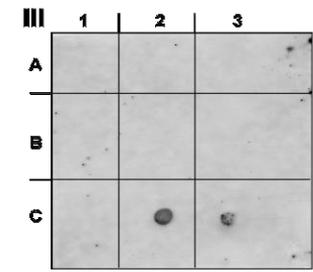
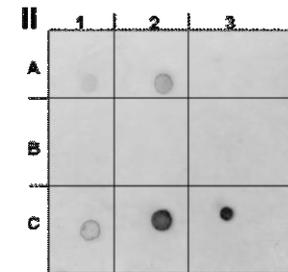
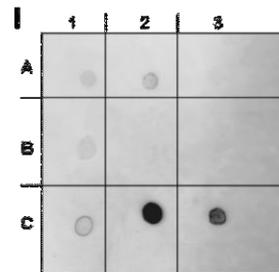


Antiadhäsive Glycoproteine aus *Ablemoschus esculentus*



Hemmung bakterieller Adhäsion

Hemmung BabA, SabA, etc.



A1: Lewis^b-HSA

A2: H-1-HSA

A3: Human serum albumin (HSA)

B1: 3'-Sialyllactose-HSA

B2: 6'-Sialyllactose-HSA

B3: Bovine serum albumine (BSA)

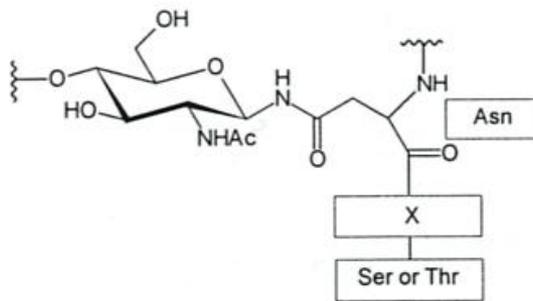
C1: Sialyl-Lewis^a-HSA

C2: Laminin

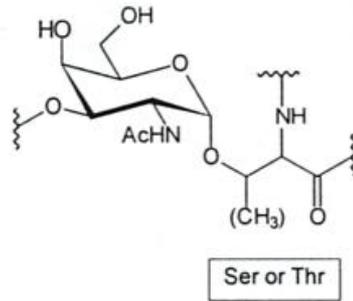
C3: Fibronectin

Glycoproteins

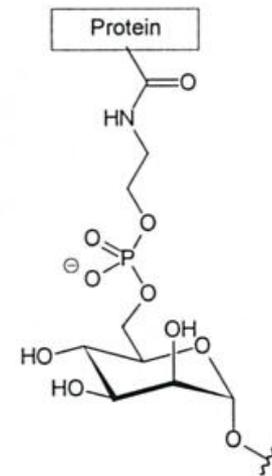
- N-Glycans
- O-Glycans
- ethanolamin phosphate as linker between protein and carbohydrate (GPI anchor)



N-glycosidic



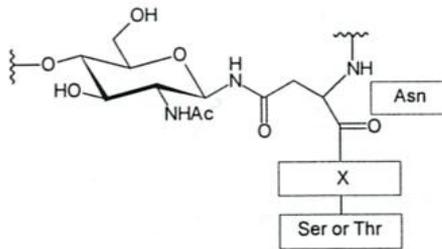
O-glycosidic



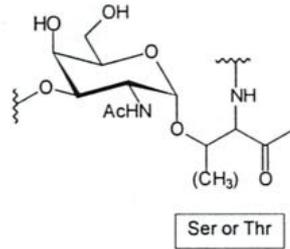
via ethanolamine phosphate

N-Glycans

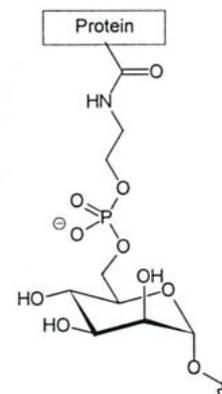
- oligosaccharides attached to protein via Asparagine amide to N-acetylglucosamine, which forms the non-reducing end
 - All N-glycans have an internal pentasaccharide region in common
 - high mannose type
 - complex type
 - hybrid type
- } N-glycans
- hydrolysis enzymatically by N-glycanases (e.g. PNGase F)



N-glycosidic



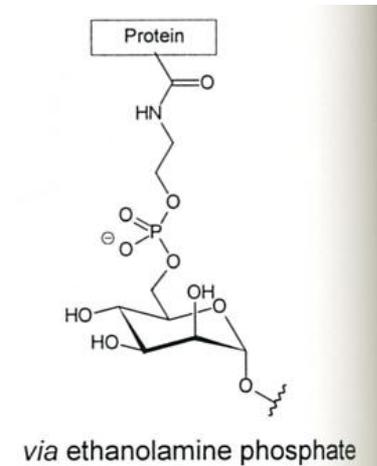
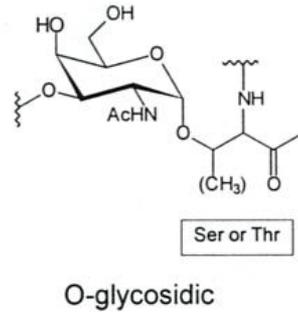
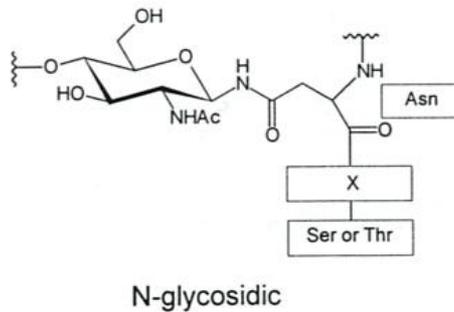
O-glycosidic



via ethanolamine phosphate

O-Glycans

- The reducing oligosaccharide end is attached via an ester bond to Serin or Threonin
- e.g. mucins
- hydrolysis with sodium hydroxide



Probleme in der industriellen Herstellung von Glykokonjugaten

- Rekombinante Glycoproteine aus eukaryotischen Zellen teilweise mit grossen Unterschieden im Glycosylierungsmuster

“Biotechnology companies are also starting to pay more attention to glycosylation, which is now being recognized as a major problem in protein production. Amgen (Thousand Oaks, CA), for example, discards about 80% of the erythropoetin it produces because the protein is not correctly glycosylated.”

Nature Publishing Group <http://biotech.nature.com>

Schlussfolgerung

Glycobiotechnologie:

- Faszinierend
- Komplex
- Analytisch schwierig
- Aber jede Menge neuer Targets für potentielle Entwicklungen