

Metabolisches Glykoengineering mit *N*-Acyl-Seitenketten-modifizierten Mannosaminen

Paul R. Wratil,* Rüdiger Horstkorte* und Werner Reutter^{†*}

Stichwörter:

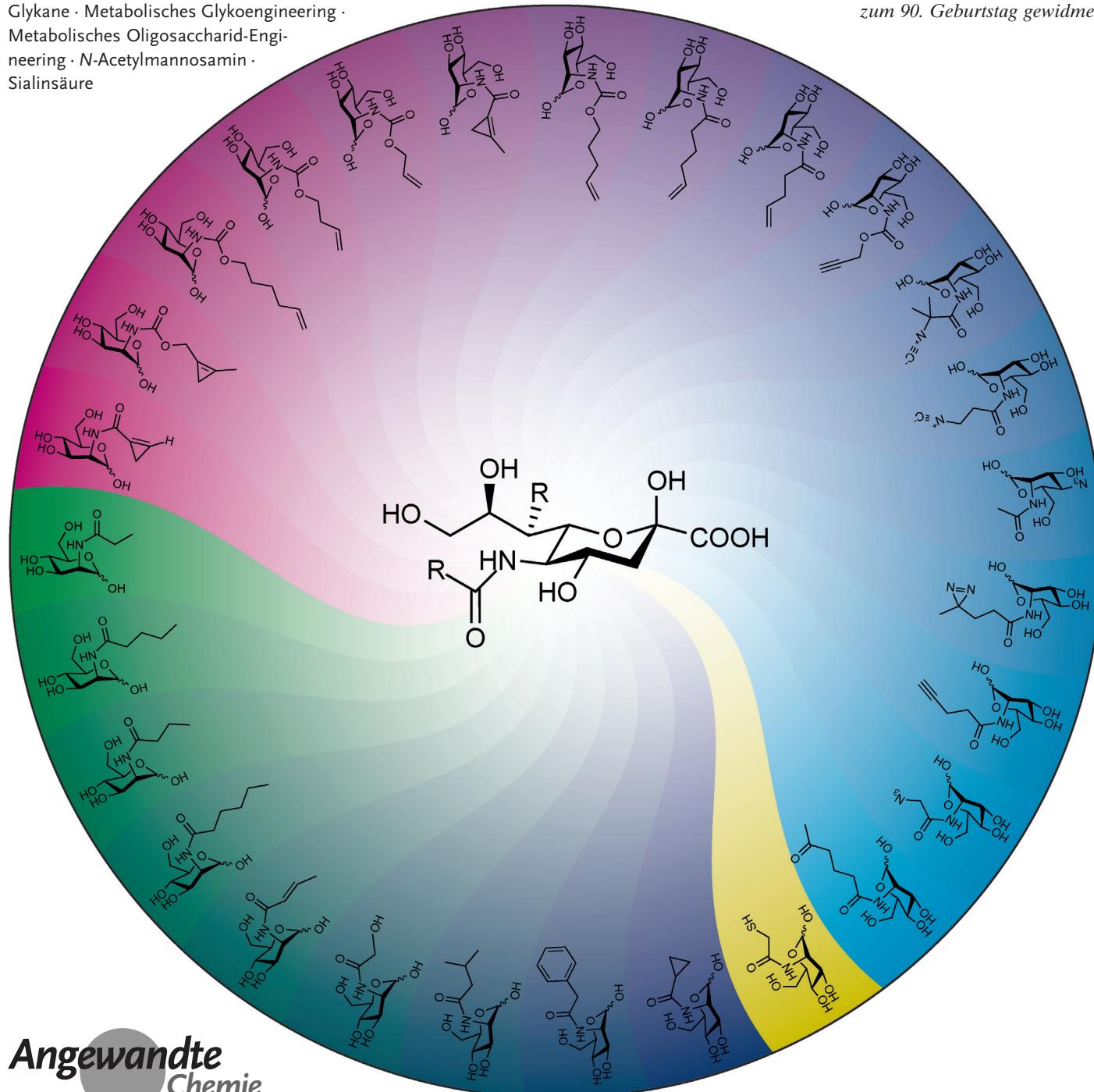
Glykane · Metabolisches Glykoengineering ·

Metabolisches Oligosaccharid-Engi-

neering · *N*-Acetylmannosamin ·

Sialinsäure

Professor Karl Decker
zum 90. Geburtstag gewidmet



Beim metabolischen Glykoengineering (MGE) werden Zellen und Tiere mit nichtnatürlichen Derivaten von Monosacchariden behandelt. Diese werden nach ihrer Aufnahme ins Zytosol metabolisiert und anschließend auf neu synthetisierten Glykokonjugaten exprimiert. MGE wurde zuerst für sialylierte Glykane realisiert, mit N-Acyl-modifizierten Mannosaminen als Vorstufen für nichtnatürliche Sialinsäuren. Voraussetzung ist die Promiskuität der Enzyme des Roseman-Warren-Biosyntheseweges. Diese tolerieren spezifische Modifikationen der N-Acyl-Seitenkette von Mannosamin-derivaten, z. B. Elongation mit Methylen-Gruppen (aliphatische Modifikationen) oder Einfügen reaktiver Gruppen (bioorthogonale Modifikationen). Nichtnatürliche Sialinsäuren werden in Glykokonjugate von Zellen und Organen integriert. MGE hat faszinierende biologische Konsequenzen für die behandelten Zellen (aliphatisches MGE) und ermöglicht die Visualisierung der Topographie und Dynamik der sialylierten Glykane *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* (bioorthogonales MGE).

1. Einleitung

Glykane sind omnipräsent und essenziell in der Natur. Als Bestandteil von Glykokonjugaten kommen Glykane z. B. in Glykoproteinen, Proteoglykanen oder Glykolipiden vor. Sie bestehen aus einer oder mehreren Monosaccharideinheiten, die kovalent mit der darunter liegenden chemischen Spezies verknüpft sind. Es existieren lineare und verzweigt-kettige Geometrien, und einige der Zuckerketten können aus mehreren tausend Einheiten bestehen. Eine Vielzahl von möglichen Monosaccharideinheiten, Verknüpfungstypen und Verzweigungsstrukturen trägt zum hohen Grad an struktureller Komplexität bei. Glykane sind in einer Vielzahl von biologischen Ereignissen involviert, vor allem in Zell-Zell- oder Zell-Pathogen-Interaktionen. Die terminalen Monosaccharideinheiten der Glykokonjugate sind besonders wichtig für glykanvermittelte Prozesse. In Wirbeltieren kommen Sialinsäure-, L-Fucose(Fuc)- oder D-Galactose(Gal)-Einheiten typischerweise an den nichtreduzierenden terminalen Enden sowie an den Verzweigungsstellen von Glykanen vor.^[1-3]

Wird die Struktur von Glykanen modifiziert, wird dies konsequenterweise auch zu Veränderungen ihrer biologischen Eigenschaften führen. Verschiedene Methoden können angewendet werden, um die Struktur von Glykanen zu verändern, unter anderem Enzyminhibition (z. B. von Glykosyltransferasen), enzymatische Behandlung oder genetische Manipulation der am Glykanmetabolismus beteiligten Enzyme. Eine andere Technik, welche die Beeinflussung von Glykanstrukturen *in vitro* und *in vivo* ermöglicht, ist metabolisches Glykoengineering (MGE, auch: metabolisches Oligosaccharid-Engineering, MOE).^[4,5]

Hierbei werden Zellen oder sogar ganze Organismen mit nichtnatürlichen Monosacchariden behandelt, die anschließend metabolisiert und in Glykokonjugate inkorporiert werden. Dafür müssen die Enzyme des betreffenden Biosyntheseweges promiskuitiv sein, d. h., sie müssen chemische

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	9633
2. Biochemie und Biologie von N-Acetylneuraminsäure	9634
3. Metabolisches Glykoengineering der N-Acyl-Seitenketten von Sialinsäuren	9639
4. Anwendungsbeispiele für nichtnatürliche Sialinsäuren mit aliphatischen N-Acyl-Seitenketten-Modifikationen	9643
5. Anwendungsbeispiele für nichtnatürliche Sialinsäuren mit bioorthogonalen N-Acyl-Seitenketten-Modifikationen	9651
6. Zukunftsaussichten	9655

Modifikationen ihrer Substrate tolerieren. Der erste Syntheseweg, bei dem MGE erfolgreich angewendet wurde, ist der Roseman-Warren-Syntheseweg, der die De-novo-Biosynthese von N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) beschreibt. Die Vorstufe für Neu5Ac auf diesem Weg ist D-N-Acetylmannosamin (ManNAc). Die Enzyme des Roseman-Warren-Weges sind promiskuitiv, vor allem für Veränderungen der N-Acyl-Seitenkette ihrer Substrate. Folglich wird ein N-Acyl-Seitenketten-modifiziertes Mannosamin in cellula zur entsprechenden nichtnatürlichen Sialinsäure metabolisiert und auf der Zelloberfläche exprimiert.

Im Laufe der letzten zwei Jahrzehnte wurden mehr als zwanzig nichtnatürliche Mannosamine beschrieben, die für MGE geeignet sind. Diese ManNAc-Derivate können in zwei Gruppen unterteilt werden, aliphatische und bioorthogonale Analoga. In aliphatischen Analoga ist die N-Acyl-Seitenkette um eine oder mehrere Methylen-Gruppen verlängert. MGE mit aliphatischen ManNAc-Analoga verleiht Zellen neue biologische Charakteristika und beeinflusst dadurch ihr Verhalten auf vielfache Art und Weise. Bioorthogonale Analoga tragen N-Acyl-Seitenketten-Modifikationen, die einerseits in lebenden Systemen nicht vorkommen und andererseits an

[*] P. R. Wratil, Prof. Dr. W. Reutter
Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und
Pathobiochemie, Charité – Universitätsmedizin Berlin
Arnimallee 22, 14195 Berlin (Deutschland)
E-Mail: paul-robin.wratil@charite.de

Prof. Dr. R. Horstkorte
Institut für Physiologische Chemie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Hollystraße 1, 06114 Halle (Deutschland)
E-Mail: ruediger.horstkorte@medizin.uni-halle.de

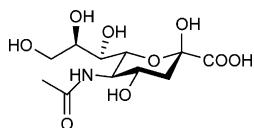
[†] verstorben

chemischen Reaktionen teilnehmen können. Diese reaktiven Gruppen können z.B. für die Darstellung von sialylierten Glykanen mit fluoreszierenden Farbstoffen verwendet werden. Basierend auf dieser Strategie konnte MGE auch mit anderen Monosacchariden angewendet werden, einschließlich D-N-Acetylgalactosamin (GalNAc),^[6–10] D-N-Acetylglucosamin (GlcNAc)^[11–13] sowie 2-Keto-3-desoxyoctonsäure (KDO)^[14] oder dem Zuckeralkohol Myoinositol.^[15–17]

In diesem Aufsatz werden die Anwendungen und Möglichkeiten von MGE mit N-Acyl-Seitenketten-modifizierten Mannosaminen beschrieben. In diesem Kontext ist Kenntnis über die Biochemie und Biologie von Neu5Ac eine wichtige Voraussetzung.

2. Biochemie und Biologie von N-Acetylneuraminsäure

N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), oder 5-Acetylamino-3,5-didesoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranosonsäure (Schema 1), ist ein wesentlicher struktureller und funktio-



Schema 1. N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac). In Lösung liegt Neu5Ac zumeist als β -Anomer vor (im Verhältnis $\alpha/\beta = 8:92$; im Schema ist das β -Anomer gezeigt).^[23]

neller Bestandteil von vielen Glykokonjugaten, der auf der Zelloberfläche von Bakterien und Säugetierzellen exprimiert wird und in vielen sekretorischen Glykoproteinen vorkommt. Neu5Ac gehört zur Familie der Sialinsäuren, die aus über 50 physiologisch wichtigen Verbindungen besteht und durch eine zunehmende Anzahl von unphysiologischen, durch MGE gebildeten Verbindungen ergänzt wird.^[2,18–21] Wegen seiner terminalen Position in Glykanen spielt die negativ geladene Neu5Ac eine wichtige Rolle bei intermolekularen und interzellulären Interaktionen. Neu5Ac wird bereits während der Embryogenese von Säugetieren benötigt. Dies wurde an Mäusen gezeigt, bei denen das Schlüsselenzym der



Paul R. Wratil wurde in Bergisch Gladbach geboren. Er ist Medizinstudent an der Charité – Universitätsmedizin-Berlin. Er wurde 2011 Mitglied der Gruppe von Werner Reutter. Im Rahmen seiner Doktorarbeit arbeitet er an der Entwicklung von Inhibitoren der De-novo-Biosynthese von Sialinsäuren sowie mit metabolischem Glykoengineering. Er ist Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes.

Neu5Ac-Biosynthese durch Geninaktivierung ausgeschaltet wurde. Die Tiere starben bereits am 8.5. Tag der Embryonalentwicklung.^[22]

Nachfolgend werden Beispiele für die biologische Bedeutung von Neu5Ac gegeben. Bei der spezifischen Immunantwort zeigen hochgradig sialylierte Antikörper herabgesetzte Affinität für zelluläre Fc-Rezeptoren. Auf diese Weise reguliert Neu5Ac die Antikörperaktivität in vivo und hemmt Entzündungsreaktionen. Bei einigen Autoimmunerkrankungen fehlt Antikörpern Neu5Ac und Gal.^[2,24–26] In polymorphekernigen Leukozyten (PMNs) wurde gezeigt, dass deren Fähigkeit, an Endothelzellen zu binden, von ihrem Grad an Zelloberflächensialylierung beeinflusst wird. Die Bindung wird durch Abspaltung von Neu5Ac nach der Aktivierung endogener Sialidasen gefördert. Hemmung dieser endogenen Sialidasen führt zur reduzierten Bindung von PMNs und inhibiert folgerichtig die Migration von PMNs in entzündlich veränderte Gewebe.^[27–29] Darüber hinaus wurde gezeigt, dass aktivierte PMNs die Oberfläche von arteriellen Endothelzellen der menschlichen Lunge desialylieren und dadurch ihre eigene Migration durch die endotheliale Zellenschicht erleichtern.^[30]

Neu5Ac spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung einer Vielzahl von Wachstumsprozessen. Beim Nervenwachstum wurde z.B. gezeigt, dass der Trk-Tyrosinkinasen-Rezeptor (der physiologisch sialyliert ist) erst nach Entfernen der endogenen, α -2,3-gebundenen Neu5Ac aktiviert wird und somit die Stimulation des Nervenwachstums durch Neurotrophin ermöglicht.^[31] Diese Erkenntnis steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass intrathekale Sialidase-injektion bei Ratten mit verletztem Rückenmark Axonaussprössung induziert.^[32]

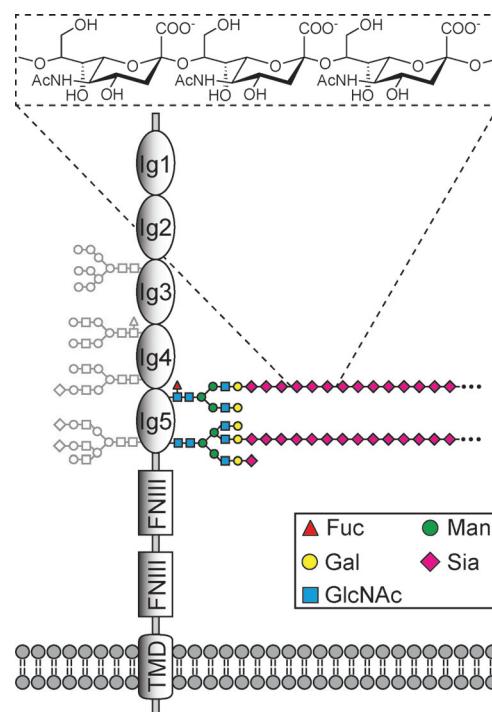
Kürzlich wurde gezeigt, dass Neu5Ac wie ein intrinsisches Antioxidationsmittel wirkt, indem sie toxische Wasserstoffperoxide unter physiologischen Bedingungen in vivo reduziert. Die Reaktion von Neu5Ac mit H_2O_2 ergibt eine nicht-toxische Carbonsäure.^[33] Diese zuvor wenig beachtete Eigenschaft von Neu5Ac wurde durch die Erkenntnis unterstrichen, dass Neu5Ac akuter LPS-induzierter Endotoxizität und oxidativem Stress entgegenwirkt und als Radikalfänger für reaktive Sauerstoffspezies wirkt.^[34,35]

Ein einzigartiges sialyliertes, membranassoziiertes Glykokonjugat, das auf der Oberfläche von neurotrophen Bakterien (z.B. *Escherichia coli* K1 und *Neisseria meningitidis*



Rüdiger Horstkorte, geboren in Remscheid, studierte Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz und an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg. Seine Doktorarbeit fertigte er 1993 im Labor von Melitta Schäfer an der ETH Zürich an. Nach einem durch ein EMBO-Stipendium geförderten Aufenthalt im Labor von Ten Feizi am MRC-Clinical Research Center in London war er von 1994 bis 2006 bei Werner Reutter an der Freien Universität Berlin tätig. 2001 habilitierte er im Fach Biochemie. 2006 wurde er Professor für physiologische Chemie an der Martin-Luther-Universität Halle.

Gp. B) sowie im neuronalen Säugetier-Zelladhäsionsmolekül (NCAM) exprimiert wird, ist die intern α -2,8-verknüpfte Polysialinsäure (PolySia). Dieses Molekül hat Wissenschaftler während der letzten vier Jahrzehnte besonders fasziniert. Polysialylierte Substrate können eine Kettenlänge von mehr als 400 Neu5Ac-Einheiten aufweisen.^[36,37] PolySia wurde zuerst in NCAM entdeckt (Schema 2).^[38] Nachfolgende Studien zeigten, dass dieses einzigartige Glykan auch auf anderen Säugetier-Glykoproteinen vorkommt, z.B. auf dem humanen Milch-Scavenger-Rezeptor, CD36,^[39] der α -Untereinheit von neuronalen, spannungsabhängigen Natriumkanälen in ausgewachsenen Ratten,^[40] auf Neuropilin-2 humarer dendritischer Zellen^[41] und auf dem synaptischen Zelladhäsionsmolekül-1 (SynCAM1),^[42] das von NG2-Gliazellen exprimiert wird. Auch die beiden strukturell verschiedenen Säugetier-Polysialyl-Transferasen ST8Sia II^[43,44] und ST8Sia IV^[45–47] sind auto-polysialyliert. Interessanterweise konnte bei neonatalen Ferkeln gezeigt werden, dass die zelluläre Expression von ST8Sia II und ST8Sia IV posttranslational und nicht transkriptional reguliert wird – ein grundlegender Unterschied zu Erkenntnissen aus Maus-Studien.^[48] NCAM gehört zur Immunglobulinsuperfamilie und ist das prominenteste Trägerprotein von PolySia. Hier findet die Polysialylierung ebenfalls posttranslational statt. PolySia-NCAM wird hauptsächlich im zentralen Nervensystem während der Embryogenese exprimiert. Seine Expression nimmt in der postnatalen Periode rasant ab. Lediglich in bestimmten Regionen des adulten Gehirns mit neuronaler Plastizität wird PolySia-NCAM physiologischerweise weiterhin exprimiert.^[49,50] In geringerem Ausmaß wird NCAM in skeletalen Myozyten, natürlichen Killerzellen und epididymalen sowie pankreatischen endokrinen Zellen exprimiert.^[51–54] NCAM ist dafür bekannt, Zell-Zell-Interaktionen zu modulieren, indem es homophile und/oder heterophile Interaktionen mit anderen Zelladhäsionsmolekülen, z.B. mit dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül L1 oder extrazellulären Matrixproteinen, bildet.^[55] Da es ein großes, „raumfüllendes“ Zelloberflächenmolekül ist, reduziert die Expression von PolySia sowohl NCAM-vermittelte adhäsive Prozesse als auch NCAM-unabhängige Zellinteraktionen.^[56–59] Die Polysialylierung von NCAM ist mit der Malignität vieler menschlicher Tumoren, einschließlich undifferenzierter Blastome, dem Wilmstumor, dem Kolonkarzinom, Bauchspeicheldrüsenkrebs und dem kleinzelligen Lungenkarzinom, assoziiert.^[60–66] Es ist nennenswert, dass ST8Sia II das Schlüsselenzym während der Entwicklung dieser PolySia-exprimierenden Tumoren darstellt.^[67] Dementsprechend ist die Entwicklung von Membran-permeablen Inhibitoren der (Poly-)Sialylierung eine wichtige Aufgabe (siehe Abschnitt 4.4).



Schema 2. Das polysialylierte neuronale Zelladhäsionsmolekül (NCAM). Der extrazelluläre Anteil von NCAM besteht aus fünf Ig-Domänen (Ig1–Ig5), gefolgt von zwei Fibronektin-Typ-III-Domänen (FNIII). Sechs N-Glykosylierungsstellen befinden sich in den Ig-Domänen Ig3–Ig5. Die beiden letzten dieser Glykosylierungsstellen (farbig markiert) können als Verankerungspunkt für eine oder mehrere PolySia-Ketten wirken. Der Polymerisationsgrad von PolySia kann über 400 α -2,8-verknüpfte N-Acetylneuraminsäure-Einheiten betragen. Die hier gezeigten Glykane sind allgemeine Beispiele für N-Glykane. Fuc: L-Fucose, Gal: D-Galactose, GlcNAc: D-N-Acetylglucosamin, Man: D-Mannose, Sia: Sialinsäure, TMD: Transmembran-Domäne. Das Schema ist zum Teil abgewandelt aus Lit. [70].

Im Unterschied zu seiner Funktion als verdeckendes, „tarnendes“ Glykotop spielt Neu5Ac auch eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung von Erkennungsprozessen und ist eine entscheidende Determinante für die Interaktion mit Nachbarzellen, der extrazellulären Matrix, löslichen Wachstumsfaktoren und Differenzierungsfaktoren (Ligand- oder Konter-Ligand-Konzept).^[68,69] So steht z.B. Neu5Ac in vielen Tumorzellen eng mit veränderter Zelladhäsion, Invasivität und Metastasenbildung im Zusammenhang. Bei infektiösen Erkrankungen kann Neu5Ac als Erkennungsstruktur für Pathogene dienen, z.B. bei Cholera, Tetanus oder Diphtherie. Derartige Interaktionen werden oftmals von Neu5Ac in Gangliosiden vermittelt. Darüber hinaus ist Neu5Ac wichtig für Zell-Virus-Interaktionen, vor allem für Influenza A und C,^[71] Polyoma-^[72] und Adenomaviren oder für das humane Immundefizienzvirus (HIV).^[73–75] Verschiedene Bakterienstämme exprimieren Kohlenhydrat-spezifische Adhäsine, welche die Bindung von Neu5Ac an Endo-



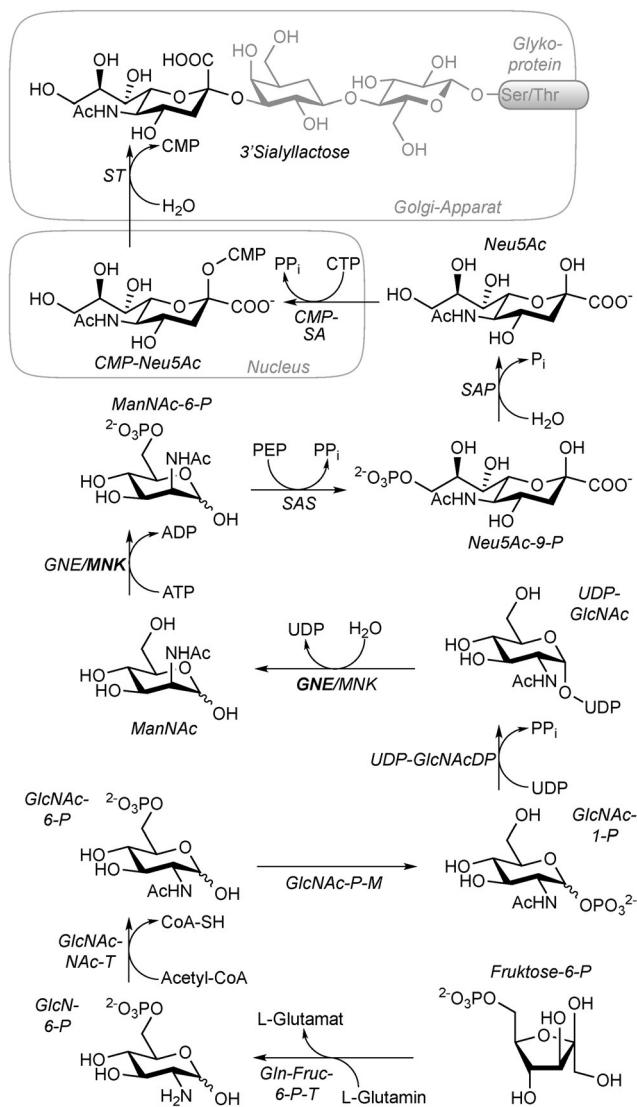
Werner Reutter, geboren in Hornberg, studierte Physik und Medizin in Freiburg und München. Im Labor von Karl Decker forschte er an der Galactosamin-Hepatitis und der Biosynthese von N-Acetylneuraminsäure als Basis seiner Habilitation. 1979 ging er an die Freie Universität Berlin als Leiter der Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie. Er war Sprecher des Sonderforschungsbereiches 366 der Deutschen Forschungsgemeinschaft bis 2005 und von 1999–2003 Vizepräsident der Freien Universität Berlin. Im Mai 2016 verstarb Werner Reutter nach kurzer, schwerer Krankheit.

thelzellen vermitteln, darunter *Helicobacter pylori*, *Streptococcus* spp. oder *E. coli*.^[76] Parasiten wie *Trypanosoma cruzi* verwenden ihre so genannte *trans*-Sialidase, um Neu5Ac auf Wirtzellen zu erkennen, und übertragen diese Sialinsäure anschließend auf ihre eigene Zelloberfläche, um sich dadurch vor der Erkennung durch das Immunsystem des Wirtorganismus zu schützen.^[68,77-81]

2.1. Biosynthese von N-Acetylneuraminsäure

Ungefähr 2–5% des in der Zelle anfallenden Fructose-6-phosphats (Fructose-6-P) verlassen die Glykolyse und treten in den Stoffwechselweg der Aminozucker ein (Schema 3).^[82] Nach der Aminierung zu Glucosamin-6-P (GlcN-6-P), katalysiert durch die Fructose-6-P-Amidotransferase (Gln-Fruc-6-P-T), wird *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) mithilfe von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) gebildet. Eine zusätzliche Quelle für GlcNAc sind endogen abgebaut Glykokonjugate oder die Verdauung von Nährstoffen. Nach seiner Phosphorylierung wird GlcNAc-6-P zu UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) metabolisiert, dem Schlüsselmetaboliten des Roseman-Warren-Biosyntheseweges.^[83–88] Die bifunktionale UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (GNE/MNK) ist das Schlüsselenzym für De-novo-Biosynthese von Neu5Ac.^[89–91] Dieses Enzym katalysiert die 2-Epimerisierung von UDP-GlcNAc zu *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) und anschließend die Phosphorylierung von ManNAc zu ManNAc-6-P. 2-Acetamidoglucal ist ein Intermediat, das bei dieser Reaktion nach der *anti*-Eliminierung von UDP gebildet wird (Schema 4).^[92]

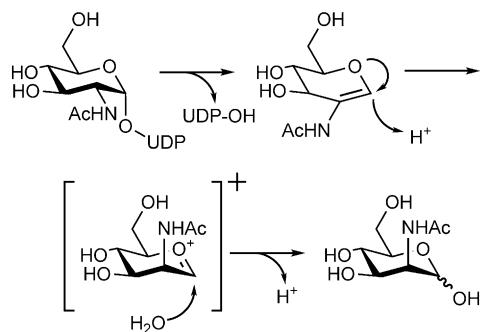
Die Expression von GNE/MNK ist ubiquitär,^[93,94] und das Ausmaß ihrer Expression wird an die Aufnahme von Sialinsäure aus der Nahrung angepasst (wie in neonatalen Ferkeln gezeigt).^[95] Die 2-Epimerase-Aktivität ist im N-Terminus und die Kinasenaktivität im C-Terminus des Proteins lokalisiert. Dieses wurde durch gerichtete Mutagenese des bifunktionalen Enzyms nachgewiesen.^[91] Im Zytosol liegt GNE/MNK in Form eines tetrameren Enzyms vor.^[89,90,96] Der tetramere Zustand wird von UDP-GlcNAc aufrechterhalten, das die höchste zytosolische Konzentration von Zuckernukleotiden in lebenden Systemen aufweist.^[97-100] In vitro konnte beobachtet werden, dass in Abwesenheit von UDP-GlcNAc eine nur Kinasenaktivität aufweisendes Dimer gebildet wird.^[89,96] In seiner Funktion als Schlüsselenzym der Neu5Ac-Biosynthese wird die Epimerase-Aktivität der GNE durch CMP-Neu5Ac Feedback-inhibiert.^[100] Absolute Hemmung der GNE-Aktivität in vitro wurde bei 60 µM CMP-Neu5Ac beobachtet, was annähernd der doppelten Konzentration entspricht, die normalerweise im Zytosol vorgefunden wird.^[101,102] Die enzymatische Aktivität der GNE kann durch Proteinkinase-C-vermittelte Phosphorylierung erhöht werden. Es wurden acht Phosphorylierungsstellen beschrieben.^[94,103] Anhand mehrerer Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Expression der GNE durch die Methylierung ihrer Promotor-Region epigenetisch reguliert wird, was die Expression von GNE/MNK-mRNA vermindert und die zelluläre Sialylierung somit drastisch hemmt.^[104] Weiterhin wird die GNE-Aktivität durch Metallionen beeinflusst. Die



Schema 3. De-novo-Biosynthese von *N*-Acetylneuraminsäure. Das abgebildete 3'Sialyllactose-Glykan steht repräsentativ für sialylierte Glykanen im Allgemeinen. GlcNAc-NAc-T: Glucosamin-1-phosphat-*N*-Acetyltransferase, GlcNAc-P-M: *N*-Acetylglucosamin-Phosphomutase, CMP-SA: CMP-*N*-Acetylneuraminsäure-Synthetase, Gln-Fruc-6-P-T: Glutamin-Fructose-6-phosphat-Transaminase, GNE/MNK: UDP-*N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamin-Kinase, SAP: *N*-Acetylneuraminsäure-9-Phosphatase, SAS: *N*-Acetylneuraminsäure-9-phosphat-Synthase, ST: Sialyltransferasen, UDP-GlcNAcDP: UDP-*N*-Acetylglucosamin-Diphosphorylase.

zweiwertigen Kationen Zn^{2+} , Cd^{2+} oder Hg^{2+} (Gruppe IIB des Periodensystems) hemmen das Enzym, wohingegen Na^+ , K^+ , Rb^+ und Cs^+ (Gruppe IA) die Enzymaktivität um bis zu fünfzehnmal erhöhen.^[105,106] Diese Erkenntnis sollte die Forschung über die Bedeutung der Neu5Ac-Biosynthese für die Behandlung zerebraler Beeinträchtigungen nach Vergiftung durch Hg^{2+} oder Methyl- Hg^+ anregen.^[107] Da die MNK durch derartige Mechanismen weder beeinflusst noch reguliert wird, ist die GNE-Aktivität für die Regulierung der Zelloberflächensialylierung von grundlegender Bedeutung.^[108-110]

Die Kinasenaktivität der GNE/MNK reflektiert im Wesentlichen lediglich die Menge an in der Zelle bereitstehenden



Schema 4. Die von der UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase (GNE) katalysierte Reaktion. Die GNE katalysiert zuerst eine *anti*-Eliminierung von UDP mit 2-Acetamidoglucal als Zwischenprodukt. Dieser Schritt ist mechanistisch vergleichbar mit Glycosyltransferase-katalysierten Reaktionen.

dem ManNAc. Somit ist das Vorhandensein von ManNAc eng mit dem Grad an Neu5Ac-Expression auf der Zelloberfläche verbunden. Füttert man beispielsweise Ratten mit ManNAc, lässt sich eine Dosis-abhängige Steigerung ihrer Neu5Ac-Expression beobachten.^[111] Sechs Stunden nach der Behandlung ist die Konzentration von Neu5Ac und CMP-Neu5Ac in der Leber um ein Zehnfaches erhöht. Dieser schnelle Metabolismus von ManNAc ist einer der Hauptgründe für den Erfolg von MGE mit ManNAc und dessen Analoga.

Dem Roseman-Warren-Biosyntheseweg folgend wird ManNAc-6-P mit Phosphoenolpyruvat kondensiert, katalysiert durch die Neu5Ac-9-P-Synthase (SAS), und es entsteht Neu5Ac-9-P.^[86] Nach der Dephosphorylierung zu Neu5Ac schließt sich ein einzigartiger Schritt in der Zucker-Biochemie an: Neu5Ac wird im Zellkern durch die CMP-Neu5Ac-Synthase (CMP-SA) aktiviert.^[112–114] Dies steht im Gegensatz zu allen anderen Monosacchariden, die im Zytosol aktiviert werden, und das entweder durch GTP, UTP oder ATP. Die biologische Bedeutung dieser nukleären Lokalisierung der Neu5Ac-Aktivierung ist bis heute unbekannt. Es wird postuliert, dass die negativ geladene CMP-Neu5Ac mit in Genexpression involvierten nukleären Proteinen interagieren könnte, indem sie deren Bindung zur DNA reduziert. Eine andere Hypothese besagt, dass CMP-Neu5Ac an nukleäre Proteine bindet, um deren Transport aus dem Nukleus in den Golgi-Apparat zu erleichtern.

Die aktivierte CMP-Neu5Ac wird in Vesikeln zum Golgi-Netzwerk transportiert. Spezifische, durch den Export von CMP ausgeglichene Antiporter tragen zur Erhaltung der hohen CMP-Neu5Ac-Konzentration innerhalb des Golgi-Lumens bei.^[115] Im Golgi-Apparat selbst katalysieren spezifische Sialyltransferasen den Transfer von Neu5Ac auf die jeweiligen Glykokonjugat-Akzeptoren. Diese Reaktionen werden durch die Familie der Mono-, Di-, Tri-, Oligo- und Polysialyltransferasen (STs) katalysiert, benannt als ST8Sia I–IV. Bis heute wurden über 20 STs charakterisiert.^[116]

Die strukturelle Diversität der Sialinsäuren selbst ergibt sich aus den unterschiedlichen Amino-Substituenten sowie aus dem Typ und der Anzahl von Hydroxy-Substituenten an den Positionen C4, C7, C8 und C9. Mögliche Hydroxy-Sub-

stituenten sind Acetyl-, Lactoyl-, Sulfonyl-, Phosphoryl- und Methyl-Gruppen.^[18] Die Einführung von Hydroxy-Modifikationen findet höchstwahrscheinlich im Golgi-Lumen statt, entweder bei freier CMP-Neu5Ac oder in bereits sialylierten Glykokonjugaten.^[117] Im Phylum der Deuterostomia sind alle oben beschriebenen Arten von *O*-Modifikationen vorhanden. Das Subphylum der Wirbeltiere exprimiert hauptsächlich *O*-acetylierte, oder seltener *O*-lactoylierte Sialinsäuren.^[20] Während über 50 natürlich vorkommende Sialinsäurederivate identifiziert wurden, exprimieren humane Gewebe prinzipiell fünf verschiedene Sialinsäuren in nennenswerten Mengen: zum größten Teil Neu5Ac und kleine Mengen von 9-*O*-acetylierter *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5,9Ac₂), 9-*O*-lactosylierter *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac9Lt) und *N*-Glykolylneuraminsäure (Neu5Gc), in der eine Hydroxy-Gruppe eines der drei Wasserstoffatome in der C5-Position von Neu5Ac ersetzt, oder das neuste Mitglied der Familie, KDN (2-Keto-3-desoxy-D-glycero-D-galacto-nononsäure). In Säugetieren übersteigt der Grad der Expression von KDN oft den von Neu5Gc.^[118]

Hinsichtlich der Amino-Substituenten werden von Säugetergeweben Neu5Ac sowie Neu5Gc exprimiert. Allerdings sind humane Zellen wegen einer Mutation des Gens, das für die CMP-Neu5Ac-Hydroxylase kodiert, weder in der Lage, Neu5Gc zu synthetisieren, noch deren kovalente Modifikationen zu produzieren.^[119,120] Das Vorhandensein von Neu5Gc, die ursprünglich als ein onkofetales Antigen betrachtet wurde, im menschlichen Organismus wird heute als Folge einer Ernährung gesehen, die reich an Milchprodukten und rotem Fleisch ist. Diese Erkenntnis hat zuletzt großes Interesse hervorgerufen, da Neu5Gc mit Gesundheitsrisiken wie Entzündungsreaktionen sowie Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs in Zusammenhang gebracht wird.^[121]

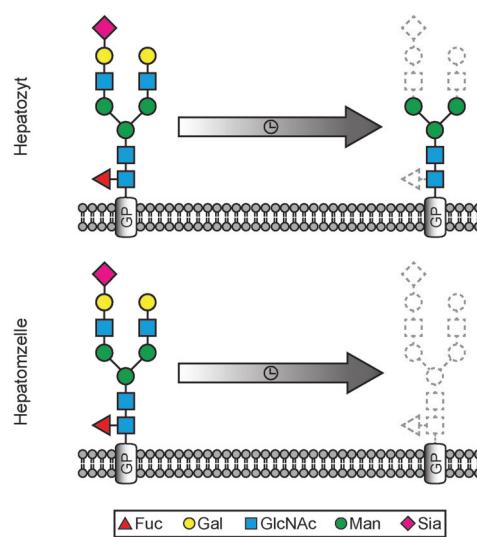
2.2. Biologische Merkmale von *N*-Acetylneuraminsäure

Als Pioniere der Sialinsäureforschung sind Ashwell und Morell zu sehen, deren Arbeiten vor etwa einem halben Jahrhundert diesen Forschungszweig begründeten.^[122–124] Sie zeigten, dass terminale Neu5Ac in Glykokonjugaten eine entscheidende Rolle für die Überlebensdauer von Serum-Glykoproteinen spielt, und zwar dadurch, dass sie darunterliegende Galactosyl-Einheiten verdeckt. Ungeschützte Galactosyl-Reste werden vom Asialoglycoprotein-Rezeptor, dem so genannten Ashwell-Morell-Rezeptor, der auf der Zelloberfläche von Hepatozyten exprimiert wird, erkannt. Der Ashwell-Morell-Rezeptor ist das erste jemals beschriebene Säugetier-Lektin.^[124] Das hier aufgedeckte Rezeptor-Liganden-Konzept trug enorm zu unserem heutigen Verständnis von Rezeptor-vermittelten Mechanismen bei und demonstrierte erstmals die zentrale und entscheidende Rolle von Neu5Ac bei Erkennungs- und Anti-Erkennungs-Vorgängen. Bei biologischen Interaktionen sind Neu5Ac-Reste auf Glykokonjugaten entweder selbst Bindungspartner für spezifische Rezeptoren (Erkennung), oder sie schirmen darunterliegende Zucker-Reste ab und behindern somit Rezeptor-Ligand-vermittelte Interaktionen (Anti-Erkennung).^[2] Die Erkennung von Neu5Ac hat eine besondere klinische

Bedeutung z.B. bei Influenzavirus-Infektionen (siehe Abschnitt 4.1). Ein Beispiel für den Anti-Erkennungs-Effekt sind Lipoproteine niederer Dichte und Chylomikronen, die mithilfe des Ashwell-Morell-Rezeptors nach ihrer Desialylierung aus dem Serum entfernt werden.^[125] Erythrozyten, Lymphozyten und Thrombozyten mit reduzierter Sialinsäure-Expression auf der Zelloberfläche werden aus der Zirkulation eliminiert.^[2, 73, 126–129] Die sukzessive Degradation von Neu5Ac auf Zelloberflächen wird als ein übliches Altersmerkmal dieser Zellen begriffen. Jüngst wurde die pathophysiologische Bedeutung von Neu5Ac und des Ashwell-Morell-Rezeptors während der durch *Streptococcus pneumoniae* verursachten Sepsis erkannt. Eine Streptokokken-Sialidase desialyliert Thrombozyten, die daraufhin vom Ashwell-Morell-Rezeptor erkannt und in Hepatozyten sequestriert werden. Dadurch wird die fatale disseminierte intravaskuläre Koagulopathie in ihrer Dynamik gedämpft.^[130, 131]

Der Anti-Erkennungs-Effekt, den Neu5Ac vermittelt, ist bei vielen humanen Tumoren von großer Bedeutung, denn diese zeigen häufig Hypersialylierung und ein aberrantes, unphysiologisches Sialyierungsmuster. Hierbei wirkt die Hypersialylierung wie eine „Tarnkappe“, die Tumorzellen davor bewahrt, vom Immunsystem erkannt zu werden. Dieses Anti-Erkennungs-Phänomen unterstützt die Malignität und das metastatische Potential vieler humaner Tumoren.^[3, 101, 132, 133] Eine verhängnisvolle Eigenschaft von Metastasen ist die erhöhte Sialylierung von $\beta 1$ -Integrin, was wiederum die Galektin-3-abhängige Zelladhäsion blockiert und somit Apoptose verhindert.^[134, 135] Erstaunlicherweise wurden in vielen humanen Tumoren, die noch keine lymphatischen Metastasen aufwiesen, erhöhte Spiegel an KDN, nicht aber an Neu5Ac oder Neu5Gc bestimmt. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Konzentration von freier KDN ein möglicher Biomarker zur Erkennung von Tumoren im Frühstadium ist und einen prognostischen Wert bei der Festlegung des Malignitätsgrades haben könnte.^[118]

Die strukturelle Rolle der Neu5Ac-Expression auf der Zelloberfläche ist bereits von vielen Autoren beleuchtet worden,^[2, 3] vor allem im Zusammenhang mit dem veränderten Glykosylierungsmuster von Tumorzellen.^[136] Ein zusätzliches Merkmal, das bisher wenig Erwähnung fand, ist der Umsatz Membran-gebundener *N*-Glykanen. Für bestimmte Membran-assoziierte Glykoproteine konnte gezeigt werden, dass Neu5Ac und andere periphere Zucker, wie Gal oder GlcNAc, einen schnelleren Umsatz zeigen als die Kernzucker, Mannose oder der Chitobioseanteil (Schema 5). Die Halbwertzeiten der Kernzucker und der Polypeptide aller Glykoproteine, bei denen dieser Umsatz bisher bestimmt wurde, betragen zwischen 60 und 80 h. Im Unterschied dazu wurden für periphere Zuckereinheiten kürzere Halbwertzeiten gemessen: zwischen 12 (Fuc) und 33 h (Neu5Ac).^[137–139] Für die nichtnatürliche Sialinsäure *N*-Lävulinoylneuraminsäure (Neu5Lev) wurde eine noch kürzere Halbwertzeit von weniger als 2 h bestimmt.^[140] Diese Eigenschaft, die Serum-Glykoproteinen, wie Transferrin,^[141, 142] anscheinend nicht zuteil ist, könnte ein allgemeines Merkmal von peripheren Zuckern in Membran-Glykoproteinen sein. Es wird an dieser Stelle postuliert, dass diese Unterschiede der Mik-



Schema 5. Umsatz von Membran-gebundenen *N*-Glykanen in Hepatozyten gegenüber dem in Hepatomzellen. In Hepatozyten haben die Kernzucker von *N*-Glykanen eine ähnliche Halbwertzeit wie die Polypeptide, mit denen sie verbunden sind. Hierbei haben die peripheren Zuckereinheiten eine Halbwertzeit zwischen 12 und 33 h. In Hepatomzellen hat die gesamte *N*-Glykan-Kette eine kürzere Halbwertzeit. GP: Glykoprotein.

rodynamik von *N*-Glykanen. Differenzen beim Rezeptor- und/oder Membranrecycling widerspiegeln. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass bei verschiedenen Zelloberflächen-Glykoproteinen nach ihrer Desialylierung eine partielle Resialylierung beobachtet wurde, was auf ein Recycling von der Zelloberfläche zum Golgi-Apparat oder zum *trans*-Golgi-Netzwerk schließen lässt.^[139, 143] Dieser schnelle Umsatz von peripheren Zuckereinheiten wurde auf der Oberfläche von Leberzellen beobachtet.^[144] Zwischen Hepatomzellen und physiologischen Hepatozyten wurde ein markanter Unterschied festgestellt: Auf der Oberfläche von Hepatomzellen hatten nicht nur einzelne Zuckereinheiten, sondern die gesamten *N*-Glykanketten eine kürzere Halbwertzeit.^[145] Dieser Befund zeigt einmal mehr die Unterschiede in der Glykanzusammensetzung und dem Glykanumsatz zwischen normalen und Tumorzellen.

Mikrodynamiken während der Endozytose könnten ebenfalls zum Umbau von Glykokonjugaten beitragen. Um die Forschung bezüglich der Halbwertzeiten von Zelloberflächen-Glykokonjugaten weiterzubringen, wäre es sinnvoll, zunächst die dafür verantwortlichen Glykosidasen zu identifizieren. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Membran-assoziierten Sialidasen NEU3 und NEU1 terminale Neu5Ac-Einheiten von Zelloberflächen-Sialosiden entfernen können.^[146–148] Das Vorhandensein Membran-assozierter α -Mannosidase wurde ebenfalls anhand von Hepatomzellen gezeigt, die mit *N*-Glykanen vom „High Mannose Type“ dekoriert waren.^[149]

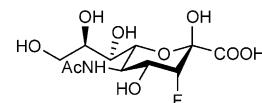
2.3. Hemmung der N-Acetylneuraminsäure-Biosynthese und der Zelloberflächen-Sialylierung

Die Entwicklung von Inhibitoren der Zelloberflächensialylierung ist von klinischer und biologischer Bedeutung. In den letzten Jahren wurden Substanzen entwickelt, die entweder das Schlüsselenzym der Sialinsäure-Biosynthese, die GNE/MNK, oder die Gruppe der Sialyltransferasen (STs), die den letzten Schritt bei der Biosynthese von sialylierten Glykanen katalysieren, als Angriffspunkt haben.

Die meisten bis heute beschriebenen GNE/MNK-Inhibitoren ahmen die natürlichen Substrate UDP-GlcNAc oder ManNAc nach. Die Bindungsstellen für Liganden in den aktiven Zentren beider Domänen wurden mithilfe von Sättigungs-Transfer-Differenz-NMR-Spektroskopie bestimmt. Für die GNE-Domäne zeigte UDP die höchste Bindungsaaffinität. Das Vorhandensein von mindestens einer Phosphat-Gruppe ist für diese Interaktion notwendig.^[150,151] Nachdem dieser Aspekt bekannt war, wurden UDP-*exo*-Glykal-Derivate synthetisiert, und es wurde gezeigt, dass diese die GNE-Aktivität hemmen und eine mit dem natürlichen Substrat, UDP-GlcNAc, vergleichbare Affinität aufweisen (K_M (UDP-GlcNAc) = 11 μ M).^[89,152] Kürzlich wurde gezeigt, dass 2',3'-Dialdehydo-UDP-*N*-acetylglucosamin die GNE irreversibel inhibiert, indem es kovalente Bindungen mit Aminosäuren im aktiven Zentrum des Enzyms bildet.^[153] Leider reagiert dieser Inhibitor auch mit Aminosäuren in anderen Proteinen und ist daher unspezifisch und darüber hinaus zytotoxisch. Weiterhin wurde gezeigt, dass die GNE-Aktivität mit Analoga der Übergangsstadien zwischen UDP-GlcNAc und ManNAc in der GNE-katalysierten Reaktion gehemmt werden kann.^[154,155]

Kristallographische Studien regten die Synthese von C6-modifizierten ManNAc-Analoga als mögliche Inhibitoren der MNK-Aktivität des bifunktionalen Enzyms an.^[156] Zuerst wurde eine C6-acetylierte Verbindung als effektiver Inhibitor der MNK-Aktivität in vitro eingeführt. Dieser Inhibitor konnte nicht in Zellen getestet werden, weil die *O*-Acetyl-Gruppe durch zytosolische Esterasen abgespalten werden würde.^[157–160] Die Expression von Sialinsäure auf der Zelloberfläche konnte durch Verwendung eines peracetylierten C6-modifizierten ManNAc-Diselenid-Dimers gehemmt werden.^[161] Die C3-Position von ManNAc wurde als ein weiteres wichtiges Bindungsepitop identifiziert,^[151] und es wurde gezeigt, dass die Zelloberflächen-Sialylierung durch Verwendung eines peracetylierten C3-modifizierten ManNAc-Analogons reduziert werden kann.^[162] Bei Versuchen mit *N*-Acyl-Seitenketten-modifizierten Mannosaminen wurde gezeigt, dass *N*-Propionylmannosamin (ManNProp) die Biosynthese von Neu5Ac in einem zellfreien System aus der Rattenleber inhibiert.^[163] In einem anderen Ansatz wurden Picolinsäure-Derivate identifiziert, welche die MNK-Aktivität in vitro hemmen.^[164]

Die ersten möglichen Inhibitoren von α -2,6- und α -2,3-STs wurden auf Basis einer Neuraminy-Substitution durch Heteroaryl-Ringe als Übergangsstadiumsanaloga von CMP-Neu5Ac synthetisiert.^[165] Durch Verwendung von Hochdurchsatz-Screening wurden ST-Inhibitoren identifiziert, die keine gemeinsamen Strukturmerkmale mit CMP-Neu5Ac



Schema 6. Sialyltransferase-Inhibitor. Dieses Analogon der *N*-Acetylneuraminsäure trägt eine C3-Fluor-Substitution.

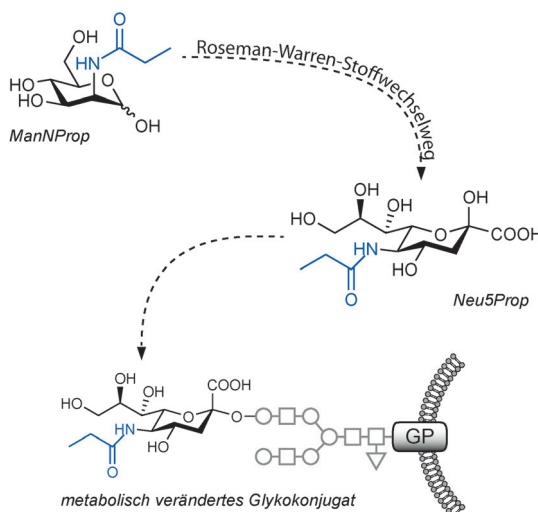
aufweisen.^[166] Diese Studie zeigte erstmals, dass es möglich ist, spezifische STs aus der größeren Familie der STs selektiv zu hemmen. Ein C3-fluoriertes Analogon von Neu5Ac wurde als ein potenter ST-Inhibitor synthetisiert (Schema 6).^[167] Dieser Inhibitor reduziert die Zelloberflächen-Sialylierung in kultivierten Zellen. Darüber hinaus ist es mit dieser Substanz möglich, die Sialylierung *in vivo* zu blockieren.^[168] Mit dem C3-fluorierten Derivat behandelte Mäuse zeigten Beeinträchtigungen der Leber, eine irreversible Dysfunktion der Niere und Wachstumsstörungen. Diese Resultate bestätigen die entscheidende Rolle von Neu5Ac für die Leber- und Nierenfunktion und zeigen zudem die Grenzen des pharmakologischen Gebrauchs von Inhibitoren der Zelloberflächen-Sialylierung auf. Kürzlich wurde der erste nanomolare ST-Inhibitor publiziert.^[169] Diese Verbindung ahmt die Struktur von CMP-Neu5Ac nach und enthält einen Fluorescein-Rest, der eine Überwachung ihrer zellulären Aufnahme ermöglicht. Zudem wurde gezeigt, dass diese Substanz STs sowohl von bakteriellem als auch vom Säugetier-Ursprung hemmt.

3. Metabolisches Glykoengineering der *N*-Acyl-Seitenketten von Sialinsäuren

3.1. Aliphatische Modifikationen

Als Teil der biochemischen Charakterisierung der in die Neu5Ac-Biosynthese involvierten Enzyme (Roseman-Warren-Weg) war es wichtig, die Spezifität dieser Enzyme in Bezug auf *N*-Acyl-Seitenketten-Modifikationen des natürlichen Substrats, ManNAc, zu erforschen. In einem ersten Versuch wurde ManNAc durch chemisch synthetisiertes *N*-Propionylmannosamin (ManNProp) ersetzt. Resultate einer In-vitro-Analyse in einem zellfreien Leber-System zeigten durch Nutzung konventioneller Papier- und Dünnschicht-chromatographie, dass ManNProp zur entsprechenden *N*-Propionylneuraminsäure (Neu5Prop) metabolisiert wurde (Schema 7).^[163,170] Um die Biosynthese dieser neuen Sialinsäure zu beweisen, wurden Flüssig-Gas-Chromatographie und Massenspektrometrie verwendet.^[171,172] Diese Ergebnisse offenbarten, dass die Enzyme des Roseman-Warren-Biosyntheseweges promiskuitiv sind und somit den Metabolismus von nichtnatürlichen *N*-Acyl-modifizierten Mannosaminen ermöglichen – die Hauptanforderung an erfolgreiches Glykoengineering. Zudem zeigten Zellkultur- und *In-vivo*-Experimente, dass die aktivierte Neu5Prop auf Asialoglykane, als funktionelle und strukturelle Bestandteile der Zelloberfläche, transferiert wird.^[173,174]

Später wurden weitere Homologen synthetisiert, unter anderem *N*-Butanoylmannosamin (ManNBut), *N*-Isobutanoylmannosamin (ManNiBut), *N*-Pentanoylmannosamin



Schema 7. Metabolisches Glykoengineering mit *N*-Propionylmannosamin (ManNProp). Das nichtnatürliche ManNProp war die erste Substanz, welche die Promiskuität der Enzyme des Roseman-Warren-Weges offenbarte. In Zellen wird ManNProp zu *N*-Propionylneuraminsäure (Neu5Prop) umgewandelt. Neu5Prop wird mit CTP aktiviert und danach auf Zelloberflächen-Sialosiden exprimiert.

(ManNPent), *N*-Cyclopropylcarbamylmannosamin (ManNCycloProp), *N*-Crotonylmannosamin (ManNCrot) und *N*-Glykolylmannosamin (ManNGc), und deren Metabolismus zu den entsprechenden Neu5Acyl-Zuckern sowie ihr Einbau in Zelloberflächen-Sialoside nachgewiesen.^[79,172,175,176] Dafik et al. stellten *N*-Acyl-Seitenketten-verlängerte Mannosamine mit terminalen Fluor-Gruppen her, die in Zellen ebenfalls zu den entsprechenden Neu5Ac-Analoga metabolisiert werden.^[177]

N-Acyl-modifizierte Glucosamine werden auch zu nicht-natürlichen Sialinsäuren metabolisiert.^[172,178,179] In Zellen werden diese Analoga jedoch zunächst Bestandteil des großen Pools von natürlichem UDP-GlcNAc und dadurch signifikant verdünnt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *N*-Acyl-modifizierte Glucosamin-Analoga in cellula zum Teil zu Galactosamin-Analoga umgewandelt werden.^[180,181]

Im Unterschied zu *N*-Acyl-modifizierten Glucosaminen werden ManNAc-Analoga direkt zu den entsprechenden Neu5Ac-Analoga metabolisiert.^[182,183] Genauso wie Neu5Ac werden auch die nichtnatürlichen *N*-Acylneuraminsäuren mit CTP aktiviert und im Golgi-Apparat in Glykokonjugate eingefügt.^[171,172,184] Brossmer et al. zeigten die Promiskuität der STs durch Nutzung von großen, raumfüllenden, nichtnatürlichen CMP-Sialinsäuren.^[185] STs tolerieren eine Erweiterung der *N*-Acyl-Seitenketten von Sialinsäuren bis zu einer Summe von sechs Kohlenstoffatomen. Diese „Unspezifität“ der STs wurde auch für verschiedene CMP-Sialinsäure-Derivate gezeigt, die an der C5- oder C9-Position durch Azido-, Amino-, Acetamino-, Benzamido- oder Hexanoyl-Gruppen modifiziert wurden.^[185–187] Sogar Fluorophore, die zuvor mit der *N*-Acyl-Seitenkette von nichtnatürlichen Sialinsäuren konjugiert wurden, werden in zellfreien Systemen auf Glykokonjugate transferiert.^[188] Zellen sind allerdings für diese großen, raumfüllenden CMP-Sialinsäure-Analoga nicht permeabel.^[175,189]

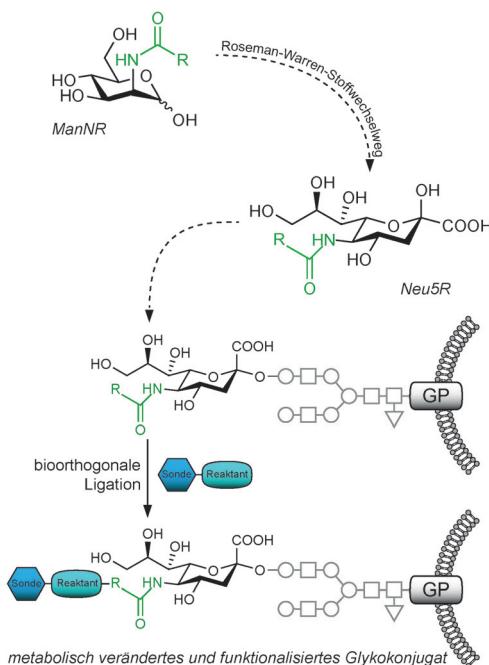
Ein weiteres Beispiel für *N*-Acyl-modifizierte Sialinsäuren ist *N*-(1-Oxohex-5-inyl)neuraminsäure (Neu5Hex). Nach Aufnahme in Zellen und nachfolgender Expression auf Zelloberflächen-Glykokonjugaten kann Neu5Hex durch die Nutzung von „Klick“-Chemie mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert werden (siehe Abschnitt 3.2). Analoga wie Neu5Hex sind vielversprechende Ausgangspunkte für zukünftige klinische und diagnostische Anwendungen.^[190]

Die Anwendbarkeit der Modifikation von *N*-Acyl-Seitenketten in Sialinsäuren auf Zelloberflächen-Glykokonjugaten wurde anhand einer Vielzahl von Zelllinien und in Tieren demonstriert.^[171,173,191–194] Diese Ergebnisse verbessern stetig unser Verständnis der biologischen Bedeutung von Sialinsäuren, die *N*-Acyl-Seitenketten-Modifikationen tragen, in Zellen und Organen und leisten somit einen wichtigen Beitrag zum Feld des metabolischen Glykoengineering.

3.2. Bioorthogonale Modifikationen

Der Forschungszweig des metabolischen Glykoengineering (MGE) mit *N*-Acyl-modifizierten Mannosaminen wurde durch eine Reihe bahnbrechender Studien von Bertozzi et al. besonders vorangebracht.^[178,192,193,195–198] Sie führten darin funktionelle Gruppen in die *N*-Acyl-Seitenkette von ManNAc-Analoga ein. Nach Behandlung von Zellen mit den entsprechenden ManNAc-Analoga werden diese funktionellen Gruppen auf Zelloberflächen-Sialinsäuren exprimiert. Die erste Verbindung dieser Art war *N*-Lävulinoylmannosamin (ManNLev), das eine Keto-Gruppe in der *N*-Acyl-Seitenkette trägt und zu *N*-Lävulinoylneuraminsäure (Neu5Lev) metabolisiert und auf Zelloberflächen-Glykokonjugaten der behandelten Zellen exprimiert wird. ManNLev und ähnliche Analoga (siehe Abschnitt 6) werden als „biologisch abstinent chemische Reporter“ bezeichnet.^[199] Chemisch orthogonal zu nativen Zelloberflächen-Komponenten ist das in ManNLev enthaltene Keton fähig, mit Aminoxy- oder Hydrazid-tragenden Sonden zu reagieren und stabile, kovalente Addukte (Oxime oder Hydrazone) zu bilden (Schema 8).^[198] Diese Strategie wurde genutzt, um Fluorophore an die modifizierten Sialinsäuren anzuheften und damit zelluläre Glykokonjugate zu visualisieren. Metaboliten mit Keto-Gruppen sind jedoch häufig innerhalb von Zellen zu finden, z. B. als Intermediate in der Glykolyse, im Citratzyklus oder in Pyridoxalphosphat. Deshalb sind Ketone keine zufriedenstellenden chemischen Reporter für spezifisches MGE der *N*-Acyl-Seitenkette von Zuckern. Außerdem wird die Anwendung durch die langsame Reaktion bei physiologischen pH-Werten begrenzt.

MGE mit bioorthogonalen Reportern wurde durch die Nutzung von Aziden, terminalen Alkenen oder Alkinen als Seitenkettenmodifikationen in *N*-Acylmannosaminen (oder *N*-Acylgalactosaminen, *N*-Acylglucosaminen und Fuc) ständig verbessert. Diese chemischen Reportergruppen sind relativ klein und kommen in lebenden Systemen nicht vor – eine Voraussetzung für effektive Bioorthogonalität. Darüber hinaus repräsentieren Azide ideale Liganden für funktionalisierte Monophosphane im Rahmen der Staudinger-Ligation und der Cycloaddition mit einem aktivierte Alkin. Die



Schema 8. Metabolisches Glykoengineering mit *N*-Acetylmannosamin-(ManNAc)-Analoga, die bioorthogonale Modifikationen tragen. *N*-Acyl-Seitenketten-modifizierte Mannosamine werden von Zellen zu den entsprechenden Sialinsäure-Analoga umgewandelt. Ein bioorthogonaler Reaktionspartner kann kovalent mit dem für biologische Reaktionen nicht verfügbaren chemischen Reporter (R) verbunden werden. Durch den Gebrauch dieser Technik können modifizierte Sialinsäuren mit bestimmten Sonden funktionalisiert werden, z.B. mit Fluorophoren.

Staudinger-Ligation kann auch dazu genutzt werden, Sonden kovalent an Azid-tragende Biomoleküle zu binden. Azide und Monophosphane reagieren kaum mit biologischen funktionellen Gruppen und können damit als bioorthogonale Reaktanten bezeichnet werden, wenngleich gezeigt wurde, dass endogene Thiole, z.B. in Glutathion, fähig sind, Azide zu den entsprechenden Aminen zu reduzieren.^[200] Sie sind bei physiologischen Temperaturen stabil und kaum toxisch.^[198,201–204] Die Staudinger-Ligation ist eine Abwandlung der klassischen Staudinger-Reduktion von Aziden unter Nutzung von Triphenylphosphin. Hierbei ist es notwendig, dass die Ester-Funktion auf einem der Aryl-Substituenten der Monophosphane ersetzt wird. Dadurch wird dem intermediären Aza-Ylid ermöglicht, eine intramolekulare Amid-Verbindung zu schaffen.^[198,199,204–207] Die Staudinger-Ligation ist eine relativ langsame Reaktion und somit ungeeignet für Experimente, bei denen z.B. Glykanmetabolismus und/oder -distribution innerhalb einer kurzen Zeitspanne visualisiert werden sollen.

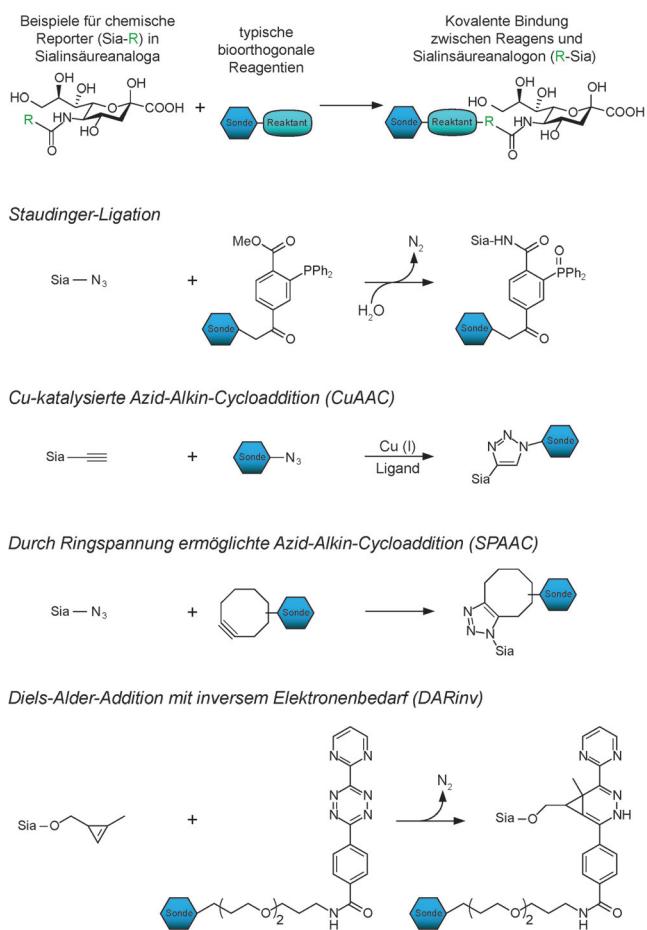
Ein anderer Ansatz, Azide in auf Zellen exprimierten, modifizierten Sialinsäuren nutzbar zu machen, ist die Cu-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC). Leider werden bei dieser Methode zytotoxische Puffer benötigt, die Cu¹ enthalten. Zur Lösung dieses Problems wurde von Finn und Mitarbeitern eine robuste und generelle Methode für das chemoselektive Markieren von Glykokonjugaten eingeführt. Der hierbei verwendete Ligand, Tris(hydroxypropyltriazol)methylamin (THPTA), eliminiert die Zytotoxizität von

Kupfer sowie dem anfallendem Natriumascorbat bei der Klick-Reaktion und verkürzt darüber hinaus die Reaktionszeit. Dadurch erhält diese Reaktion die Lebensfähigkeit der Zellen.^[208,209] In einem ähnlichen Ansatz entwickelten Wu et al. einen auf Tris(triazolylmethyl)amin basierenden Liganden für die CuAAC.^[210,211]

Kupferfreie Klick-Chemie, auch bekannt als durch Ringspannung ermöglichte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC), wurde basierend auf der 1,3-dipolaren Cycloaddition von Huisgen entwickelt.^[212] Hierbei wird die Reaktionszeit durch die Nutzung von fluorierten Cyclooctinen drastisch verkürzt. Diese Azid-Alkin-Reaktion dauert bei Raumtemperatur lediglich einige Minuten und benötigt keinen bioorthogonalen Katalysator.^[213–215]

Kürzlich wurde gezeigt, dass auch die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (DARinv) zwischen 1,2,4,5-Tetrazinen und Dienophilen mit Ringspannung, wie *trans*-Cyclooctenen, die Anforderungen an eine bioorthogonale Reaktion erfüllt. Darüber hinaus ist die Diels-Alder-Reaktion orthogonal zur Azid-Alkin-Cycloaddition. Cyclische Alkene oder kinetisch inerte Tetrazine werden jedoch als zu groß eingeschätzt, um über den Roseman-Warren-Weg metabolisiert werden zu können. Die Suche nach kleineren, für MGE geeigneten Dienophilen brachte monosubstituierte (terminale) Alkene als eine neue Klasse chemischer Reporter hervor.^[216,217] Zu diesem Zweck wurde die DARinv zwischen terminalen Alkenen und 1,2,4,5-Tetrazinen etabliert. Weil terminale Alkene nicht in biologischen Systemen vorkommen, werden sie als eine vielversprechende Reportergruppe angesehen. Es wurde gezeigt, dass ManNAc-Analoga, die ein terminales Alken in der *N*-Acyl-Seitenkette tragen, über den Roseman-Warren-Weg metabolisiert und als entsprechende modifizierte Sialinsäuren auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Die neu gebildeten Alken-tragenden Sialinsäuren können hiernach durch Nutzung von DARinv markiert werden. DARinv erfordert keine Katalyse durch toxisches Cu¹. Außerdem kann DARinv in Gegenwart von Aziden durchgeführt werden und ermöglicht so die zeitgleiche Visualisierung von zwei unterschiedlich modifizierten Monosacchariden in einer Zelle und in einem Experiment.^[216,218–221] Mithilfe von Mannosamin- und Galactosamin-Analoga sowie einer Kombination aus DARinv und SPAAC wurde gezeigt, dass es möglich ist, zwei unterschiedlich modifizierte Zucker-Reste in Glykokonjugaten zu markieren.^[216] Die unterschiedlichen bioorthogonalen Reaktionen, die heutzutage genutzt werden, um *N*-Acyl-Seitenketten-modifizierte Sialinsäuren zu funktionalisieren, sind in Schema 9 zusammengefasst.

Es besteht immer noch ein Bedarf an weiteren bioorthogonalen Reportergruppen. Funktionalisierte Cyclopropane,^[218–220,223–226] Isonitrile^[221,227] und terminale Alkene wurden eingeführt,^[216,223] die an Cycloadditionen mit Tetrazinen teilnehmen können. Reaktionspartner wie *trans*-Cycloocten, Norbornen und Bicyclononin sind abiotisch und unter zellulären Bedingungen stabil.^[228,229] Sie reagieren schnell mit elektronendefizienten Tetrazinen mittels DARinv. Ein kleines, Ringspannung enthaltendes *N*-Olefin-Cyclopropenmannosamin wurde als chemischer Reporter etabliert, der schneller als Ringspannung aufweisende Alkene oder Alkine



Schema 9. Übersicht der bioorthogonalen Reaktionen, die zur Funktionalisierung *N*-Acyl-Seitenketten-modifizierter Sialinsäuren verwendet werden können. Typische Beispiele für chemische Reporter in Sialinsäuren-Analoga und ihre bioorthogonalen Reaktionspartnern sind hier dargestellt. Bei der Staudinger-Ligation werden terminale Azide kovalent an Triarylphosphine gebunden, was zu der Bildung einer Amid-Bindung zwischen dem betroffenen Sialinsäure-Analogon und seinem Reaktionspartner führt. Bei der CuAAC wird ein Azid mit einem Alkin unter Bildung einer Triazol-Verbindung umgesetzt. Terminale Azide können auch ohne den Gebrauch von zytotoxischer Metallkatalyse funktionalisiert werden, und zwar mithilfe der SPAAC. Bei der DARinv werden terminale Dienophile, wie Alkene, Isonitrile oder Cyclopropene (wie hier gezeigt), mit 1,2,4,5-Tetrazinien verbunden. Dieses Schema wurde zum Teil aus Lit. [222] abgewandelt.

reagiert. Zusätzlich wurden Methylcyclopropene zusammen mit organischen Aziden verwendet, um mehrere Klassen von Biomolekülen gleichzeitig zu markieren.^[225]

Die Strategien für bioorthogonale Chemie wurden durch die Einführung Diazirin-haltiger ManNAc-Analoga mit unterschiedlichen Linkern zwischen Pyranose-Ring und Diazirin erweitert, z. B. *N*-Acyldiazirinmannosamin (ManNDAz). Diese Analoga werden in cellula auch über den Roseman-Warren-Weg metabolisiert und als die entsprechenden modifizierten Sialinsäuren in Glykokonjugate – sowohl in α -2,3- als auch in α -2,6-Verknüpfungen – eingefügt. Die Größe der *N*-Acyl-Seitenketten-Modifikation verhält sich hierbei invers zur metabolischen Effizienz.^[230,231] Größere Diazirin-haltige Zucker-Analoga können nicht über den Roseman-Warren-

Weg verstoffwechseln und liefern somit auch keine Diazirin-Sialinsäuren.^[232]

Die bioorthogonale „Decaging“-Strategie ermöglicht es, desacetylierte Sialinsäuren auf der Zelloberfläche zu generieren. Hierfür werden Zellen mit *N*-(Propargyloxycarbonyl)mannosamin (ManNProc) behandelt, das zur entsprechenden *N*-(Propargyloxycarbonyl)neuraminsäure (Neu5Proc) metabolisiert und in Zelloberflächen-Sialoside eingefügt wird.^[183] De-*N*-propargylierung kann durch Pd-Katalyse erreicht werden.^[233] Diese bioorthogonale Decaging-Strategie ermöglicht es, desacetylierte Neuraminsäure (Neu) auf die Oberfläche lebender Zellen zu verbringen. Neu-tragende Rezeptoren können zum Teil nicht von Neu5Ac-abhängigen Viren erkannt werden, weil die *N*-Acetyl-Gruppe der Neu5Ac häufig ein entscheidender Bindungspartner dieser Viren ist (siehe Abschnitt 4.1).

Ein weiterer Beitrag zum Feld des MGE wurde durch die Einführung C4-modifizierter ManNAc-Analoga geleistet, wie *N*-Acetyl-4-desoxymannosamin oder *N*-Acetyl-4-azido-4-desoxymannosamin (4-AzManNAc).^[234,235] 4-AzManNAc wird in Säugetierzellen zum entsprechenden C7-Azido-Neu5Acyl metabolisiert. Dadurch wird auch die C7-Position von Sialinsäuren für bioorthogonale Funktionalisierung und nachfolgende Markierung mit biophysikalischen Sonden zugänglich gemacht.

Chen und Mitarbeiter führten 9-Azidosialinsäure zur metabolischen Kennzeichnung von Sialoglykanen ein.^[236] Während die bis dahin bekannten Sialinsäure-Analoga Sialoglykane mit nur einer funktionellen Gruppe ausstatten konnten, gelang es Chen et al., zwei verschiedene Funktionalitäten, und zwar in der *N*-Acyl- und in der C9-Position, zu schaffen. Diese *N*-Acyl-modifizierten 9-Azidosialinsäure-Analoga werden in zelluläre Glykane eingefügt, und die beiden chemischen Reporter können im Anschluss für verschiedene Funktionen genutzt werden.^[237]

Zusammengefasst wurde das Feld der bioorthogonalen Ligation nach Einführung der Staudinger-Ligation und CuAAC durch die SPAAC und DARinv komplementiert.^[238,239] SPAAC und DARinv sind meist von Vorteil, da ihre Reaktionszeiten kürzer sind, sie nicht zytotoxisch sind und die kleineren Reportergruppen effektiv über den Roseman-Warren-Weg zu den entsprechenden Sialinsäuren metabolisiert und danach auf Zelloberflächen-Glykokonjugaten exprimiert werden.^[216]

3.3. Thiol-tragende Modifikationen

Nach der Behandlung von Zellen mit *N*-Thioglycolymannosamin (ManNTGc) wird ihre Glykokalyx mit *N*-Thioglycolylneuraminsäure (Neu5TGc) dekoriert. Als Teil sialyllierter Glykokonjugate beeinflusst Neu5TGc die Interaktion zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix. Des Weiteren fördert es die Differenzierung von Stammzellen. Behandelt man nichtadhärente menschliche T-Zell-Leukämiezellen mit Neu5TGc, führt dies zu spontanem Zell-Zell-Clustering, der Expression von β -Catenin und zu Veränderungen der Zellmorphologie.^[240-242]

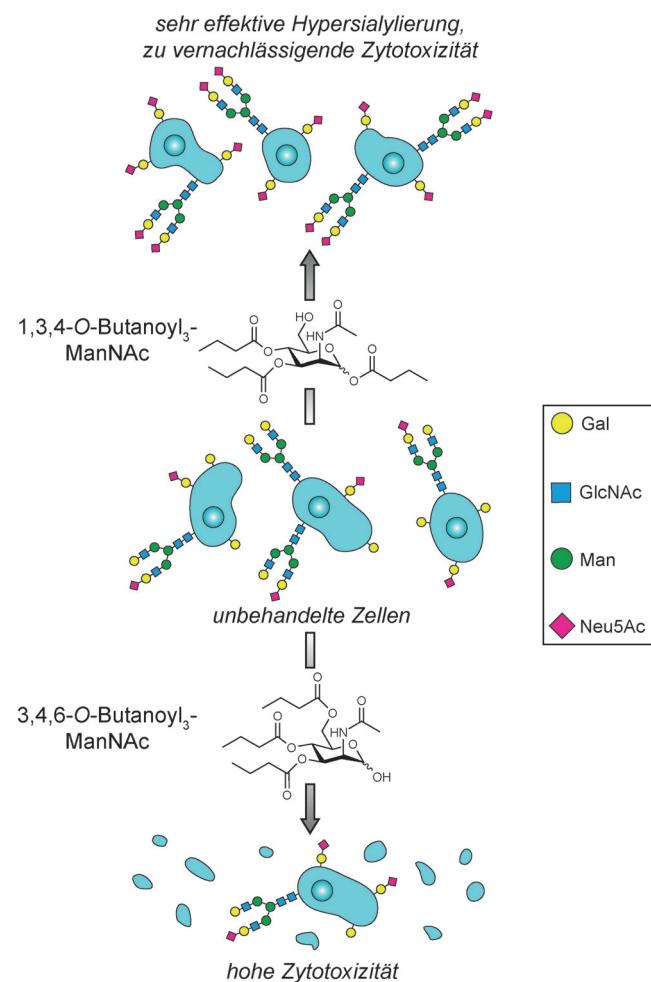
Im Unterschied zu Aziden und Diazirinen sind Thiole nicht abiotisch. Allerdings kommen Thiole nicht in der Glykokalyx von unbehandelten Zellen vor. Thioltragende Sialoside sind in der Lage, *cis*-Disulfid-Bindungen zu bilden. Darüber hinaus haben sie die Fähigkeit, Gold zu binden, was dazu genutzt werden kann, Sialoside in Zellkompartimenten zu visualisieren.^[21, 240, 243] Von diesen Ergebnissen angeregt, beschrieben Howarth und Ting ihre Befunde als „*Giving cells a new sugar-coating*“.^[244]

In einem weiteren Ansatz wurde gezeigt, dass spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kvs), die Neu5TGC exprimieren, irreversibel mit Biotin-markiertem Skorpionstoxin, das an den Kv bindet und mit Thiol-Gruppen reagiert, gehemmt werden können.^[245] Die Spaltung der hierbei gebildeten Disulfidbindungen stellt nicht nur die Funktion der Kanäle wieder her, sondern liefert der modifizierten Kv-Untereinheit auch einen Biotinrest und bietet dadurch die Möglichkeit, Wildtyp-Kv-Komplexe in Zellen zu markieren.

3.4. Aufnahme von ManNAc-Analoga und modifizierten Sialinsäuren

Aufgrund der hohen Spezifität zellulärer Monosaccharid-Transporter werden ManNAc, Neu5Ac und ihre Analoga schlecht von Zellen und Organen aufgenommen.^[246] Daher ist es vorteilhaft, bei Zellkultur- oder In-vivo-Experimenten Analoga mit geschützten Hydroxy-Gruppen (z. B. peracetylierte Analoga) zu verwenden, da diese eine erhöhte Membranpermeabilität aufweisen. Im Zytoplasma werden die schützenden Gruppen von zytoplasmatischen Esterasen abgespalten, wodurch die biologisch aktiven Monosaccharide freigesetzt werden.^[79, 157–160, 247] Die Aufnahme von nichtnatürlichen ManNAc- und Neu5Ac-Analoga, ihr Metabolismus und ihre Integration in Sialoglykokonjugate wurden in vielen verschiedenen Zelllinien gezeigt. Allerdings variiert die Effektivität der Aufnahme und Expression zwischen verschiedenen Zelllinien.^[67, 173, 184, 248, 249] Dies könnte an unterschiedlichen Expressionsspiegeln der Enzyme des Roseman-Warren-Weges liegen. Vor allem Unterschiede bei der Expression der Sialyltransferasen (STs) könnten dabei eine entscheidende Rolle spielen.

Yarema et al. veränderten die Methode der Peracetylierung, indem sie die *O*-Acetyl-Funktionen in nichtnatürlichen Monosacchariden durch kurzkettige Fettsäure-Gruppen ersetzten. Im Falle von ManNAc-Analoga führt diese Verlängerung der Seitenketten, die mit den Hydroxy-Gruppen verbunden sind, zu einer gesteigerten metabolischen Effizienz.^[160, 250, 251] Überraschenderweise variierten die Aktivität und die Zytotoxität dieser ManNAc-Analoga in Abhängigkeit von der Anzahl und Position der *O*-Hydroxy-Modifikationen.^[252–255] 3,4,6-Tri-*O*-butanoylierte ManNAc-Analoga hemmen z. B. das Wachstum der jeweiligen Zelllinien und unterdrücken die Expression von MUC1 (Schema 10). Es konnte gezeigt werden, dass einige der 3,4,6-tri-*O*-butanoylierten ManNAc-Analoga pro-apoptotisch wirken, vor allem das Keton-haltige 3,4,6-tri-*O*-butanoylierte ManNLev. Im Unterschied dazu haben 1,3,4-tri-*O*-butanoylierte ManNAc-Analoga nur geringe Auswirkungen auf die Zellvitalität und



Schema 10. Biologische Aktivitäten verschiedener butanoylierter ManNAc-Analoga. Die triacetylierten Derivate 1,3,4-O-Butanoyl₃-ManNAc und 3,4,6-O-Butanoyl₃-ManNAc zeigen auffallend unterschiedliche Bioaktivitäten. Die Behandlung von Zellen mit 1,3,4-O-Butanoyl₃-ManNAc ist durch hohe metabolische Effizienz gekennzeichnet, während die Behandlung mit 3,4,6-O-Butanoyl₃-ManNAc Apoptose induziert.

zeigen darüber hinaus eine höhere metabolische Effizienz.^[253, 254] Es sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass das Monosaccharid-Analogon 3,4,6-Tri-*O*-butanoyl-GlcNAc die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF_κB reduziert. Die Behandlung von IL-1 β -stimulierten Chondrozyten mit diesem Hexosamin-Analogon resultierte in einer erhöhten Expression von Molekülen der extrazellulären Matrix (EZM) und einer entsprechenden Vermehrung Knorpel-spezifischer EZM. Das 1,3,4-Tri-*O*-butanoyl-GlcNAc-Derivat hatte keine Wirkung auf die EZM-Produktion.^[256, 257]

4. Anwendungsbeispiele für nichtnatürliche Sialinsäuren mit aliphatischen N-Acyl-Seitenketten-Modifikationen

Metabolisches Glykoengineering mit nichtnatürlichen Mannosaminen beeinflusst die Verhaltensweise von Zellen und führt deswegen zu einer Vielzahl von biologischen und

biomedizinischen Konsequenzen. MGE stützt die Hypothese, dass Glykane eine „dritte Sprache des Lebens“ seien.^[68, 173, 184, 198, 199, 258]

Chemisch gesehen sind Zellen mit modifizierten Sialinsäuren, die aliphatische *N*-Acyl-Seitenketten tragen, stärker hydrophob als Kontrollzellen. Diese Modifikation verändert somit die biologischen Merkmale der behandelten Zellen. Die meisten ManNAc-Analoga mit aliphatischen Seitenketten-Modifikationen weisen lediglich eine geringe Zytotoxizität auf. Deshalb können Zellen mit relativ hohen Konzentrationen dieser Zucker-Analoga behandelt werden, was wiederum zum Austausch eines großen Teils des zellulären Neu5Ac durch die jeweilige nichtnatürliche Sialinsäure führt. Da eine Vielzahl an unterschiedlichen biologischen Prozessen durch einen derartigen Austausch beeinflusst wird, ist MGE mit ManNAc-Analoga, die aliphatische *N*-Acyl-Seitenketten-Modifikationen aufweisen, ein nützliches Mittel, um Sialinsäure-abhängige Zellfunktionen im Detail zu erforschen.

Abschnitt 4 beschreibt Möglichkeiten, wie MGE mit aliphatischen *N*-Acyl-Seitenketten-modifizierten ManNAc-Analoga dazu verwendet werden kann, verschiedene biologische Prozesse zu modulieren und zu erforschen, z.B. virale und bakterielle Infektionen, die Pathophysiologie und das Verhalten von Tumorzellen, Zelladhäsion, neuronales Wachstum und Differenzierung sowie Vaskularisierung.

4.1. Aliphatische Modifikationen und virale Infektionen

Ein bedeutender Schritt bei viralen Infektionen ist die Erkennung der entsprechenden zellulären Rezeptoren, gefolgt von der stabilen Bindung an die Wirtzellen. Neu5Ac ist eine essenzielle Erkennungsstruktur für verschiedene Viren, z.B. für Influenza A und C, das Newcastle-Disease-Virus, für *Reoviridae*, das Encephalomyocarditis-Virus und für *Polyomaviridae*.^[259] Die Bindung von Neu5Ac an virale Proteine ist ein gut charakterisiertes Phänomen.^[2, 68, 260–267]

Die Tatsache, dass die *N*-Acetyl-Seitenkette beim Zustandekommen der Bindung zwischen Neu5Ac und Influenza-Hämaggglutinin von besonderer Bedeutung ist, wurde mithilfe von Sialinsäure-Analoga gezeigt, bei denen die *N*-Acetyl-Gruppe durch eine Hydroxy-, Azido- oder Amino-Funktion ersetzt wurde.^[268]

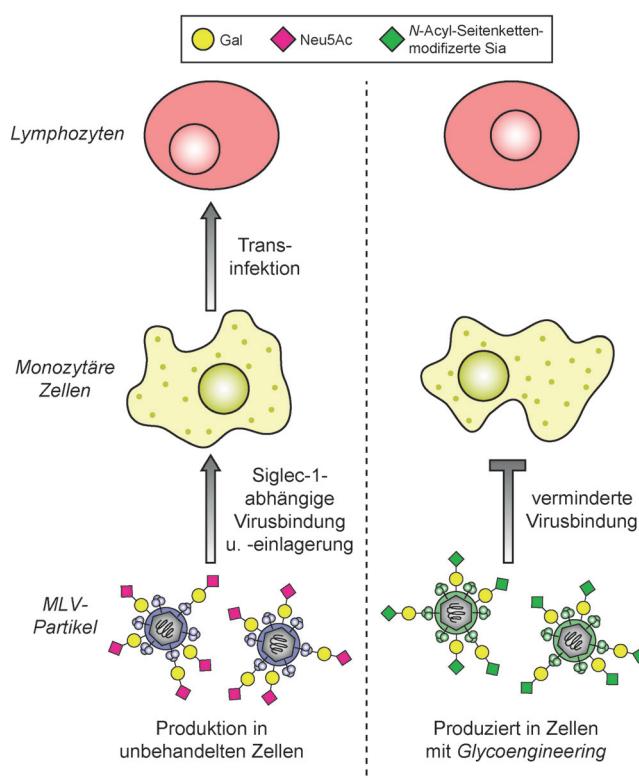
Die Familie der *Polyomaviridae* erkennt Sialinsäuren in verschiedenen Gangliosiden auf der Wirtzelloberfläche mithilfe des kapsulären viralen Proteins 1 (VP1). Bei der Infektion durch den murinen Polyomavirus wurde Neu5Ac in α-Verknüpfung mit Gal als eine essenzielle Rezeptorkomponente identifiziert.^[269–271] Die Infektiosität des B-lymphotroischen Polyomavirus (LPV) und des humanen Polyomavirus 1 (BKV) wurde nach Behandlung von Zellen mit Sialidase um ca. 80 % reduziert.^[272, 273] Behandelt man Lymphomzellen mit ManNProp, wird die Infektionsrate durch LPV stark reduziert. Der Gebrauch von ManNBut, ManNPent und ManNHex verringert ebenfalls die Infektiosität.^[184, 274] Überraschenderweise wird die Aufnahme von BKV nach Vorbehandlung der Zellen mit ManNProp drastisch erhöht. Dieser Effekt tritt etwas geringer auch nach Anwendung von ManNBut auf. Eine Vorbehandlung mit ManNPent macht die

Zellen jedoch resistent gegen die BKV-Infektion.^[184] Die als Sialidase-resistant beschriebene Infektion durch den nah verwandten Simian Virus 40 ist auch durch MGE mit ManNAc-Analoga unbeeinflussbar. Zusammengefasst zeigen diese Befunde die bedeutende Rolle der *N*-Acyl-Seitenkette der Sialinsäure bei Infektion durch *Polyomaviridae*. Es wurde postuliert, dass eine Verlängerung der *N*-Acyl-Seitenkette der Sialinsäure zu einer Konformationsänderung in der Sialinsäure-VP1-Interaktion führt.^[270] Diese Interpretation wurde durch empirische Molekülmechanik-Energieberechnungen bestärkt.^[274] In allen Komplexen aus *N*-Acyl-Seitenketten-verlängerten Sialinsäuren und VP1 scheint die Gibbs-Energie (ΔG) um ca. 20 kcal mol⁻¹ gegenüber dem Neu5Ac-VP1-Komplex herabgesetzt zu sein. Es wurde daher geschätzt, dass die Affinität von VP1 für *N*-Acyl-Seitenketten-verlängerte Sialinsäuren um einige Größenordnungen geringer ist als für die physiologische Neu5Ac.

Das Influenza-Virus erkennt sialylierte Glykokonjugate mithilfe des kapsulären Proteins Hämaggglutinin.^[275, 276] Die Fähigkeit von verschiedenen nichtnatürlichen Sialosiden, Hämaggglutinin zu binden und somit die Hämaggglutinin-Bindung an Erythrozyten zu unterbinden, wurde bereits detailliert untersucht.^[277–280] Substanzen ganz ohne *N*-Acetyl-Gruppe oder solche, die *N*-Acyl-Modifikationen tragen, sind schwächere Bindungspartner für Hämaggglutinin. Vermutlich stellt die *N*-Acetyl-Gruppe von Neu5Ac eine bedeutende Determinante für die Interaktion dar.^[268, 281] Elongation der *N*-Acyl-Seitenkette von Sialinsäuren in Zellen mithilfe von MGE und auch eine Vorbehandlung der Zellen mit ManN-Prop, ManNBut oder ManNPent hemmten die Infektion durch das Influenza-A-Virus drastisch.^[282] Molekülmodellstudien lassen vermuten, dass die erhöhte Lipophilie der *N*-Acyl-Seitenketten-verlängerten Sialinsäuren zu einer Erhöhung der totalen Energie der zu bildenden Sialinsäure-Hämaggglutinin-Komplexe führt (um über 20 kcal mol⁻¹), woraus folgerichtig eine stark reduzierte Bindungsaffinität resultiert.^[282]

MGE ist eine nützliche Strategie, um Neu5Ac-abhängige Viren und deren Interaktionen mit zellulären Rezeptoren zu untersuchen. Im Fall von *Polyomaviridae* und dem Influenza-A-Virus scheint die intakte *N*-Acetyl-Gruppe in Neu5Ac eine Voraussetzung für die Bindung zu sein.

Siglec-1, ein Mitglied der Familie der Sialinsäure-bindenden Immunglobulin-artigen Lektine (Siglecs), und das Sialyllactose-haltige Gangliosid GM3, das wiederum einen Teil der viralen Membran repräsentiert, sind entscheidende Determinanten für die Infektion von aus Monozyten entwickelten Zellen (monocyte-derived cells, MDCs) mit Partikeln retroviralen Ursprungs und darüber hinaus für die MDC-vermittelte *trans*-Infektion von T-Zellen. Hierbei werden retrovirale Partikel, z.B. aus dem humanen Immundefizienzvirus 1 (HIV-1) oder dem murinen Leukämie-Virus (MLV),^[283, 284] von den wenig oder nicht permissiven MDCs gebunden. Die MDCs halten das Virus eine gewisse Zeit lang fest und vermitteln dann eine virale Transmission auf benachbarte permissive T-Zellen, was die virale Infektion verstärkt und ihre Verteilung fördert.^[285] Die Bedeutung der *N*-Acyl-Seitenkette der Sialinsäure für Siglec1-abhängige MDC-Infektion, Lagerung von Viruspartikeln und T-Zellen-*trans*-



Schema 11. Die Rolle von Sialinsäure und Glykoengineering bei der retroviralen *trans*-Infektion. Siglec-1, das auf MDCs, z. B. primären Makrophagen, exprimiert wird, bindet bestimmte Retroviren und vermittelt ihren Transfer zu proliferierenden Lymphozyten. Diese *trans*-Infektion wurde mithilfe von MLV-Partikeln untersucht. Wenn MDCs mit solchen MLV-Partikeln inkubiert werden, binden sie diese, lagern sie zum Teil ein und vermitteln darüber hinaus die *trans*-Infektion von Target-Lymphozyten mit diesen Partikeln – alles auf Siglec-1-abhängige Art und Weise. MLV-Partikel, die *N*-Isobutanoyl-, *N*-Glykolyl oder *N*-Pantanoylsialinsäure exprimieren, werden schlechter Siglec-1-abhängig gebunden. Als Konsequenz daraus wird die *trans*-Infektion stark gehemmt.

Infektion wurde mithilfe von „glykoengineerten“ MLV-Partikeln aus Zellen, die mit verschiedenen ManNAc-Analoga vorbehandelt wurden, verdeutlicht (Schema 11).^[286] *N*-Butanoyl-, *N*-Isobutanoyl-, *N*-Glykolyl- und *N*-Pantanoyl-Seitenketten führten zu einer Reduktion der Bindung von Viruspartikeln um ca. 92 % und einer Hemmung der *trans*-Infektion auf T-Zellen um ca. 80 %, wohingegen *N*-Propanoyl- oder *N*-Cyclopropylcarbamoyl-Modifikationen keine Wirkung hatten.

4.2. Aliphatische Modifikationen und bakterielle Infektionen

Nach dem erstmaligen Nachweis als Komponente der homopolymeren, α -2,8-verknüpften polysialylierten (PolySia-)Kapsel im Kulturfiltrat des neuroinvasiven *E. coli* K1 wurde Neu5Ac in vielen bakteriellen Spezies gefunden, z. B. in den Kapseln von *Haemophilus influenzae*, *Pasteurella multocida*, *Neisseria meningitidis* Serogruppen B und C, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus agalactiae*,^[287,288] *Moraxella nonliquefaciens*^[289] und *Mannheimia haemolytica*.^[66,290] Besonders α -2,8-

verknüpfte PolySia-Kapseln sind beim Menschen nur wenig immunogen.^[291]

Pathogene Bakterien nutzen Sialinsäuren, um der Immunüberwachung zu entgehen, und können dadurch ihren Wirt kolonisieren und Erkrankungen in Säugetieren verursachen.^[292] Aus diesem Grund war es wichtig, Bakterien als ein mögliches neues Ziel für MGE mit *N*-Acyl-Seitenketten-modifizierten Mannosaminen zu erforschen, nachdem diese Methode in Säugetieren etabliert worden war. Bakterien können sich Neu5Ac auf zwei Wegen verschaffen: entweder durch De-novo-Biosynthese oder durch Aufnahme aus dem Wirtumfeld.^[292,293] Die Biosynthese-Maschinerie von Bakterien toleriert noch längere *N*-Acyl-Seitenketten-Modifikationen in Mannosaminen als die von Säugetieren.^[194] Die entsprechenden nichtnatürlichen Sialinsäuren werden in *O*-Glykanen exprimiert, z. B. in Lipopolysacchariden (LPSs). Es ist wahrscheinlich, dass viele relevante pathophysiologische Eigenschaften von Bakterien, z. B. Virulenz, Adhäsion und Protektion vor dem Wirtimmunsystem, durch Anwendung von MGE beeinflusst werden können.^[294]

Für das Gram-negative Bakterium *Haemophilus ducreyi* wurde gezeigt, dass es dazu fähig ist, synthetische Neu5Ac-Analoga aufzunehmen und zu metabolisieren, jedoch nicht die entsprechenden ManNAc-Vorstufen.^[295] Offensichtlich kann *H. ducreyi* Neu5Ac nicht de novo synthetisieren, sondern nimmt es aus seiner Umgebung auf.^[296-298] Meist durch sexuelle Übertragung verursachen Infektionen mit *H. ducreyi* das äußerst schmerzhafte Ulcus molle, eine Ulzeration, die zusätzlich das Risiko der Übertragung von HIV deutlich erhöht.^[299] Das LPS von *H. ducreyi* ist ein wichtiger Virulenzfaktor und ist an der Adhäsion dieser Bakterien an Fibroblasten und Keratinozyten beteiligt.^[300,301] LPS auf der Zelloberfläche von *H. ducreyi* enthält typischerweise hochgradig sialylierte *N*-Acetyllactosamin-Einheiten.^[302,303] Es wird angenommen, dass *H. ducreyi* diese Sialyl-*N*-Acetyllactosamin-Einheiten dafür nutzt, um Wirtzell-Glykokonjugate nachzuahmen und so der Immunabwehr zu entgehen.^[304] Durch MGE mit aliphatischen *N*-Acyl-Seitenketten-modifizierten Neu5Ac-Analoga können modifizierte Sialinsäuren in *H. ducreyi*-LPS eingefügt werden.^[194] Der Gebrauch von Analoga mit längeren *N*-Acyl-Gruppen verringert die Sialylierung von *H. ducreyi*-LPS. Vorbehandlung mit *N*-Octanoylsialinsäure hebt die Sialylierung von LPS vollständig auf.

Wie oben beschrieben, exprimieren verschiedene pathogene Bakterien, z. B. *E. coli* K1 und *N. meningitidis* Gp. B, kapsuläres, α -2,8-verknüpftes PolySia auf ihren Zelloberflächen, das die eigene NCAM-Polysialylierung von Wirtzellen nachahmt. Die neurovirulenten kapsulären PolySia-Ketten dieser Bakterien sind strukturell und auch aus immunologischer Sicht identisch zu den α -2,8-verknüpften PolySia-Ketten, die in Säugetierzellen kovalent an NCAMs gebunden sind. Da sie also „selbsterkennende“ Strukturen exprimieren, gibt es keine wirksamen Impfstoffe gegen pathogene Bakterien, die α -2,8-verknüpfte PolySia-Kapseln tragen.^[66] Diese Kapseln schützen die Bakterien vor der Immunüberwachung und spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Durchquerung der Blut-Hirn-Schranke. Die Bakterien können dadurch die Meningen kolonisieren und eine spinale Meningitis verursachen, eine Erkrankung, die besonders bei Neugeborenen

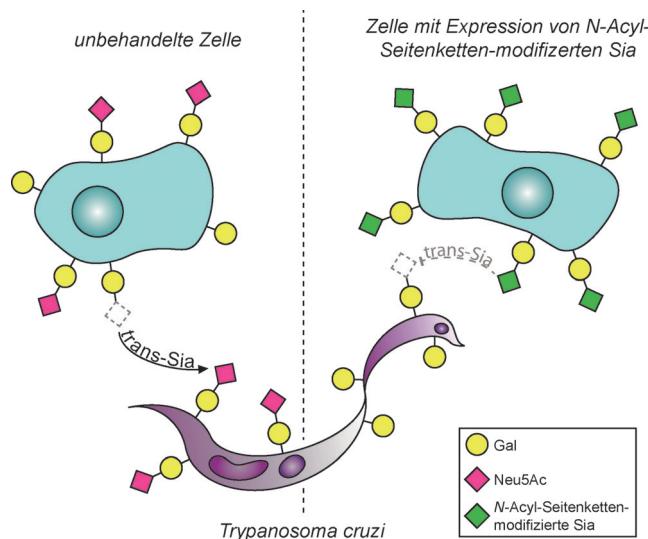
und Säuglingen gefürchtet ist.^[305,306] Folgerichtig zeigen Bakterien, die PolySia-Kapseln exprimieren, oft einen Neurotropismus,^[*] der im Zusammenhang mit der Pathogenese von Erkrankungen steht, die durch derartige Erreger ausgelöst werden. *Neisseria meningitidis* der Serogruppe C umgibt sich mit einer homopolymeren Kapsel aus intern α -2,9-verknüpfter PolySia,^[307] die stark immunogen wirkt.^[308] Daher gibt es effektive Impfstoffe gegen diese Stämme.^[309] Interessanterweise sind Bakterien, die alternierende α -2,8/ α -2,9-Neu5Ac-Einheiten exprimieren (wie *E. coli* K92),^[310] weniger immunogen als solche, die homopolymere α -2,9-Neu5Ac-Kapseln exprimieren. α -2,8-Verknüpfte Neu5Ac-Einheiten, wie sie z.B. von *N. meningitidis* der Serogruppe B,^[66,307] *E. coli* K1,^[311] *Moraxella nonliquefaciens*^[289] oder *Mannheimia haemolytica*^[312] exprimiert werden, sind beim Menschen im Vergleich am wenigsten immunogen.^[291] Die Antigenität von α -2,8-verknüpfter PolySia kann jedoch erhöht werden, indem man eine chemische De-*N*-acetylierung der Neu5Ac-Einheiten durchführt oder die *N*-Actetyl-Gruppen durch *N*-Propionyl-Gruppen austauscht, bevor man PolySia mit Teta-nustoxin konjugiert.^[313-315] Wenn man Mäuse mit diesen synthetischen PolySia-Glykokonjugaten impft, produzieren die Tiere große Mengen bakterizider Antikörper.^[316-318] In einem anderen Experiment konnte die Immunogenität gegen *N. meningitidis* aus der Serogruppe B durch das Hinzufügen von *N*-Glykolyl-, *N*-Propyl-, *N*-Propionyl- oder *N*-Butanoyl-Analoga zu Trisaccharidfragmenten der polysialylierten *O*-Antigene erhöht werden.^[319,320]

4.3. Aliphatische Modifikationen und die Infektion mit *Trypanosoma cruzi*

Eine Infektion durch den Parasiten *Trypanosoma cruzi* kann die Chagas-Krankheit hervorrufen, eine schwere, in Lateinamerika epidemische Erkrankung. Neben anderen Symptomen treten in der akuten Phase der Krankheit Fieber, entzündliche Knötchen oder Geschwüre sowie Hepato- und Splenomegalie auf. Die Chagas-Krankheit chronifiziert oft und greift dann typischerweise das zentrale Nervensystem, den Gastrointestinaltrakt und das Herz an, ruft Schlafstörungen hervor und kann letztlich zum Koma oder sogar zum Tod führen.^[321] Eine wichtige Erkenntnis, die bei der Erforschung von *T. cruzi* gewonnen wurde, ist, dass sich dieser Parasit Neu5Ac von Wirtzell-Sialoglykokonjugaten zu eignem macht und zwar mithilfe der so genannten *trans*-Sialidase. Die *trans*-Sialidase wirkt dabei als Enzym und als Bindungsprotein zugleich.^[77,322,323] Sie ist ein Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-verankertes Enzym, das den Neu5Ac-Transfer von Wirt-Glykokonjugaten auf Galactosyl-Einheiten von Mucinen der Parasiten-Zelloberfläche katalysiert. Durch Sialylierung der Mucine kann *T. cruzi* der Erkennung durch das Wirtimmunsystem entgehen.^[325] Während der Infektion wird die *trans*-Sialidase von der Parasitenoberfläche in die Milz, den Thymus und die Peripheren Ganglien abgegeben und kann so in den Blutkreislauf gelangen.^[326-328] Freie *trans*-Sialidase kann Thrombozyten desialylieren und dadurch eine Thrombozytopenie hervorrufen.^[328] Des Weiteren kann sie die Sialylierung von CD45-Isoformen auf Lymphozyten be-

einflussen.^[324] Patienten, die an der Chagas-Krankheit leiden, haben häufig kardiale Symptome, wie Erregungsleitungsstörungen, Herzrhythmusstörungen oder Herzinsuffizienz.^[329] Es gibt Anzeichen dafür, dass diese Symptome zum Teil durch fehlerhafte Sialylierung von kardialen Kanalproteinen verursacht werden können, die wiederum durch *trans*-Sialidase-Aktivität während der *T. cruzi*-Infektion hervorgerufen wird.^[330] Jüngst wurde die *trans*-Sialidase wegen ihrer neuropathologischen Bedeutung bei der Chagas-Krankheit als ein „aus Parasiten stammender neurotrophischer Faktor“ bezeichnet.^[331]

Nichtnatürliche Sialinsäuren können die Aktivität der *trans*-Sialidase hemmen und somit die Infektiosität von *T. cruzi* reduzieren. Für verschiedene Sialinsäure-Analoga wurde gezeigt, dass sie als potente *trans*-Sialidase-Inhibitoren wirken.^[327,332,333] Durch MGE mit *N*-Acyl-Seitenketten-verlängerten ManNAc-Analoga können Zellen resisternter gegen die Infektion durch *T. cruzi* gemacht werden (Schema 12).^[334] Hemmung der *trans*-Sialidase durch MGE ist ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung neuer Medikamente gegen die Chagas-Krankheit.



Schema 12. Hemmung der *trans*-Sialidase (*trans*-Sia) durch *N*-Acyl-Seitenketten modifizierte Sialinsäuren. Weil er keine Möglichkeit zur endogenen Biosynthese von Sialinsäure hat, entnimmt der Parasit *T. cruzi* Sialinsäure-Einheiten aus Wirt-Sialoglykokonjugaten durch die einzigartige *trans*-Sia. *trans*-Sia überträgt Neu5Ac aus Wirt-Glykokonjugaten auf Galactosylreste von Mucinen auf der Parasitenzelloberfläche. Die Infektiosität von *T. cruzi* und die Ausprägung der Symptome der Chagas-Krankheit sind eng mit der *trans*-Sia-Aktivität verbunden. Zellen, die durch MGE mit *N*-Acyl-Seitenketten-elongierten ManNAc-Analoga modifiziert wurden, erwiesen sich als resisternter gegen *T. cruzi*-Infektionen, wahrscheinlich weil die *trans*-Sia durch die entstandenen *N*-Acyl-Seitenketten-modifizierten Sialinsäuren inhibiert wurde.

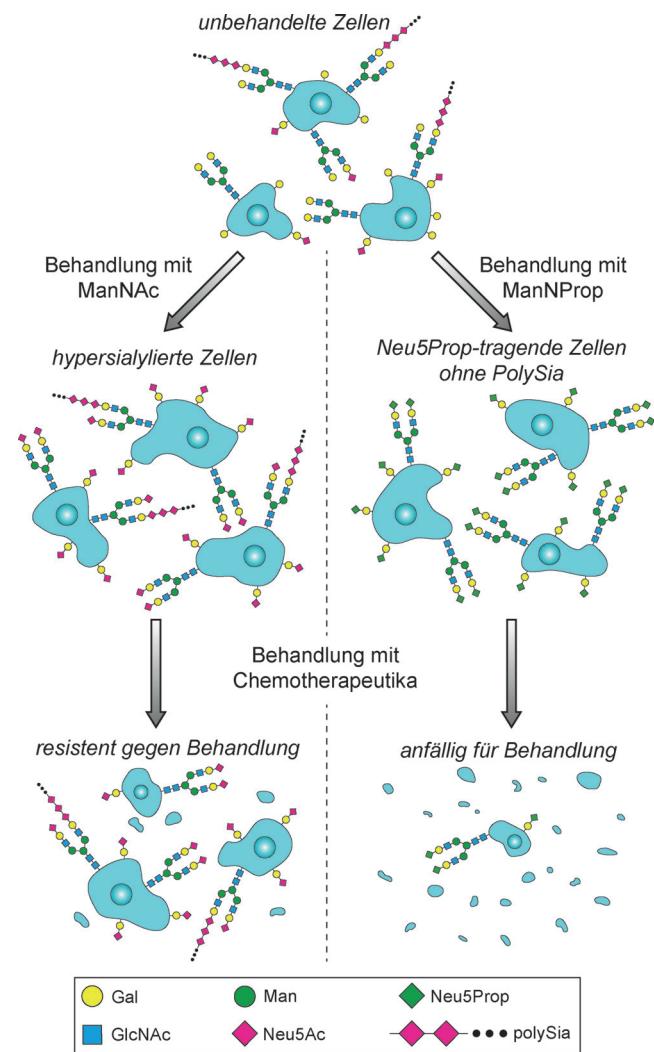
[*] Neurotropismus bedeutet in der Virologie/Mikrobiologie, dass Erreger besonders häufig das Nervensystem infizieren. Dafür ist die Fähigkeit der Erreger, die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren, von integraler Bedeutung.

4.4. Glykoengineering in der Tumoriobiologie

Maligne Tumoren müssen ein gewisses Maß an Proliferation, Entzündung und Angiogenese aufrechterhalten, um sich „erfolgreich“ zu entwickeln und in andere Gewebe einwandern zu können. Deshalb ist die Interaktion zwischen Tumorzellen und der extrazellulären Matrix von großer Bedeutung. Glykokonjugate sind dafür bekannt, eine integrale Rolle in diesen zellulären Prozessen und Interaktionen zu spielen. Viele Tumorzellen weisen eine Hypersialylierung und veränderte Sialylierungsmuster auf ihrer Zelloberfläche auf. Es wird vermutet, dass sie sich dadurch der Immunüberwachung entziehen.^[131, 335, 336] Modifikation von Sialinsäuren in Tumorzellen mithilfe von MGE beeinflusst die Biologie der Tumoren auf vielfältige Art und Weise.

Ganglioside sind per definitionem sialylierte Glycosphingolipide. Manche von ihnen sind besonders in malignen Tumoren hochgradig exprimiert, und es wird angenommen, dass sie eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese spielen. Einige Ganglioside wurden als mögliche Ziele für eine Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern identifiziert, da sie fast ausschließlich auf der Zelloberfläche von Tumoren exprimiert werden.^[337] Leider konnte nur eine schwache Immunantwort gegen GD3 generiert werden, das Ganglosid, das überwiegend auf Melanomzellen vorkommt,^[248, 338, 339] und auch gegen das von vielen Tumoren exprimierte GM3 wurde nur eine schwache Reaktion beobachtet.^[337, 340, 341] Überraschenderweise waren Studien zur Modulierung der Immunantwort gegen GD3 und seine natürliche Vorstufe GM3 durch MGE erfolgreich. Nach Vorbehandlung der jeweiligen Tumorzellen mit ManNAc-Analoga war die Immunogenität beider aus diesen Zellen gewonnener Ganglioside erhöht. *N*-Propionylierte und *N*-butanoylierte Konjugate generierten eine effektive Immunantwort gegen GD3. GM3-Proteinkonjugate, die nach einer Vorbehandlung mit *N*-Phenylacetylmannosamin (ManNPac) gebildet wurden, konnten genutzt werden, um eine Antikörperreaktion gegen GM3 zu generieren.^[176, 342, 343] Proteinkonjugate mit Gangliosiden, die zuvor durch MGE modifiziert wurden, sind nicht nur nützlich, um Antikörper für immunhistologische Studien zu generieren, sondern auch, weil sie das Potential zur Entwicklung von Antitumor-Impfstoffen haben. Bei der Anwendung dieses *In-vitro*-Modells an Tumor-tragenden Mäusen konnten das Wachstum und auch die Metastasierungsrate von Tumoren deutlich reduziert werden.^[344]

PolySia erfüllt nicht nur entscheidende Funktionen während der Entwicklung in normalen Zellen und Geweben, sondern ist auch ein wichtiges Tumor-assoziiertes Antigen, das häufig in der Tumormetastasierung involviert ist.^[66, 345–350] Da PolySia kaum im gesunden Menschen vorkommt, mit Ausnahme von ausgewählten Regionen des Gehirns, die eine persistente Expression aufweisen,^[118] ist die Entwicklung von Antikörpern gegen dieses Epitop ein vielversprechendes und relevantes Gebiet für die Krebsforschung. Im Unterschied zum physiologischen PolySia-Glykan sind *N*-propionylierte und *N*-butanoylierte PolySia-Glykane stärker antigen.^[313, 351] Gegen Leukämie- oder Myelomzellen, die zuvor mit ManN-Prop behandelt wurden, werden Antikörper generiert, die *N*-propionylierte PolySia als Zielstruktur erkennen.^[352, 353] Diese



Schema 13. Polysialinsäure (PolySia) und die *N*-Acyl-Seitenkette der Sialinsäure spielen eine wichtige Rollen bei Resistenz gegen Chemotherapeutika. Hypersialylierte Zellen, die zuvor mit ManNAc behandelt wurden, sind resistenter gegen verschiedene Chemotherapeutika, vor allem gegen 5-Fluoracil. Im Unterschied dazu reagieren Zellen, die mit ManNProp behandelt wurden, stärker auf die Therapie mit Chemotherapeutika. Diese Befunde könnten im Zusammenhang mit dem Verlust von PolySia in Neu5Prop-exprimierenden Zellen stehen.

Antikörper können Apoptose in den jeweiligen Tumorzellen induzieren und unterstützen die Tumorklyse. Dieses Beispiel zeigt einmal mehr eindrücklich Synergien und Möglichkeiten der Kombination von MGE mit Immuntherapie auf.

Experimentelle Hypersialylierung von Tumorzellen, wie sie z.B. durch Vorbehandlung mit ManNAc erreicht werden kann, macht derartige Zellen resistenter gegen Bestrahlung und verschiedenste Chemotherapeutika (Schema 13).^[354] MGE mit ManNProp und, mehr noch, mit ManNPent führt in behandelten Neuroblastomzellen zu reduzierter Zelloberflächenhypersialylierung und hemmt die Expression von PolySia durch diese Zellen vollständig.^[355] Derartig behandelte Neuroblastomzellen, die keine Polysialylierung aufweisen, zeigen auch eine erhöhte Empfindlichkeit gegen Bestrahlung und Chemotherapeutika. Diese Befunde unterstreichen die Be-

deutung der PolySia für die potentielle Inhibition der Tumorphysion.

4.5. Aliphatische Modifikationen und Wachstum und Differenzierung

MGE mit *N*-Acyl-Seitenketten-modifizierten ManNAc-Analoga in neuronalen Zellkulturen wurde zuerst bei Kleinhirn-Mikroexplantaten aus Ratten angewendet. Nach der Behandlung solcher Explantate mit ManNProp fand sich eine erhöhte Anzahl an frühen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen. Der Grund hierfür war anscheinend keine gesteigerte Proliferation, sondern eher eine verlangsamte Differenzierung der Vorläuferzellen.^[356]

Es wurde gezeigt, dass die Anwendung von ManNProp in Oligodendrozytenkulturen die Anzahl an calciumabhängigen Aktionspotentialen in diesen Zellen erhöhte. Dies lässt darauf schließen, dass MGE in die zelluläre Signaltransduktion des zentralen Nervensystems eingreift.^[357]

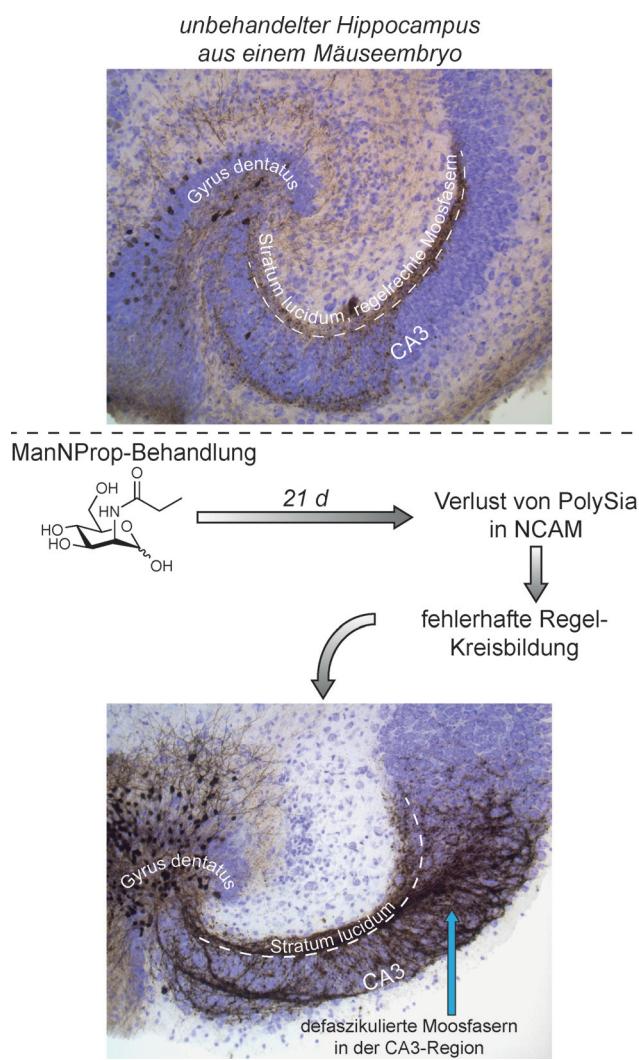
Spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kvs) sind entscheidende Determinanten für die Kontrolle und Modulation der Aktionspotential-Repolarisierung in Neuronen sowie in Kardiomyozyten und quergestreiften Skelettmuskelzellen. Neuronale Kv-Ionenkanäle haben typischerweise zwei sialisierte *N*-Glykane.^[358–360] Die Entfernung dieser sialylierten *N*-Glykane führt zu verminderter Aktivierungs-, Inaktivierungs- und Desaktivierungskinetik der Ionenströme.^[359] Die Sialinsäuren in diesen *N*-Glykanen können durch MGE moduliert werden. Ein Ersatz der *N*-Acetyl-Seitenkette durch *N*-Propionyl- oder *N*-Pentanoyl-Gruppen vermindert jeweils die Rate sowohl der Aktivierung als auch der Inaktivierung.^[360] Folgerichtig scheint die *N*-Acetyl-Seitenkette von Neu5Ac auf bedeutende Art und Weise die biologischen Merkmale der Kv-spannungsabhängigen Ionenkanäle mitzubestimmen.

Die Möglichkeit, mithilfe von MGE neuronale Zellen zu stimulieren, wurde umfassend erforscht. Es folgen nun einige Beispiele, die verdeutlichen, wie ManNProp spezifische neuronale Zelfunktionen modulieren kann.

Es wurde gezeigt, dass die Behandlung neuronaler Zellen mit ManNProp Neuritenwachstum fördert, was als In-vitro-Modell für axonales Wachstum angesehen wird.^[361] Dazu passend konnte durch 2D-Gelektrophorese und Proteomanalysen gezeigt werden, dass ManNProp die Expression verschiedener Proteine reguliert, die in Neuritenwachstum involviert sind.^[362] Nach der Behandlung von PC12-Zellen mit ManNProp werden die durch extrazelluläre Signale regulierten Kinasen 1 und 2 (erk1/2) durch Phosphorylierung aktiviert und in den Zellkern transportiert. Daraus lässt sich folgern, dass der Neu5Ac-Metabolismus an der Differenzierung von neuronalen Zellen beteiligt ist. Diese Hypothese wird durch Befunde gestützt, die zeigen, dass neuronale Zellen, denen es an ausreichender Neu5Ac-De-novo-Biosynthese mangelt, erhöhtes Neuritenwachstum aufweisen.^[363]

Polysialyliertes NCAM (Schema 2) ist entscheidend an neuronalem Wachstum und neuronaler Differenzierung beteiligt,^[363] und die Aktivität der Polysialyltransferase ST8Sia II ist ein entscheidender Parameter für Neuritenwachstum.^[364] Wegen seiner geringen Zytotoxizität können

relativ hohe Konzentrationen von ManNProp bei Zellkultur- und In-vivo-Experimenten verwendet werden. Eine Langzeitbehandlung von Ratten mit ManNProp hat keinen Einfluss auf die Vitalität der Tiere.^[365] Allerdings mangelt es immer noch an detaillierten toxikologischen Studien für *N*-Acetyl-Seitenketten-modifizierte ManNAc-Analoga. Wie in Abschnitt 4.4 beschrieben, reduziert ManNProp-Behandlung die Polysialylierung von NCAM, wahrscheinlich über Inhibition der ST8Sia II.^[365,366] MGE kann als gute Grundlage für In-vivo-Experimente der PolySia-Hemmung gesehen werden, denn es hat Vorteile gegenüber anderen Methoden, wie dem Züchten von Polysialyltransferasen-Knock-out-Mäusen. Es wurde gezeigt, dass die Inhibition der Polysialylierung von NCAM durch ManNProp eine aberrante Grenzbildung und fehlerhaftes Moosfaserwachstum im Hippocampus neugebo-



Schema 14. Polysialyliertes NCAM spielt eine wichtige Rolle für Regelkreise im Hippocampus. In histologischen Schnitten unbehandelter Mäuse konvergieren die Moosfasern typischerweise im Stratum lucidum des Hippocampus. Eine 21-tägige Behandlung neu geborener Mäuse mit ManNProp führte zu einem Verlust an PolySia-NCAM und verursachte in der Folge eine fehlerhafte Regelkreisformation im Hippocampus. Die Moosfasern in Neu5Prop-exprimierenden Tieren waren weniger gebündelt und drangen bis in die Cornu-ammonis-Region 3 (CA3) ein. Ein Teil dieses Schemas ist aus Lit. [367] abgeleitet.^[367]

rener Mäuse induziert (Schema 14).^[367] Anscheinend ist die genaue homöostatische Regulation der Menge an exprimierter PolySia während bestimmter Phasen der Entwicklung besonders wichtig für korrekte Synapsenbildung und die Bildung von Regelkreisläufen im Hippocampus. MGE mit ManNProp ist eine nützliche Methode, um Polysialylierung und damit auch Signaltransduktion *in vivo* zu beeinflussen.

In-vivo-Nervenregeneration kann ebenso durch Behandlung mit ManNProp beeinflusst werden.^[368] Parenterale Injektion von peracetyliertem ManNProp stimulierte, im Unterschied zur Applikation von peracetyliertem ManNAc, axonales Wachstum, die Menge an baumartig verzweigten Axonen sowie die Anzahl an entstehenden Verzweigungsstrukturen in einem regenerierenden Axon. In Mäusen, die einen Knock-down von ST8Sia II aufweisen, konnte keine derartige Stimulation beobachtet werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Anwendung von ManNProp zur vermehrten Ausschüttung von Dopamin führt, wahrscheinlich über eine Aktivierung der Tyrosin-3-Monooxygenase.^[369]

4.6. Aliphatische Modifikationen und Angiogenese

Die Bildung eines Lumens innerhalb von neu entstehenden Blutgefäßen ist ein wesentlicher Bestandteil der Angiogenese. Endothelzellen exprimieren oft stark sialylierte Glykokonjugate, wie Mucine oder Proteoglykane. Die negative Ladung von Neu5Ac kreiert hierbei ein elektrisches Feld, das zur gegenseitigen Abstoßung der Zellen beiträgt und dadurch an der Bildung des endothelialen Lumens entscheidend beteiligt ist.^[370]

Kapillaraussprössungen, die von humanen Endothelzellen aus der *Vena umbilicalis* (HUVEC) gebildet werden, wenn diese mit bestimmten Gelmatrizen in Kontakt kommen, werden häufig zur Nachahmung der Angiogenese *in vitro* verwendet. Stark sialylierte Endothelzellen zeigen bei diesen Experimenten weniger Kapillaraussprössungen als Zellen mit freien Galactosylresten.^[371] Dies kann sowohl durch elektrostatische Abstoßung als auch durch die verminderte Bindung von Galektin-1 (Gal1) erklärt werden. Gal1, ein von vielen Zelllinien exprimiertes Protein, bindet hauptsächlich an endständige Galβ1-4GlcNAc-Reste in Glykokonjugaten. In desialylierten Endothelzellen aktiviert die Bindung von Gal1 den Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR-2) und induziert damit Proliferation und Angiogenese. Die Bedeutung des Gal1-Weges, besonders in der Tumoriologie, wurde durch Studien von Rabinovich et al. hervorgehoben.^[371]

In einem anderen Experiment wurden Endothelzellsphäroide mit ManNAc-Analoga behandelt und danach auf eine Gelmatrix überführt und mit Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) stimuliert. Sphäroide, die durch eine Vorbehandlung mit ManNAc vermehrt Sialinsäure exprimierten, zeigten reduzierte Kapillaraussprössungen. Im Unterschied dazu wiesen Zellen, welche die nichtnatürlichen Sialinsäuren Neu5Prop und Neu5But exprimierten, verstärkte Kapillaraussprössungen nach der Stimulation mit bFGF auf.^[372] Mögliche Erklärungen für die beobachteten Auswirkungen von MGE auf die Angiogenese könnten der veränderte

Umsatz der nichtnatürlichen Sialinsäuren oder auch eine veränderte Bindungsaffinität von bestimmten Sialinsäure-abhängigen Rezeptoren sein.

4.7. Aliphatische Modifikationen und das Immunsystem

Sialylierung und Desialylierung von Zellen ist für das Immunsystem von großer Bedeutung, besonders für die Funktion der Selektine und Siglecs, die zelluläres Neu5Ac binden und dadurch diverse Leukozytenfunktionen regulieren.^[373,374]

Es gibt Anzeichen dafür, dass Neu5Ac in die Differenzierung und Reifung von Lymphozyten involviert ist. Behandelt man beispielsweise humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes mit ManNProp, stimuliert dies Dosis-abhängig die Zellproliferation. Unter denselben experimentellen Bedingungen reagieren die Zellen kaum auf ManNAc. Zusätzlich wurde demonstriert, dass eine Behandlung von mononukleären Zellen mit ManNProp die Expression von Proliferationsmarkern, wie dem Transferrinrezeptor (CD71) und dem Interleukin-2-Rezeptor (CD25), fördert.^[375] Darüber hinaus sekretieren mit ManNProp behandelte Zellen vermehrt das Zytokin Interleukin-2 (IL-2). Nach der Bindung an seinen Rezeptor stimuliert IL-2 die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF_κB. In Extrakten aus ManNProp- oder ManNAc-behandelten mononukleären Zellen konnte eine Verdopplung der NF_κB-p65-Untereinheit festgestellt werden. Zur Erklärung dieser Resultate wurde postuliert, dass das negativ geladene CMP-Neu5Ac-Analogon, CMP-Neu5Prop, mit nukleären Proteinen interagiert und auf diese Weise die Genexpression beeinflusst. Zusammengenommen unterstreichen all diese Befunde die entscheidende Rolle der *N*-Acyl-Seitenkette von Neu5Ac in Zellen des Immunsystems.

4.8. Aliphatische Modifikationen beeinflussen die Stabilität von Glykoproteinen

Die biologische Stabilität von Glykoproteinen ist abhängig von ihren terminalen Zuckern, besonders von an zweit-letzter Stelle gelegenen Galactosyl- und terminalen Neu5Ac-Einheiten. Der Grad an Sialylierung ist ein Garant für die Stabilität und biologische Aktivität von Hormonen *in vivo*,^[376] und Hypersialylierung hat häufig einen antiproteolytischen Effekt.^[73] Die peripheren Zuckereinheiten der membrangebundenen Glykoproteine haben ihre ganz eigene Dynamik. Wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, ist die Halbwertzeit der peripheren Zuckerreste viel kürzer als die Halbwertzeit der „Kernzucker“ und des Polypeptid-Rückgrats.^[137,138,377] Die biologische Halbwertzeit von zwei stark sialylierten Glykoproteinen, dem Plasmamembran-assozierten Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 (ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie) und dem Wachstumshormon Erythropoetin, wurde gemessen, nachdem Zellen, die diese Glykoproteine exprimieren, mit ManNProp behandelt worden waren. Im Fall von CEACAM1 erhöhte der metabolische Austausch von nur 35% des Glykokonjugat-gebundenen Neu5Ac durch

Neu5Prop die biologische Halbwertzeit des Proteins um mehr als 40 %. Der partielle Ersatz von Neu5Ac durch Neu5Prop schützte Erythropoetin vor Sialidase-vermittelter Desialylierung und behinderte dadurch die Bindung des Hormons an den Ashwell-Morell-Rezeptor.^[378] Die biologische Halbwertzeit des durch MGE modifizierten Erythropoetins war bedeutend verlängert. Die Aufnahme von noch längeren *N*-Acyl-Seitenketten in nichtnatürliche Sialinsäuren des Erythropoetins, z.B. durch Behandlung von Zellen mit ManN-Pent, steigerte die Stabilität des Hormons weiter. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die pharmakokinetischen Eigenschaften von Glykoproteinen, z.B. von Wachstumshormonen oder Blutgerinnungsfaktoren, durch rekombinante Expression derselben mit nichtnatürlichen Sialinsäuren auf vorteilhafte Weise beeinflusst werden können.

4.9. Aliphatische Modifikationen regulieren die Genexpression

Wie in Abschnitt 2.1 beschrieben, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die negativ geladene CMP-Neu5Ac, die im Zellkern synthetisiert wird, mit Proteinen interagiert, die in Genregulation involviert sind. Ein Überschuss an CMP-Neu5Ac oder die Präsenz von nichtnatürlichen CMP-Sialinsäuren könnte folglich eine direkte Auswirkung auf Proteine haben, welche die Genexpression regulieren.

Die erste systematische Studie, die zeigte, dass ManN-Prop-Behandlung die Genexpression stark beeinflusst, wurde in neuronalen Zellen durchgeführt. In Gegenwart von Neu5Prop wurden 69 von 13778 im Probenset untersuchten Genen verändert exprimiert. Fünfzehn dieser Gene wurden hoch- und 54 herunterreguliert.^[362] Eines dieser hochregulierten Gene kodiert für Thioredoxin, das wiederum direkt in Zelldifferenzierung und Neuritenwachstum involviert ist.^[362] Behandlung mit ManNAc führt zu einem Anstieg der CMP-Neu5Ac-Konzentration im Zellkern. Es wurde gezeigt, dass dadurch die Expression von 1410 von 20862 getesteten Genen beeinflusst wird. 150 dieser Gene aus dem Probenset wurden hochreguliert, während 1260 von ihnen herunterreguliert wurden.^[379]

4.10. Aliphatische Modifikationen und Stammzellen

Erhöhte Expression von Sialyl-Lewis^X(sLe^X)-Epitopen verleiht mesenchymalen Stromazellen (MSC) einen Knochenmarktropismus,^[380] der zusammen mit anderen Effekten als günstig für die Knochenheilung angesehen wird. SLe^X ist ein sialyliertes Tetrasaccharid, das normalerweise auf *O*-Glykanen vorkommt. Um in entzündliche Gewebe durch transendotheliale Migration einzudringen zu können, benötigen MSCs eine hohe Expression von sLe^X auf ihrer Zelloberfläche.^[381] Der Grad an Zelloberflächen-assoziiertem sLe^X kann durch Ex-vivo-Fucosylierung erhöht werden.^[380] Diese Resultate zeigen, dass MGE eine effiziente Methode ist, um zelluläres Trafficking zu beeinflussen – ein Vorgang, der für eine Vielzahl an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen von großer Bedeutung ist.

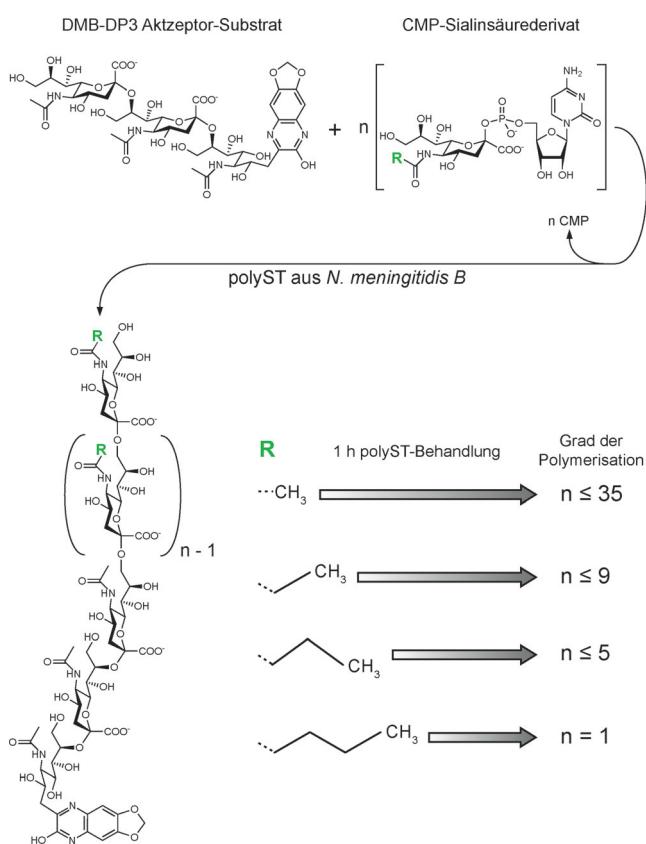
Durch das Kultivieren von MSCs in Gegenwart von ManNProp wird mehr als die Hälfte ihrer natürlichen Neu5Ac durch Neu5Prop ersetzt.^[382] Die Glykanstrukturen der behandelten Zellen verändern sich, nachdem Neu5Prop in diese inkorporiert wurde. Es wurde besonders ein Anstieg an fucosylierten Glykanspezies im Vergleich zu unbehandelten Zellen beobachtet. Interessanterweise waren die meisten der hierbei gefundenen fucosylierten Glykane Lewis^X- oder Blutgruppen-H-Epitope, aber nicht sLe^X. Auch die Expression von tri- und tetra-antennären Glykanen und Polylactosamin-haltigen *N*-Glykanen konnte durch Behandlung von MSCs mit ManNProp erhöht werden. Polylactosamine sind eine typische Besonderheit der MSC-*N*-Glykosylierung. Ihr Expressionsspiegel verringert sich stetig mit zunehmender Differenzierung dieser Zellen.^[383] Polylactosamine sind auch die bevorzugten Liganden für einige Mitglieder aus der Gruppe der Galektine. Die Affinität von Galektin-3 (Gal3) zu seinen Liganden steigt z.B. an, wenn viele aufeinanderfolgende Lactosamineinheiten vorhanden sind, wie es bei Polylactosaminen der Fall ist.^[384] Galektine nehmen an einer Vielzahl von biologischen Funktionen teil, und das bei einer großen Anzahl von Zelltypen.^[385] Auf die Rolle von Galektin-1 bei der Angiogenese wurde bereits in Abschnitt 4.6 eingegangen. Es wird postuliert, dass die hohen Expressionsspiegel von Gal1 und Gal3 für die immunsuppressiven Eigenschaften von MSCs verantwortlich sind. Es sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass neuronale Zellen, die mit ManNProp vorbehandelt wurden, Gal3 überexprimieren.^[366] Kultivierung von Stammzellen in Gegenwart des ManNAc-Analogs ManNTGc führt zur Biosynthese von Neu5TGc (siehe Abschnitt 3.3). Diese nichtnatürliche Sialinsäure verändert die Eigenschaften der Stammzellen und kann so z.B. neuronale Entwicklung induzieren.^[240] Im Unterschied zu den Ergebnissen mit MSCs wurde eine erhöhte Expression von sLe^X in ManNProp-behandelten Promyeloblasten beobachtet.^[386] Diese Entdeckung kann entweder durch eine erhöhte Affinität der betroffenen Sialyltransferasen für Neu5Prop oder durch verminderte Aktivität von Sialidasen für sLe^X-Glykane, die Neu5Prop enthalten, erklärt werden.

4.11. *N*-Acyl-Seitenketten-spezifischer Metabolismus von *N*-Acylmannosaminen

Aus der Zusammenschau der hier vorgetragenen Befunde erwächst die Erkenntnis, dass von jeder in nichtnatürliche Sialinsäuren eingeführten *N*-Acyl-Seitenketten-Modifikation eine Vielzahl an unterschiedlichen biologischen Konsequenzen ausgeht. In manchen Fällen können einzelne aliphatische *N*-Acyl-Seitenketten-Modifikationen sogar gegensätzliche Effekte vermitteln, abhängig von der Länge ihrer Acylkette. Wie in Abschnitt 4 beschrieben, können solche gegensätzlichen Effekte während der Polyomavirus-Infektion,^[184] der neuronalen Differenzierung^[375] oder der Kapillaraussprössung beobachtet werden.^[372] Diese Befunde unterstreichen die Notwendigkeit, die Spezifität der unterschiedlichen Sialyltransferasen (STs) im Hinblick auf einzelne *N*-Acyl-Seitenketten-Modifikationen zu untersuchen. Wenn die nichtnatürlichen Sialinsäuren unterschiedlich durch die spezifi-

schen STs übertragen werden sollten, wären jeweils unterschiedliche Glykokonjugatstrukturen betroffen. Dies könnte die sich zum Teil widersprechenden Beobachtungen erklären, die nach der Behandlung von Zellen mit nichtnatürlichen ManNAc-Analoga gemacht wurden.

In ersten Studien wurden Unterschiede in der Spezifität einer bakteriellen Polysialyltransferase für CMP-Neu5Prop, CMP-Neu5But, CMP-Neu5Pent oder CMP-Cyclopropylcarbonylneuraminsäure gezeigt.^[387] Die *N*-Propionyl-, *N*-Butanoyl- und *N*-Pentanoylderivate wurden effizient von der verwendeten Polysialyltransferase auf einen TriSia-Akzeptor übertragen. Die maximale Länge der entstandenen nichtnatürlichen PolySia verringerte sich jedoch mit zunehmender Größe der verwendeten *N*-Acyl-Seitenketten-Modifikationen (Schema 15). Beim Einsatz des CMP-Neu5Pent-Nu-



Schema 15. Untersuchungen zur Spezifität bakterieller Polysialyl-Transferasen (PolySTs) für *N*-Acyl-Seitenketten-modifizierte CMP-Sialinsäure-Analoga. Eine PolyST aus *Neisseria meningitidis* B wurde genutzt, um verschiedene *N*-Acyl-Seitenketten-modifizierte CMP-Sialinsäure-Derivate auf einen fluoreszierenden TriSia-Akzeptor (DMB-DP3) zu übertragen. Mit zunehmender Größe der *N*-Acyl-Seitenkette verringerte sich die Verlängerung der nichtnatürlichen PolySia, was für eine hohe Spezifität der PolyST für CMP-Neu5Ac spricht.

kleotids konnte lediglich der Transfer eines einzigen Sia-Restes auf den TriSia-Akzeptor katalysiert werden, und die Verwendung des *N*-Cyclopropylcarbonylderivats führte zu keinerlei Verlängerung des Akzeptors.^[387]

5. Anwendungsbeispiele für nichtnatürliche Sialinsäuren mit bioorthogonalen *N*-Acyl-Seitenketten-Modifikationen

Die Anwendung von bioorthogonalen Chemie wurde von Sletten und Bertozzi mit den Worten „in einem Meer aus Funktionalität nach Selektivität fischen“ beschrieben.^[204] Nach ihrer Inkorporation in Biomoleküle stehen bioorthogonale Reportergruppen für chemoselektive Ligationen bereit. Azide können z. B. mit Phosphinen in der Staudinger-Ligation reagieren, und lineare Alkine können durch die Anwendung von CuAAC oder SPAAC funktionalisiert werden (siehe Abschnitt 3.2).^[222,388,389] Bioorthogonale Reaktionen boten nach ihrer Entdeckung völlig neue Möglichkeiten für biologische Untersuchungen und trugen dadurch zu fundamentalen Entdeckungen in der Protein-, Membran-, Neuro-, Entwicklungs- und Stammzellbiologie sowie in der Krebsforschung bei. Die Entwicklung derartiger bioorthogonaler Reaktionen sowie die Vor- und Nachteile bestimmter Reportergruppen und Verbindungsreagentien wurden bereits in vielen hervorragenden Aufsätzen, besonders von Bertozzi und Mitarbeitern, beschrieben.^[199,204,222,390,391]

Durch das Einführen bioorthogonaler, funktioneller Gruppen in die *N*-Acyl-Seitenkette von ManNAc-Analoga und anderen Monosacchariden kann MGE mit bioorthogonaler Chemie kombiniert werden. Diese Methode bietet die Möglichkeit, bisher unerforschte Areale zu erkunden. Wenn man Fluorophore mit solchen bioorthogonalen Reportergruppen kuppelt, kann dies dazu genutzt werden, die Topologie der Glykokonjugate und deren Umsatz in vitro, ex vivo und in vivo zu visualisieren.

Abschnitt 5 bietet eine Zusammenfassung der Erkenntnisse, die bis heute bei der Verwendung von MGE mit bioorthogonalen *N*-Acyl-Seitenketten-modifizierten ManNAc-Analoga gewonnen wurden. Mithilfe der Methode konnten einige relevante biologische Prozesse untersucht und Strategien für die mögliche Behandlung von Krankheiten entwickelt werden.

5.1. Visualisierung sialylierter Glykokonjugate in vitro mithilfe von metabolischem Glykoengineering

Die ersten erfolgreichen Studien zur Nutzung von MGE mit bioorthogonalen Reportern für die Visualisierung von Glykokonjugaten wurden bei Experimenten mit Zellkulturen durchgeführt. Zellen wurden zuerst mit ManNLev und später mit *N*-Azidoacetylmannosamin (ManNAz) behandelt, die zu der entsprechenden Neu5Lev oder *N*-Azidoacetylneuraminsäure (Neu5Az) metabolisiert werden. Nachfolgend konnten die Glykokonjugat-gebundenen, nichtnatürlichen Sialinsäuren mit einem fluorophor-konjugierten Phosphin-Reagens durch die Staudinger-Ligation markiert werden.^[15,198] Die ersten verwendeten Reagentien, z. B. Fluorescein- oder Rhodaminkonjugate, hatten den Nachteil, für erhebliche unspezifische Hintergrundfluoreszenz zu sorgen, denn sie gehen auch unspezifische Bindungen ein oder verbleiben als nicht umgesetzte, aber dennoch fluoreszierende Reagentien auf der Sonde. Um die Empfindlichkeit zu erhöhen, wurden

Konjugate genutzt, die nur nach der Reaktion mit ihrer Zielstruktur fluoreszieren.^[205,392–394] Solche „intelligenten“ Sonden haben z. B. ein Cumaringerüst. Das Phosphin hemmt in seiner reduzierten, nicht umgesetzten Form die Fluoreszenz des Cumarins mithilfe seines freien Elektronenpaares. Wenn das Phosphin über die Staudinger-Ligation reagiert, eliminiert das entstehende Oxid die Hemmung und bringt somit ein fluoreszierendes Produkt hervor.^[205]

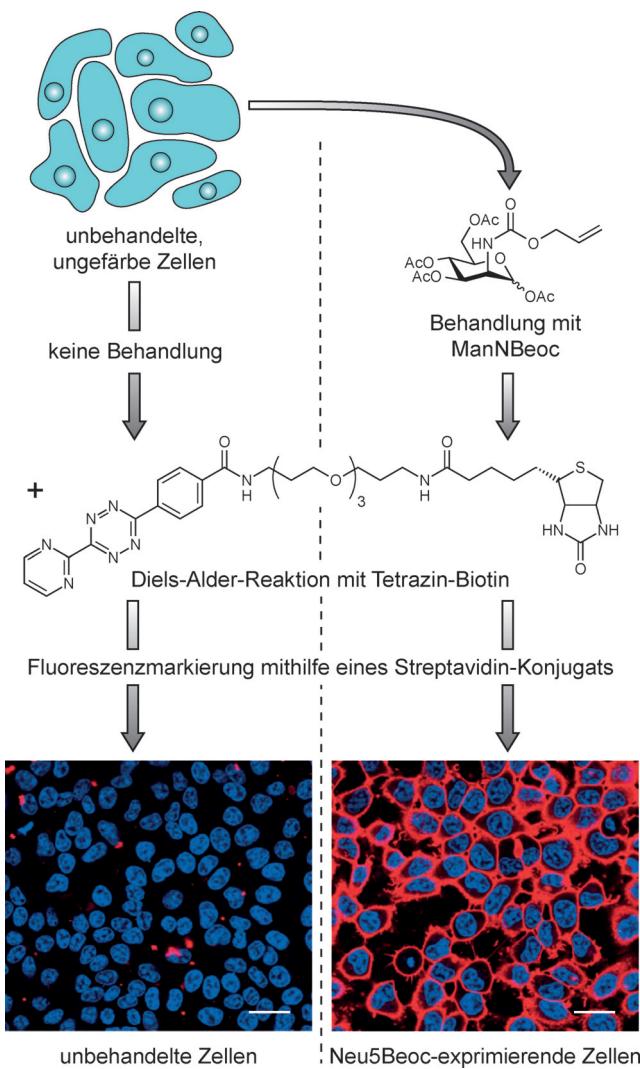
Glykokonjugate auf Zelloberflächen können auch durch die Kupplung fluoreszierender Sonden mit CuAAC visualisiert werden, und zwar nach Vorbehandlung der betroffenen Zellen mit *N*-Alkinyl- oder *N*-Azidoacetyl-modifizierten Monosaccharid-Analoga. Experimente mit CuAAC in Säugetierzellen ergaben, dass ManNAz ungefähr 30–45 min benötigt, bis es metabolisiert und als Neu5Az auf der Zelloberfläche exprimiert wird.^[395] Auch für CuAAC gibt es „intelligenten“ Sonden. Diese beruhen z. B. auf einem 1,8-Naphthalamidgerüst.^[396] Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, wurde versucht, die Zytotoxizität des für die Reaktion erforderlichen Kupfers durch Hinzugabe von bestimmten Liganden, wie THPTA, zu eliminieren. Derartige Liganden machen CuAAC auch bei In-vivo-Experimenten anwendbar.^[208,209]

Schnell reagierende, nichttoxische Konjugate, die mit ihrer Zielstruktur mittels SPAAC reagieren, können zur Überwachung des Glykanumsatzes in lebenden Zellen eingesetzt werden. Mit einem difluorierten Cyclooctinkonjugat (DIFO; siehe Schema 17 in Abschnitt 5.2) lassen sich z. B. Neu5Az- und *N*-Azidoacetylgalactosamin (GalNAz) in Zelloberflächen-Glykokonjugaten effektiv anfärben.^[397,398]

Weiterhin können zelluläre Glykokonjugate auch mithilfe von DARinv markiert werden. Hierbei werden Zellen zunächst mit Monosaccharidanaloga vorbehandelt, die kleine Alkene tragen, z. B. mit *N*-Butenyloxycarbonylmannosamin (Man5Beoc), das anschließend zur *N*-Butenyloxycarbonylneuraminsäure metabolisiert wird.^[216,217,223] Durch nachfolgende Markierung mit einem fluoreszierenden Tetrazinkonjugat lassen sich die modifizierten Glykokonjugate in Zellen visualisieren (Schema 16). Mit der gleichen Markierungsstrategie können auch Cyclopropen-haltige Analoga auf der Zelloberfläche visualisiert werden, z. B. 9-Cyclopropen-*N*-acetylneuraminsäure (9-CpNeu5Ac).^[225]

Es ist erwähnenswert, dass die Markierungsstrategien SPAAC und DARinv kombiniert werden können, um z. B. unterschiedlich modifizierte Zuckerreste gleichzeitig in derselben Zelle kenntlich zu machen.^[216]

MGE mit bioorthogonalen Reportern kann auch dazu verwendet werden, bakterielle Glykokonjugate zu visualisieren, und bietet dadurch neue Einblicke in bakterielle Wachstumsparameter, den Umsatz von Glykokonjugaten und die Aktivität von Enzymen auf der Zelloberfläche.^[399] Diese Technik könnte eine besondere Bedeutung für die Detektion von Bakterien erlangen und z. B. für die Suche nach bakterieller Kontamination in Proben, wie Trinkwasser, verwendet werden. LPS von *E. coli* kann nach Vorbehandlung mit 8-Azido-8-desoxy-KDO angefärbt werden.^[400] Inkubation mit 8-Azido-3,8-didesoxy-KDO und nachfolgende Ligation mittels SPAAC konnte eingesetzt werden, um lebendige, kultivierbare *E. coli* in bakteriellen Mischungen nachzuweisen,



Schema 16. In-vitro-Markierung *N*-Acyl-Seitenketten-modifizierter Sialinsäuren mithilfe der Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (DARinv). Hek293-Zellen, die Neu5Beoc exprimieren, wurden mit einem bioorthogonalen Triazin-Biotin-Reaktionspartner gekuppelt. Die modifizierten Zelloberflächen-Sialinsäuren konnten mithilfe eines Streptavidinkonjugats fluoreszenzmarkiert werden. Maßstabsbalken = 35 μ m. Ein Teil dieses Schemas stammt aus Lit. [223].

die außerdem entweder tote *E. coli* oder *Bacillus subtilis* (als Modell für einen nicht-KDO-haltigen Mikroorganismus) enthielten.^[14] C6-modifizierte Fuc-Analoga können zur Kennzeichnung Fuc-haltiger bakterieller Polysaccharide genutzt werden.^[401] Kürzlich wurde gezeigt, dass die Zeit zur Identifizierung von *Legionella pneumophila* in kontaminierten Proben durch den Einsatz von MGE mit bioorthogonalen Reportern und Fluoreszenzmarkierung deutlich verkürzt werden kann.^[402] Die Zelloberfläche des Gram-positiven Bakteriums *Staphylococcus aureus* kann mithilfe von MGE mit *N*-Azidoacetylglucosamin (GlcNAz) visualisiert werden.^[403] Darüber hinaus wird durch die Reaktion mit einem fluoreszierenden Farbstoff auch die Bindung der markierten Bakterien an Kulturzellen reduziert.

Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, werden Diazirin-haltige ManNAc-Analoga, wie ManNDAz, zu den entsprechenden nichtnatürlichen Sialinsäuren metabolisiert. Der Diazirin-Rest in diesen Analoga steht danach für Photovernetzung zur Verfügung. Mit dieser experimentellen Strategie lassen sich Ganglioside aus Zelllysaten kovalent binden. Die resultierenden Gangliosid-Protein-Komplexe können danach durch Blotting oder Massenspektrometrie weiter analysiert werden.^[231, 404, 405]

Die Glykosylierung im Golgi-Apparat und in frühen Endosomen konnte durch Inkubation von Fibroblasten mit *N*-(5-Pentinoyl)neuraminsäure (Neu5Al) und nachfolgende Fluoreszenzmakierung mit CuAAC visualisiert werden.^[406] Bei der Anwendung dieser Methode wurde gezeigt, dass Fibroblasten aus Patienten, die an angeborenen Störungen der Glykosylierung (CDG) leiden, eine verringerte Menge der Alkin-markierten, gebundenen Sialinsäuren in den untersuchten zellulären Kompartimenten aufwiesen. Heutzutage werden auf HPLC und Massenspektrometrie basierende Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von CDG genutzt.^[407, 408] Techniken wie Glykoengineering mit bioorthogonalen Reportern könnten zu einer schnellen und einfach anwendbaren Alternative für die Identifizierung solcher Krankheiten werden.

Kürzlich wurde der zelluläre Metabolismus von peracetyliertem ManNAz untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Effizienz der ManNAz-Aufnahme und auch der Neu5Az-Metabolismus zwischen unterschiedlichen Zelllinien variieren.^[409] Weiterhin wurden der zelluläre Aufnahmemechanismus und die Verteilung von sowohl ManNAc als auch Sialinsäure *in vitro* durch Nutzung von CuAAC analysiert.^[410] In dieser Studie wurden Zellen mit *N*-(4-Pentinoyl)mannosamin (ManNAk) oder der entsprechenden *N*-(4-Pentinoyl)neuraminsäure (Neu5Alk) behandelt, die daraufhin mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden. Neu5Alk wird anscheinend durch Endozytose aufgenommen. Das lysosomale Protein Sialin vermittelt hierbei die Freigabe von Neu5Alk aus Lysosomen ins Zytosol. Im Unterschied dazu tritt ManNAk über einen bis jetzt unbekannten Plasmamembrantransporter in die Zelle ein.

Es gab umfangreiche Bemühungen, unterschiedliche Anwendungen zur Visualisierung von Glykokonjugaten in Zellen zu entwickeln. Manche dieser Methoden wurden für zukünftige In-vivo-Experimente erdacht (siehe Abschnitt 5.2), während andere zum Verständnis der Biologie von Glykokonjugaten beitrugen, besonders in Bezug auf ihren Umsatz und ihre Verteilung in Zellen.

5.2. Visualisierung sialylierter Glykokonjugate *in vivo* und *ex vivo* mithilfe von metabolischem Glykoengineering

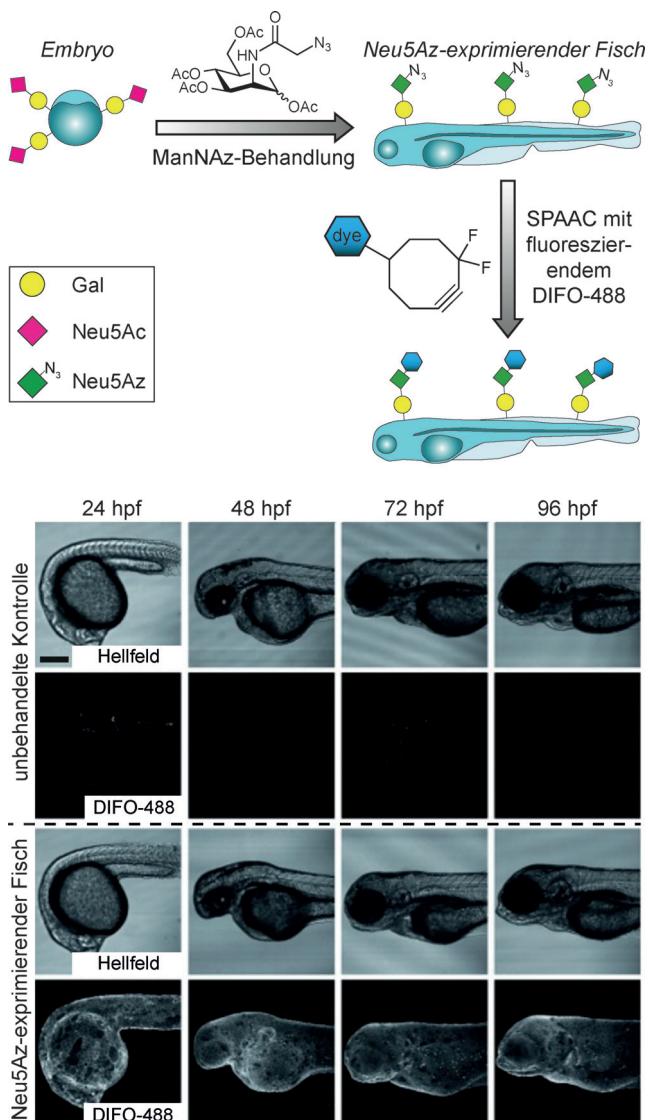
Die ersten Studien, mit deren Hilfe gezeigt werden sollte, dass MGE mit geeigneten bioorthogonalen Reportergruppen auch für In-vivo-Experimente genutzt werden kann, wurden in Mäusen durchgeführt.^[202] Nach Vorbehandlung der Tiere mit peracetyliertem ManNAz wurde das entsprechende Neu5Az detektiert, und zwar indem isolierte Zellen aus der Milz *ex vivo* mithilfe der Staudinger-Ligation angefärbt

wurden. Mit der gleichen Methode konnte auch gezeigt werden, dass GalNAz in Glykokonjugate von Mäusen inkorporiert wird.^[411] Ein weiteres ManNAc-Analogon, das für bioorthogonales Imaging von sialylierten Glykokonjugaten in *cellula* und *ex vivo* genutzt werden kann, ist *N*-(Cycloprop-2-en-1-ylcarbonyl)mannosamin (ManNCp).^[224] Die Tatsache, dass bioorthogonale GDP-Fuc-Analoga in Tieren metabolisiert werden, wurde mithilfe früher Entwicklungsstadien von Zebrafischembryonen belegt.^[412] Bei dieser Studie ließ man fucosyierte Glykokonjugate mit fluoreszierenden Sonden in Paraformaldehyd-fixierten Embryos durch CuAAC *ex vivo* reagieren.

Es wurden Ratten mit ManNAz behandelt, um die Verteilung von sialylierten Glykokonjugaten in ihren Herzen zu studieren und die Sialylierungsmuster von gesunden kardialen Geweben mit Geweben von Tieren zu vergleichen, die unter kardialer Hypertrophie leiden.^[413] Die Herzen der vorbehandelten Ratten wurden hierbei entnommen und mit einer nährstoffreichen, oxygenierten Lösung durchspült (Langendorff-Perfusion), die zusätzlich ein fluoreszierendes, SPAAC-fähiges Reagens enthielt. Histologische Schnitte ergaben, dass die Sialinsäure-Biosynthese in kardialem Gewebe von Ratten, die an Hypertrophie litten, insgesamt erhöht war.^[413] Diese Erkenntnisse wurden unter anderem auf eine vermehrte Expression bestimmter sialylierter Glykoproteine, wie NCAM, T-Kininogene und α 2-Macroglobulin, bezogen.

Scherer et al. nutzten MGE mit bioorthogonalen Reportern, um den Proteinumsatz in der Kupula zu untersuchen (bisher unveröffentlichte Studien). Die Kupula ist ein entwicklungsgeschichtlich hochkonserviertes Organ, das zur Detektion von Torsionsbewegungen des Kopfes dient. Der Hauptbestandteil der gallertartigen Kupula ist Kupulin, ein Glykoprotein mit einer Masse von ca. 45 kDa.^[414] In den Studien wurden Zebrafische mit nichtnatürlichen Monosacchariden behandelt, die bioorthogonale Modifikationen trugen. Die anschließende, zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführte Ex-vivo-Analyse der CuAAC-gefärbten histologischen Schnitte des Innenohres ließ auf einen baso-apikal Umsatz der Kupula-assozierten Glykoproteine und zusätzlich einen schnellen Umsatz der entsprechenden Zuckeraloqua in vivo schließen.

SPAAC wurde dafür genutzt, den Glykanumsatz in lebenden Zebrafischembryos sichtbar zu machen (Schema 17).^[203, 415] Bei diesen In-vivo-Experimenten wurden die Embryonen mit peracetyliertem ManNAz oder GalNAz inkubiert. Die entsprechenden Endprodukte, Neu5Az bzw. GalNAz, konnten in *O*-Glykanen vom Mucin-Typ angefärbt werden, indem die Tiere in DIFO-Fluorophor-Konjugaten gebadet wurden. Durch Verwendung einer Mehrfarb-Markierungsstrategie konnten Erkenntnisse über das Expressionsmuster und die Verteilung von Glykanen *in vivo* gewonnen werden. Die gleiche Strategie wurde genutzt, um *O*-Glykane vom Mucin-Typ in *C. elegans* zu markieren. Hierbei zeigte sich eine ausgeprägte Expression solcher Mucine während der Entwicklung der Tiere.^[398] Zebrafische und *C. elegans* haben den Vorteil, transparent zu sein und *ex utero* heranzureifen. Das Anfärben von *N*-Acyl-Seitenketten-modifizierten Sialinsäuren, die bioorthogonale Reporter tragen, ist noch anspruchsvoller in lebenden Säugetieren. Chang



Schema 17. In-vivo-Markierung sialylierter Glykane in Zebrafischembryos. Nach Vorbehandlung mit ManNAz exprimieren heranwachsende Zebrafische Neu5Az auf ihrer Zelloberfläche. Die N-Acyl-Seitenketten-modifizierten Sialinsäuren wurden in lebenden Tieren durch SPAAC mithilfe eines Fluorophor-konjugierten difluorinierten Cyclooctin (DIFO-488)-Reaktionspartners visualisiert. Maßstabsbalken = 200 μ m; hpf: Stunden nach der Befruchtung. Teile dieses Schemas sind aus Lit. [415] entnommen.

et al. zeigten, dass die SPAAC-vermittelte Konjugation mit Fluoreszenzfarbstoffen in lebenden Mäusen möglich ist.^[213] Bei diesen Experimenten wurde der Erfolg des Anfärbens jedoch noch immer ex vivo evaluiert. Neves et al. injizierten peracetyliertes ManNAz in Tumor-tragende Mäuse. Das hierbei neugebildete Neu5Az konnte anschließend mithilfe der Staudinger-Ligation in vivo markiert werden.^[416] Durch die Nutzung von Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT) konnten die Tumoren mit hoher Spezifität kenntlich gemacht werden, da sie einen beschleunigten Sialinsäureumsatz aufweisen. Kürzlich wurde ein „Doppelklick“-Ansatz etabliert, der die Staudinger-Ligation, oder SPAAC, mit nachfolgender DARinv-Konjugation kombiniert, um *O*-

Glykane in Organen oder Tumorgeweben durch SPECT zu visualisieren.^[417] In einem anderen Experiment wurden Zellen mit peracetyliertem ManNAz vorbehandelt und danach in die Leber von Mäusen transplantiert.^[418] Im Anschluss wurden die Zellen mithilfe von SPAAC mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert, wodurch ihre Lokalisierung innerhalb der Leber in vivo kenntlich gemacht wurde.

Die Visualisierung von Glykokonjugaten in vivo und ex vivo ist eine Anwendung von großer Bedeutung. Nicht nur die Grundlagenforschung wird von den neu eingeführten oder schon gut etablierten Methoden profitieren, sondern auch klinische Anwendungen sind vorstellbar, z. B. in der Diagnostik. Gegenüber konventionellen Techniken, wie der Markierung mit Lektinen oder Antikörpern, hat MGE mit bioorthogonalen Reportern den Vorteil, dass es den gesamten Metabolismus der entsprechenden nichtnatürlichen Monosaccharide abbildet. Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, können schnelle, nichttoxische Reaktionsmethoden, besonders SPAAC und DARinv, in Kombination mit mehrfarbigen Färbemethoden zur Visualisierung des Glykokonjugatmetabolismus mit mehr als einem Reportermolekül zur selben Zeit genutzt werden.

5.3. Weitere Anwendungsmöglichkeiten für metabolisches Glykogenengineering mit bioorthogonalen, N-Acyl-Seitenketten-modifizierten Mannosaminen

MGE mit bioorthogonalen Reportern kann nicht nur zur Visualisierung von Glykokonjugaten genutzt werden. In diesem Unterabschnitt werden weitere Anwendungsmöglichkeiten dieser leistungsstarken Technik beschrieben.

Pan et al. nutzten MGE, um sialisierte Glykoproteine aus Lysaten verschiedener Zelllinien anzureichern. Die Zellen wurden dazu mit peracetyliertem ManNAz behandelt.^[419] Nach Konjugation mit einem Alkin-Biotin-Reagens konnten die Glykoproteine der lysierten Zellen, die das entsprechende Neu5Az enthielten, mithilfe von magnetischen Streptavidin-Kügelchen isoliert werden. Der Vergleich von isolierten Proteinen aus unterschiedlichen Zelllinien durch HPLC und Massenspektrometrie ergab, dass Zellen, die aus nichtkleinzelligem Lungenkarzinom gewonnen wurden, bestimmte Glykoproteine wie NCAM oder Contactin1 exprimieren. In einem ähnlichen Ansatz wurden Neu5Az-haltige Glykoproteine aus Zelllysaten pankreaskarzinomatösen Ursprungs mit Biotin über die Staudinger-Ligation gekuppelt und an Streptavidin-Agarose gebunden.^[420] Danach wurden die Glykan-gebundenen Peptide eluiert und weiter mittels Massenspektrometrie analysiert. Parallel konnten die isolierten Glykane durch Lektin-Mikroarrays charakterisiert werden. Bestimmte *N*-Glykosid-haltige Peptide wurden in unterschiedlich markierten Glykoproteinen identifiziert. Viele von diesen wurden bereits zuvor mit Tumoren assoziiert. Diese Erkenntnisse unterstreichen einmal mehr die Bedeutung der Sialylierung bei Krebs und der Entwicklung von Tumoren.

Boons et al. führten Neu5Az durch enzymatische In-vitro-Behandlung mit der entsprechenden CMP-Neu5Az in einen anti-CD22-Antikörper ein.^[421] Durch SPAAC konnten diese Antikörper mit fluoreszierenden Farbstoffen oder sogar

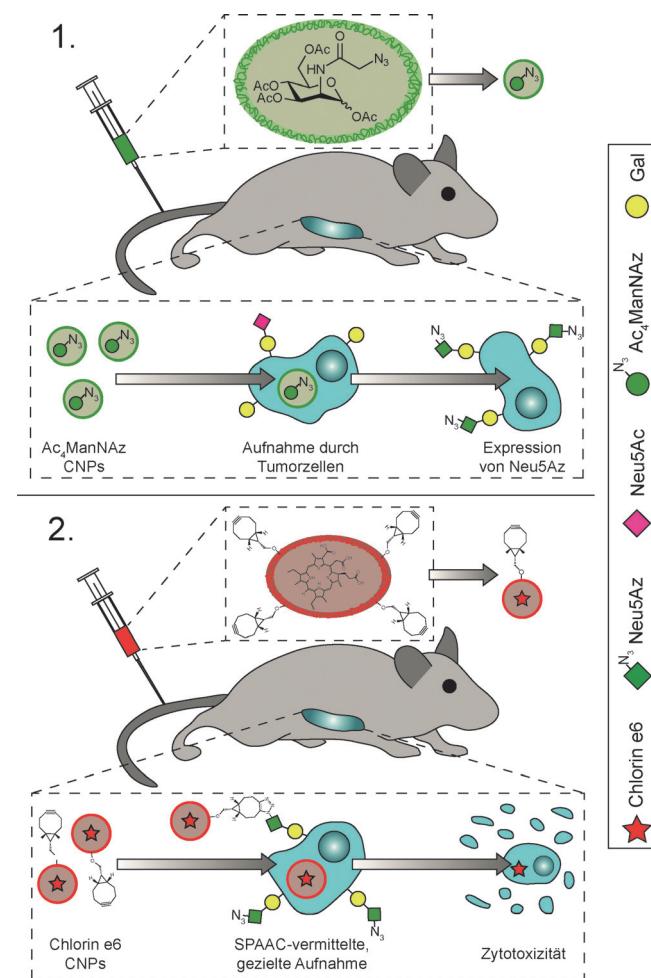
Chemotherapeutika gekuppelt werden, z. B. mit dem DNA-interkalierenden Medikament Doxorubicin. Es konnte gezeigt werden, dass diese Medikament-Antikörper-Konjugate für CD22-positive B-Zellen zytotoxisch sind.

Eine Kombination aus der Behandlung mit ManNAz und SPAAC zeigte sich als sehr nützlich für Tumor-Targeting mithilfe von Nanopartikeln.^[422] Wenn speziell entworfene Nanopartikel, die an die jeweilige Neu5Az durch SPAAC binden, in Tumor-tragende Mäuse injiziert werden, reichern sich diese Nanopartikel im Tumorgewebe und anderen metabolisch aktiven Organen an. In einem weiterentwickelten Experiment wurden Tumor-tragende Mäuse mit Nanopartikeln behandelt, die peracetyliertes ManNAz enthielten.^[423] Der Vorteil, ManNAz in Nanopartikeln zu verpacken, liegt darin, dass sich Nanopartikel durch den erhöhten Permeabilitäts- und Retentionseffekt in Geweben mit stärkerer Angiogenese, z. B. in Tumoren, anreichern.^[424] Anschließend wurden sekundäre, Chemotherapeutika enthaltende Nanopartikel genutzt, die an das Neu5Az-exprimierende Tumorgewebe binden und dadurch das Tumorwachstum *in vivo* beträchtlich hemmen können (Schema 18). Mit dieser Art von zielgerichteter Medikamententherapie können hohe Konzentrationen des eingesetzten Wirkstoffes mit geringeren Nebenwirkungen für den Gesamtorganismus relativ spezifisch an die gewünschten Stellen im Körper verbracht werden.

Es wurde gezeigt, dass durch den Gebrauch von *N*-Propargylcarbonylmannosamin (ManNProc) oder *N*-Propargylcarbonylsialinsäure (Neu5Proc) Zellen kreiert werden können, die hoch-affine Liganden für Siglecs exprimieren (High-affinity siglec ligand-expressing cells, HASLECs).^[425] In dieser Studie wurden die vorbehandelten, Neu5Proc tragenden Zellen über CuAAC mit bestimmten Azid-Gruppen verbunden, welche die Bindungsaffinität zu spezifischen Siglec-Subtypen stark erhöhen.^[426] HASLECs sind gut geeignet, um Siglec-abhängige Interaktionen auf zellulärer Ebene zu erforschen. Ansätze wie diese zeigen, dass MGE in Kombination mit bioorthogonalen Ligationen zur chemischen Reprogrammierung der zellulären Glykokalyx angewendet werden kann und dass dadurch die Interaktion der Glykokalyx mit Sialinsäure-abhängigen Rezeptoren, wie Siglecs, moduliert werden kann.

6. Zukunftsaussichten

Heutzutage werden aliphatische *N*-Acyl-Seitenketten-modifizierte Mannosamine vorrangig zur Erforschung Neu5Ac-abhängiger biologischer Prozesse genutzt, wohingegen bioorthogonale *N*-Acyl-Seitenketten-modifizierte Mannosamine hauptsächlich dazu verwendet werden, Sialylierung und den Sialinsäuremetabolismus *in vitro*, *in vivo* und *ex vivo* zu visualisieren. Aus den Befunden, die in diesem Aufsatz beschrieben werden, lässt sich ableiten, dass die Palette an zurzeit verfügbaren Mannosaminen nützliche Hilfsmittel bereithält, um in zukünftigen Studien bisher unbekannte Merkmale von Glykanen aufzudecken. Tabelle 1 enthält eine Zusammenstellung aller ManNAc-Analoga, die bis heute für MGE genutzt werden konnten. Neue ManNAc-Analoga könnten z. B. dazu verwendet werden, Sialinsäuren



Schema 18. Die Verwendung von MGE bei der zielgerichteten Tumortherapie. Tumor-tragende Mäusen wurden Glykol-Chitosan-Nanopartikel (CNPs) injiziert, die peracetyliertes ManNAz enthielten. Derartige CNPs reichern sich typischerweise in Tumorgeweben und anderen metabolisch aktiven Organen an. Nach der Aufnahme von ManNAz exprimierten die Tumorzellen Neu5Az. Im einem zweiten Schritt wurden die Mäuse mit CNPs behandelt, die Chlorin e6 enthielten und einen bioorthogonalen Reaktionspartner auf ihrer Oberfläche trugen. Die vorbehandelten, Neu5Az exprimierenden Tumorzellen binden diese Nanopartikel durch SPAAC und nehmen das zytotoxische Chlorin e6 auf.

mit neuen chemischen, biochemischen oder biologischen Eigenschaften auszustatten. Außerdem bietet Glykoengineering der *N*-Acyl-Seitenkette neue, kreative Möglichkeiten, um Tumorwachstum zu beeinflussen oder das Immunsystem zu stimulieren. Techniken wie das Anregen von Neuritenwachstum könnten von Zellkulturexperimenten auf Studien an lebenden Tiere erweitert werden.

Besondere Aufmerksamkeit sollte der Analyse der Spezifität von unterschiedlichen Sialyltransferasen (STs) für die verschiedenen *N*-Acyl-Seitenketten-Modifikationen in nichtnatürlichen Sialinsäuren geschenkt werden. Es gibt Hinweise darauf, dass die heutzutage genutzten N-Modifikationen Präferenzen für bestimmte STs aufweisen können. Wenn wir mehr über die Spezifität und Empfindlichkeit der STs lernen, können wir die molekularen Mechanismen, welche die Chemie, die Biochemie und biologischen Eigen-

Tabelle 1: Zusammenstellung von ManNAc-Analoga, die sich als anwendbar für MGE erwiesen haben, geordnet nach Typ und Datum der ersten Beschreibung. Um diese Präsentation zu vereinfachen und zu vereinheitlichen, sind alle ManNAc-Analoga in ihrer desacetylierten, metabolisch aktiven Form abgebildet.

Struktur	Abkürzung	Autor, Jahr	Struktur	Abkürzung	Autor, Jahr
aliphatische Modifikationen:					
	ManNProp	Kayser et al., 1992 ^[171]		ManNCrot	Keppler et al., 2001 ^[173]
	ManNPent	Kayser et al. 1992 ^[171]		ManNisoBut	Chefalo et al., 2006 ^[176]
	ManNBut	Keppler et al., 1995 ^[184]		ManNPAc	Chefalo et al., 2006 ^[176]
	ManNHex	Keppler et al., 1995 ^[184]		ManNCycloProp	Wolf et al., 2012 ^[387]
	ManNGc	Collins et al., 2000 ^[79]			
Modifikationen mit Fluor:					
	ManNPropF ₃	Dafik et al., 2008 ^[177]		ManNPentF ₃	Dafik et al., 2008 ^[177]
	ManNButF ₃	Dafik et al., 2008 ^[177]		ManNPentF ₂ F ₃	Dafik et al., 2008 ^[177]
Modifikationen mit Thiolen:					
	ManNTGc	Sampathkumar et al., 2006 ^[241]			
Bioorthogonale Modifikationen:					
	ManNLev	Mahal et al., 1997 ^[192]		ManNHxI	Niederwieser et al., 2013 ^[216]
	ManNAz	Saxon et al., 2000 ^[198]		ManNPeoc	Niederwieser et al., 2013 ^[216]

Tabelle 1: (Fortsetzung)

Struktur	Abkürzung	Autor, Jahr	Struktur	Abkürzung	Autor, Jahr
	ManNAlk	Hsu et al., 2007 ^[396]		ManNMCP	Cole et al., 2013 ^[218]
	ManNDAz	Yu et al., 2008 ^[427]		ManNAloc	Späte et al., 2014 ^[223]
	4-AzMan-NAc	Möller et al., 2012 ^[235]		ManNBeoc	Späte et al., 2014 ^[223]
	ManN-n-Iso	Stairs et al., 2013 ^[227]		ManNHeoc	Späte et al., 2014 ^[223]
	ManN-t-Iso	Stairs et al., 2013 ^[227]		ManNCCP	Späte et al., 2014 ^[219] Patterson et al., 2014 ^[220]
	ManNProc	Bateman et al., 2013 ^[183]		ManNCp	Xiong et al., 2015 ^[224]
	ManNPl	Niederwieser et al., 2013 ^[216]			

schaften der *N*-Acyl-Seitenketten-modifizierten Mannosamine bestimmen, sowie auch den Umsatz von modifizierten Sialinsäuren in Zellen detaillierter verstehen. Einige dieser Analoga könnten z. B. von allen STs akzeptiert werden und würden deshalb auf allen sialylierten Glykanen erscheinen, während andere spezifisch für nur eine oder wenige STs sein könnten und somit auch nur auf bestimmten sialylierten Glykokonjugaten exprimiert werden würden. Unserer Ansicht nach wird es in zukünftigen Studien möglich sein, mittels MGE Glykan-spezifische Forschungen zu betreiben, und das in allen Organensystemen.

Ein weiteres interessantes Untersuchungsgebiet wären Studien, die sich mit der Struktur modifizierter Glykane und dem Einfluss von MGE auf das Glykom von Zellen, Geweben und Organen befassen. Hierbei spielt nicht nur die Spezifität individueller STs eine bedeutende Rolle, sondern auch der Metabolismus von *N*-Acyl-Seitenketten-modifizierten ManNAc-Analoga im Roseman-Warren-Biosyntheseweg. Weiterhin von Bedeutung sind der Katabolismus und die Wiederverwendung von nichtnatürlichen Sialinsäuren in Glykanen sowie ihre Resistenz gegen eine Abspaltung durch Sialidases.

Forschung über Sialinsäure-bindende Immunglobulinähnliche Lektine (Siglecs) könnte ebenfalls von der Technik des MGE profitieren. Es gibt eine Vielzahl von biologischen Signalwegen und Interaktionen, bei denen die Bindung sialylierter Glykokonjugate an Siglecs eine wichtige Rolle spielt. Viele von diesen sind bis heute noch nicht ausreichend erforscht worden. Erste Untersuchungen zeigen, dass Siglec-Sialinsäure-Interaktionen durch Liganden, die nichtnatürliche Sialinsäuren tragen, beeinflusst werden können (siehe Abschnitte 4.1 und 5.3). MGE könnte in diesem Zusammenhang zur Erklärung der Rolle der *N*-Acyl-Seitenkette von Sialinsäuren bei Siglec-Bindungen beitragen, zur Modulation von spezifischen Siglec-abhängigen Signalwegen genutzt werden oder sogar die Entdeckung neuer Mitglieder der Siglec-Familie ermöglichen.

Angesichts der bisherigen rasanten Entwicklung erwarten wir, dass MGE mit *N*-Acyl-Seitenketten-modifizierten Mannosaminen eine gebräuchliche Methode in einer Vielzahl von Forschungsgebieten werden wird und darüber hinaus in der klinischen Diagnostik und sogar möglicherweise für die Therapie von Erkrankungen genutzt werden kann. Um dies zu erreichen, wird es nötig sein, die Toxizität gegebener und neu entwickelter ManNAc-Analoga *in vivo* zu erforschen.

Ein standardisiertes, leicht einsetzbares Kupplungs- und Visualisierungsverfahren sollte erarbeitet werden, das *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* anwendbar ist.

Wir erhoffen uns, dass MGE von einer breiteren Öffentlichkeit als eine vielseitige Technik zur Modifikation von Glykokonjugaten wahrgenommen wird. Weitere Anwendungen könnten entwickelt werden und dadurch neue biotechnische, diagnostische und sogar therapeutische Möglichkeiten für MGE aufzeigen.

Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (W.R.; R.H.), der „Sonnenfeld Stiftung“ (W.R.), der „Roland und Elfriede Schauer Stiftung“ (W.R.; R.H.) und der „Studienstiftung des deutschen Volkes“ (P.R.W.) für ihre Unterstützung. Wir danken F. A. Troy II für nützliche Diskussionen und dafür, dass er uns half, den Aufsatz an vielen Stellen entscheidend zu verbessern. Des Weiteren danken wie A. K. Späte, V. F. Schart und V. Wittmann für ihre Hilfe bei dem Teil dieses Manuskripts, der sich mit organischer Chemie befasst, und F. Kern sowie Y. Song für ihre Lektoren-Arbeit. Schließlich danken wir L. Horstkorte und A. Richter für ihre Übersetzung des englischen Textes ins Deutsche.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9482–9512
Angew. Chem. **2016**, *128*, 9632–9665

- [1] J. P. Kamerling, G.-J. Boons, Y. C. Lee, A. Suzuki, N. Taniguchi, A. G. J. Voragen, *Comprehensive glycoscience: from chemistry to systems biology Bd. 1*, 1. Aufl., Elsevier, Amsterdam, **2007**.
- [2] R. Schauer, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 507–514.
- [3] A. Varki, *Trends Mol. Med.* **2008**, *14*, 351–360.
- [4] E. Tan, R. T. Almaraz, H. S. Khanna, J. Du, K. J. Yarema, *Curr. Proc. in Chem. Biol.* **2009**, *2*, 171–194.
- [5] S. J. Luchansky, H. C. Hang, E. Saxon, J. R. Grunwell, C. Yu, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Methods Enzymol.* **2003**, *362*, 249–272.
- [6] N. Navabi, M. E. V. Johansson, S. Raghavan, S. K. Lindén, *Infect. Immun.* **2013**, *81*, 829–837.
- [7] A. R. Burnham-Marusich, C. J. Snodgrass, A. M. Johnson, C. M. Kiyoshi, S. E. Buzby, M. R. Gruner, P. M. Berninsone, *PLoS One* **2012**, *7*, e49020.
- [8] H. C. Hang, C. Yu, D. L. Kato, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 14846–14851.
- [9] L. A. Marcarella, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1587–1595.
- [10] R. Sprung, A. Nandi, Y. Chen, S. C. Kim, D. Barma, J. R. Falck, Y. Zhao, *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 950–957.
- [11] K. N. Chuh, B. W. Zaro, F. Piller, V. Piller, M. R. Pratt, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12283–12295.
- [12] C. Hart, L. Chase, M. Hajivandi, B. Agnew in *Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications*, Bd. 698 (Hrsg.: M. Vemuri, L. G. Chase, M. S. Rao), Humana, Totowa, **2011**, S. 459–484.
- [13] B. Zaro, H. Hang, M. Pratt in *Mass Spectrometry of Glycoproteins*, Bd. 951 (Hrsg.: J. J. Kohler, S. M. Patrie), Humana, Totowa, **2013**, S. 57–67.
- [14] E. Fugier, A. Dumont, A. Malleron, E. Poquet, J. M. Pons, A. Baron, B. Vauzeilles, S. Dukan, *PLoS One* **2015**, *10*, e0127700.
- [15] P. V. Chang, J. A. Prescher, M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8400–8401.
- [16] R. Daniellou, D. R. J. Palmer, *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 2145–2150.
- [17] L. Lu, J. Gao, Z. Guo, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 9679–9682; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 9815–9818.
- [18] R. Schauer, S. Kelm, G. Reuter, P. Roggentin, L. Shaw, *Biochemistry and role of sialic acids*, Plenum, New York, **1995**.
- [19] G. Reuter, H. J. Gabius, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1996**, *377*, 325–342.
- [20] T. Angata, A. Varki, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 439–469.
- [21] J. Du, M. A. Meledeo, Z. Wang, H. S. Khanna, V. D. P. Panchururi, K. J. Yarema, *Glycobiology* **2009**, *19*, 1382–1401.
- [22] M. Schwarzkopf, K. P. Knobeloch, E. Rohde, S. Hinderlich, N. Wiechens, L. Lucka, I. Horak, W. Reutter, R. Horstkorte, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5267–5270.
- [23] H. Friebolin, P. Kunzelmann, M. Supp, R. Brossmer, G. Keilich, D. Ziegler, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1383–1386.
- [24] A. Lux, F. Nimmerjahn in *Crossroads between Innate and Adaptive Immunity III*, Bd. 780 (Hrsg.: B. Pulendran, P. D. Katsikis, S. P. Schoenberger), Springer, New York, **2011**, S. 113–124.
- [25] R. Schwartz-Albiez, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2012**, *750*, 27–43.
- [26] S. Böhm, I. Schwab, A. Lux, F. Nimmerjahn, *Semin. Immunopathol.* **2012**, *34*, 443–453.
- [27] A. S. Cross, D. G. Wright, *J. Clin. Invest.* **1991**, *88*, 2067–2076.
- [28] A. S. Cross, S. Sakarya, S. Rifat, T. K. Held, B. E. Drysdale, P. A. Grange, F. J. Cassels, L. X. Wang, N. Stamatos, A. Farese, D. Casey, J. Powell, A. K. Bhattacharjee, M. Kleinberg, S. E. Goldblum, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4112–4120.
- [29] S. Rifat, T. J. Kang, D. Mann, L. Zhang, A. C. Puche, N. M. Stamatos, S. E. Goldblum, R. Brossmer, A. S. Cross, *J. Leukocyte Biol.* **2008**, *84*, 1075–1081.
- [30] S. Sakarya, S. Rifat, J. Zhou, D. D. Bannerman, N. M. Stamatos, A. S. Cross, S. E. Goldblum, *Glycobiology* **2004**, *14*, 481–494.
- [31] A. Woronowicz, S. R. Amith, K. De Vusser, W. Laroy, R. Contreras, S. Basta, M. R. Szewczuk, *Glycobiology* **2007**, *17*, 10–24.
- [32] A. Mountney, M. R. Zahner, I. Lorenzini, M. Oudega, L. P. Schramm, R. L. Schnaar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 11561–11566.
- [33] R. Iijima, H. Takahashi, R. Namme, S. Ikegami, M. Yamazaki, *FEBS Lett.* **2004**, *561*, 163–166.
- [34] C.-H. Ho, S.-P. Hsu, C.-C. Yang, Y.-H. Lee, C.-T. Chien, *Shock* **2009**, *32*, 228–235.
- [35] C.-C. Yang, C.-A. Yao, J.-C. Yang, C.-T. Chien, *Toxicol. Sci.* **2014**, *141*, 155–165.
- [36] S. Inoue, Y. Inoue, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 31863–31870.
- [37] D. Nakata, F. A. Troy, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 38305–38316.
- [38] J. Finne, U. Finne, H. Deagostinibazin, C. Goridis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *112*, 482–487.
- [39] U. Yabe, C. Sato, T. Matsuda, K. Kitajima, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13875–13880.
- [40] C. Zuber, P. M. Lackie, W. A. Catterall, J. Roth, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 9965–9971.
- [41] S. Curreli, Z. Arany, R. Gerardy-Schahn, D. Mann, N. M. Stamatos, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 30346–30356.
- [42] S. P. Galuska, M. Rollenhagen, M. Kaup, K. Eggers, I. Oltmann-Norden, M. Schiff, M. Hartmann, B. Weinhold, H. Hildebrandt, R. Geyer, M. Mühlhoff, H. Geyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 10250–10255.
- [43] E. P. Scheidegger, P. M. Lackie, J. Papay, J. Roth, *Lab. Invest.* **1994**, *70*, 95–106.
- [44] Y. Yoshida, N. Kojima, S. Tsuji, *J. Biochem.* **1995**, *118*, 658–664.
- [45] B. E. Close, K. J. Colley, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 34586–34593.
- [46] M. Eckhardt, M. Mühlhoff, A. Bethe, J. Koopman, M. Frosch, R. Gerardy-Schahn, *Nature* **1995**, *373*, 715–718.
- [47] J. Nakayama, M. N. Fukuda, B. Fredette, B. Ranscht, M. Fukuda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7031–7035.

[48] X. Zhu, Y. Chen, N. Zhang, Z. Zheng, F. Zhao, N. Liu, C. Lv, F. A. Troy, B. Wang, *Glycoconjugate J.* **2015**, *32*, 715–728.

[49] G. Di Cristo, B. Chattopadhyaya, S. J. Kuhlman, Y. Fu, M.-C. Belanger, C. Z. Wu, U. Rutishauser, L. Maffei, Z. J. Huang, *Nat. Neurosci.* **2007**, *10*, 1569–1577.

[50] H. Hildebrandt, C. Becker, M. Mürau, R. Gerardy-Schahn, H. Rahmann, *J. Neurochem.* **1998**, *71*, 2339–2348.

[51] M. Suzuki, K. Angata, J. Nakayama, M. Fukuda, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 49459–49468.

[52] P. M. Drake, J. K. Nathan, C. M. Stock, P. V. Chang, M. O. Muench, D. Nakata, J. R. Reader, P. Gip, K. P. K. Golden, B. Weinhold, R. Gerardy-Schahn, F. A. Troy, C. R. Bertozzi, *J. Immunol.* **2008**, *181*, 6850–6858.

[53] A. Tsuchiya, W.-Y. Lu, B. Weinhold, L. Boulter, B. M. Stutchfield, M. J. Williams, R. V. Guest, S. E. Minnis-Lyons, A. C. MacKinnon, D. Schwarzer, T. Ichida, M. Nomoto, Y. Aoyagi, R. Gerardy-Schahn, S. J. Forbes, *Hepatology* **2014**, *60*, 1727–1740.

[54] P. Simon, C. Feuerstacke, M. Kaese, F. Saboor, R. Middendorff, S. P. Galuska, *PLoS One* **2015**, *10*, e0123960.

[55] R. Horstkorte, M. Schachner, J. P. Magyar, T. Vorherr, B. Schmitz, *J. Cell Biol.* **1993**, *121*, 1409–1421.

[56] R. Sadoul, M. Hirn, H. Deagostinibazin, G. Rougon, C. Goridis, *Nature* **1983**, *304*, 347–349.

[57] U. Rutishauser, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, *8*, 679–684.

[58] R. Horstkorte, N. Lessner, R. Gerardy-Schahn, L. Lucka, K. Danker, W. Reutter, *Exp. Cell Res.* **1999**, *246*, 122–128.

[59] H. Hildebrandt, M. Mühlenhoff, R. Gerardy-Schahn in *Structure and Function of the Neural Cell Adhesion Molecule Ncam*, Bd. 663 (Hrsg.: V. Berezin), Springer, Berlin, **2010**, S. 95–109.

[60] J. Roth, I. Blaha, D. Bittersuermann, P. U. Heitz, *Am. J. Pathol.* **1988**, *133*, 596–608.

[61] S. Lantuejoul, D. Moro, R. Michalides, C. Brambilla, E. Brambilla, *Am. J. Surg. Pathol.* **1998**, *22*, 1267–1276.

[62] C. G. Becker, A. Artola, R. Gerardy-Schahn, T. Decker, H. Welzl, M. Schachner, *J. Neurosci. Res.* **1996**, *45*, 143–152.

[63] S. Glüter, C. Schelp, R. Gerardy-Schahn, D. von Schweinitz, *J. Pediatr. Surg.* **1998**, *33*, 1516–1520.

[64] A. Seifert, D. Glanz, N. Glaubitz, R. Horstkorte, K. Bork, *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *524*, 56–63.

[65] B. D. Livingston, J. L. Jacobs, M. C. Glick, F. A. Troy, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 9443–9448.

[66] F. A. Troy, *Glycobiology* **1992**, *2*, 5–23.

[67] F. Tanaka, Y. Otake, T. Nakagawa, Y. Kawano, R. Miyahara, M. Li, K. Yanagihara, J. Nakayama, I. Fujimoto, K. Ikenaka, H. Wada, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3072–3080.

[68] R. Schauer, *Zoology* **2004**, *107*, 49–64.

[69] A. Varki, *Nature* **2007**, *446*, 1023–1029.

[70] M. Mühlenhoff, M. Rollenhagen, S. Werneburg, R. Gerardy-Schahn, H. Hildebrandt, *Neurochem. Res.* **2013**, *38*, 1134–1143.

[71] M. Luo, *Viral Mol. Machines* **2012**, *726*, 201–221.

[72] U. Neu, H. Hengel, B. S. Blaum, R. M. Schowalter, D. Macejak, M. Gilbert, W. W. Wakarchuk, A. Imamura, H. Ando, M. Kiso, N. Arnberg, R. L. Garcea, T. Peters, C. B. Buck, T. Stehle, *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002738.

[73] S. Kelm, R. Schauer, *Int. Rev. Cytol.* **1997**, *175*, 137–240.

[74] P. Chiodelli, C. Urbinati, S. Mitola, E. Tanghetti, M. Rusnati, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 20456–20466.

[75] N. Izquierdo-Useros, M. Lorizate, M. C. Puertas, M. T. Rodriguez-Plata, N. Zanger, E. Erikson, M. Pino, I. Erkizia, B. Glass, B. Clotet, O. T. Keppler, A. Telenti, H.-G. Kräusslich, J. Martinez-Picado, *PLoS Biol.* **2012**, *10*, e1001448.

[76] J. Mahdavi, B. Sonden, M. Hurtig, F. O. Olfat, L. Forsberg, N. Roche, J. Angstrom, T. Larsson, S. Teneberg, K. A. Karlsson, S. Altraia, T. Wadstrom, D. Kersulyte, D. E. Berg, A. Dubois, C. Petersson, K. E. Magnusson, T. Norberg, F. Lindh, B. B. Lundskog, A. Arqvist, L. Hammarstrom, T. Boren, *Science* **2002**, *297*, 573–578.

[77] S. Schenkman, M. S. Jiang, G. W. Hart, V. Nussenzweig, *Cell* **1991**, *65*, 1117–1125.

[78] A. Varki, *Glycobiology* **1992**, *2*, 25–40.

[79] B. E. Collins, T. J. Fralich, S. Itonori, Y. Ichikawa, R. L. Schnaar, *Glycobiology* **2000**, *10*, 11–20.

[80] A. R. Todeschini, L. Mendonca-Previato, J. O. Previato, A. Varki, H. van Halbeek, *Glycobiology* **2000**, *10*, 213–221.

[81] A. R. Todeschini, M. F. Girard, J. M. Wieruszki, M. P. Nunes, G. A. DosReis, L. Mendonca-Previato, J. O. Previato, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 45962–45968.

[82] C. F. Teo, E. E. Wollaston-Hayden, L. Wells, *Mol. Cell. Endocrinol.* **2010**, *318*, 44–53.

[83] D. G. Comb, S. Roseman, *Biochim. Biophys. Acta* **1958**, *29*, 653–654.

[84] D. G. Comb, S. Roseman, *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 2529–2537.

[85] S. Ghosh, S. Roseman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1961**, *47*, 955–958.

[86] S. Roseman, R. Rood, D. Watson, G. W. Jourdian, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1961**, *47*, 958–961.

[87] L. Warren, R. S. Blacklow, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3527–3534.

[88] L. Warren, H. Felsenfeld, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1961**, *4*, 232–235.

[89] S. Hinderlich, R. Stäsche, R. Zeitler, W. Reutter, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 24313–24318.

[90] R. Stäsche, S. Hinderlich, C. Weise, K. Effertz, L. Lucka, P. Moormann, W. Reutter, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 24319–24324.

[91] K. Effertz, S. Hinderlich, W. Reutter, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 28771–28778.

[92] J. P. Kamerling, G. Strecker, J. P. Farriaux, L. Dorland, J. Haverkamp, J. F. G. Vliegenthart, *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *583*, 403–408.

[93] R. Horstkorte, S. Nöhring, N. Wiechens, M. Schwarzkopf, K. Danker, W. Reutter, L. Lucka, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *260*, 923–927.

[94] L. Lucka, M. Krause, K. Danker, W. Reutter, R. Horstkorte, *FEBS Lett.* **1999**, *454*, 341–344.

[95] H. H. Wang, B. Yu, F. A. Troy, *Curr. Top. Nutraceutical Res.* **2008**, *5*, 165–176.

[96] D. Ghaderi, H. M. Strauss, S. Reinke, S. Cirak, W. Reutter, L. Lucka, S. Hinderlich, *J. Mol. Biol.* **2007**, *369*, 746–758.

[97] G. Weckbecker, D. O. R. Keppler, *Eur. J. Biochem.* **1982**, *128*, 163–168.

[98] C. Sweeney, D. Mackintosh, R. M. Mason, *Biochem. J.* **1993**, *290*, 563–570.

[99] K. Rilla, S. Oikari, T. A. Jokela, J. M. T. Hyttinen, R. Karna, R. H. Tammi, M. I. Tammi, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 5973–5983.

[100] S. Kornfeld, E. F. Neufeld, P. J. O'Brien, R. Kornfeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1964**, *52*, 371–379.

[101] E. Harms, W. Kreisel, H. P. Morris, W. Reutter, *Eur. J. Biochem.* **1973**, *32*, 254–262.

[102] C. Abeijon, J. M. Capasso, C. B. Hirschberg, *J. Chromatogr.* **1986**, *360*, 293–297.

[103] R. Horstkorte, S. Nöhring, K. Danker, K. Effertz, W. Reutter, L. Lucka, *Febs Lett.* **2000**, *470*, 315–318.

[104] C. Oetke, S. Hinderlich, W. Reutter, M. Pawlita, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *308*, 892–898.

[105] R. Zeitler, J. P. Banzer, C. Bauer, W. Reutter, *Biometals* **1992**, *5*, 103–109.

[106] S. Hinderlich, A. Sonnenschein, W. Reutter, *Biometals* **1998**, *11*, 253–258.

[107] K. Schümann, *Z. Ernährungswiss.* **1990**, *29*, 54–73.

[108] O. T. Keppler, S. Hinderlich, J. Langner, R. Schwartz-Albiez, W. Reutter, M. Pawlita, *Science* **1999**, *284*, 1372–1376.

[109] S. Hinderlich, W. Weidemann, T. Yardeni, R. Horstkorte, M. Huizing, *Top. Curr. Chem.* **2013**, *366*, 97–137.

[110] O. Suzuki, K. Tasaki, T. Kusakabe, M. Abe, *Int. J. Mol. Med.* **2008**, 22, 339–348.

[111] S. O. Reinke, G. Lehmer, S. Hinderlich, W. Reutter, *Biol. Chem.* **2009**, 390, 591–599.

[112] E. L. Kean, *Glycobiology* **1991**, 1, 441–447.

[113] E. L. Kean, A. K. Münster-Kühnel, R. Gerardy-Schahn, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2004**, 1673, 56–65.

[114] A. K. Münster, M. Eckhardt, B. Potvin, M. Mühlenhoff, P. Stanley, R. Gerardy-Schahn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 9140–9145.

[115] M. Eckhardt, B. Gotza, R. Gerardy-Schahn, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 8779–8787.

[116] A. Harduin-Lepers, V. Vallejo-Ruiz, M. A. Krzewinski-Recchi, B. Samyn-Petit, S. Julien, P. Delannoy, *Biochimie* **2001**, 83, 727–737.

[117] A. Varki, R. Schauer, *Essentials of Glycobiology*, 2. Aufl. (Hrsg.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko et al.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **2009**, Kap. 14.

[118] F. Wang, B. Xie, B. Wang, F. A. Troy, *Glycobiology* **2015**, 25, 1362–1374.

[119] A. Irie, S. Koyama, Y. Kozutsumi, T. Kawasaki, A. Suzuki, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 15866–15871.

[120] R. Schauer, H. J. Schoop, H. Faillard, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1968**, 349, 645–652.

[121] A. N. Samraj, O. M. T. Pearce, H. Läubli, A. N. Crittenden, A. K. Bergfeld, K. Banda, C. J. Gregg, A. E. Bingman, P. Secrest, S. L. Diaz, N. M. Varki, A. Varki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, 112, 542–547.

[122] G. Ashwell, A. Morell, *Biochem. Soc. Symp.* **1974**, 117–124.

[123] A. G. Morell, R. A. Irvine, Sternlie, I. Scheinbe. Ih, G. Ashwell, *J. Biol. Chem.* **1968**, 243, 155–159.

[124] G. Ashwell, J. Harford, *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, 51, 531–554.

[125] E. Windler, J. Greeve, B. Levkau, V. Kolb-Bachofen, W. Daerr, H. Greten, *Biochem. J.* **1991**, 276, 79–87.

[126] H. Kolb, C. Schudt, V. Kolb-Bachofen, H. A. Kolb, *Exp. Cell Res.* **1978**, 113, 319–325.

[127] J. Schlepper-Schäfer, V. Kolb-Bachofen, *Blood Cells* **1988**, 14, 259–269.

[128] P. H. Roos, H. J. Hartman, J. Schlepper-Schäfer, H. Kolb, V. Kolb-Bachofen, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 847, 115–121.

[129] T. M. Onami, M. Y. Lin, D. M. Page, S. A. Reynolds, C. D. Katayama, J. D. Marth, T. Irimura, A. Varki, N. Varki, S. M. Hedrick, *Mol. Cell. Biol.* **2002**, 22, 5173–5181.

[130] P. Grewal, S. Uchiyama, D. Ditto, N. Varki, D. Le, V. Nizet, J. D. Marth, *Glycobiology* **2009**, 19, 1333.

[131] P. K. Grewal, *Methods Enzymol.* **2010**, 479, 223–241.

[132] J. Dennis, C. Waller, R. Timpl, V. Schirrmacher, *Nature* **1982**, 300, 274–276.

[133] P. Altevogt, M. Fogel, R. Cheingsongpopov, J. Dennis, P. Robinson, V. Schirrmacher, *Cancer Res.* **1983**, 43, 5138–5144.

[134] Y. Zhuo, R. Chammas, S. L. Bellis, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 22177–22185.

[135] Y. Zhuo, S. L. Bellis, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 5935–5941.

[136] C. Büll, M. H. den Brok, G. J. Adema, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2014**, 1846, 238–246.

[137] W. Kreisel, B. A. Volk, R. Büchsel, W. Reutter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 1828–1831.

[138] R. Tauber, C. S. Park, W. Reutter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, 80, 4026–4029.

[139] W. Kreisel, C. Hanski, T. A. Tranthi, N. Katz, K. Decker, W. Reutter, W. Gerok, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 11736–11742.

[140] D. A. Nauman, C. R. Bertozzi, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2001**, 1568, 147–154.

[141] D. Josic, R. Tauber, W. Hofmann, J. Mauck, W. Reutter, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1987**, 25, 869–871.

[142] E. Regoeczi, P. A. Chindemi, *FEBS Lett.* **1987**, 222, 271–274.

[143] B. Volz, G. Orberger, S. Porwoll, H. P. Hauri, R. Tauber, *J. Cell Biol.* **1995**, 130, 537–551.

[144] R. Büchsel, W. Kreisel, B. Fringes, C. Hanski, W. Reutter, W. Gerok, *Eur. J. Cell Biol.* **1986**, 40, 53–57.

[145] R. Tauber, C. S. Park, A. Becker, R. Geyer, W. Reutter, *Eur. J. Biochem.* **1989**, 186, 55–62.

[146] T. Miyagi, K. Yamaguchi, *Glycobiology* **2012**, 22, 880–896.

[147] A. Pshezhetsky, A. Hinek, *Glycoconjugate J.* **2011**, 28, 441–452.

[148] L. Dridi, V. Seyrantepe, A. Fougerat, X. Pan, É. Bonneil, P. Thibault, A. Moreau, G. A. Mitchell, N. Heveker, C. W. Cairo, T. Issad, A. Hinek, A. V. Pshezhetsky, *Diabetes* **2013**, 62, 2338–2346.

[149] S. Porwoll, N. Loch, C. Kannicht, R. Nuck, D. Grunow, W. Reutter, R. Tauber, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 1075–1085.

[150] A. Blume, A. J. Benie, F. Stolz, R. R. Schmidt, W. Reutter, S. Hinderlich, T. Peters, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 55715–55721.

[151] A. J. Benie, A. Blume, R. R. Schmidt, W. Reutter, S. Hinderlich, T. Peters, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 55722–55727.

[152] F. Stolz, M. Reiner, A. Blume, W. Reutter, R. R. Schmidt, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 665–679.

[153] A. Blume, H. Chen, W. Reutter, R. R. Schmidt, S. Hinderlich, *FEBS Lett.* **2002**, 521, 127–132.

[154] L. Pauling, *Chem. Eng. News Arch.* **1946**, 24, 1375–1377.

[155] S. Al-Rawi, S. Hinderlich, W. Reutter, A. Giannis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4366–4370; *Angew. Chem.* **2004**, 116, 4467–4470.

[156] J. Martinez, L. D. Nguyen, S. Hinderlich, R. Zimmer, E. Taugerger, W. Reutter, W. Saenger, H. Fan, S. Moniot, *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 13656–13665.

[157] E. L. Schwartz, A. F. Hadfield, A. E. Brown, A. C. Sartorelli, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, 762, 489–497.

[158] A. K. Sarkar, T. A. Fritz, W. H. Taylor, J. D. Esko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 3323–3327.

[159] A. K. Sarkar, J. R. Brown, J. D. Esko, *Carbohydr. Res.* **2000**, 329, 287–300.

[160] M. B. Jones, H. Teng, J. K. Rhee, N. Lahar, G. Baskaran, K. J. Yarema, *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, 85, 394–405.

[161] O. Nieto-Garcia, P. R. Wratil, L. D. Nguyen, V. Böhrsch, S. Hinderlich, W. Reutter, C. P. R. Hackenberger, *Chem. Sci.* **2016**, 7, 3928–3933.

[162] P. R. Wratil, S. Rigol, B. Solecka, G. Kohla, C. Kannicht, W. Reutter, A. Giannis, L. D. Nguyen, *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 32056–32063.

[163] H.-J. Grünholz, E. Harms, M. Opitz, W. Reutter, M. Černý, *Carbohydr. Res.* **1981**, 96, 259–270.

[164] J. Aretz, P. R. Wratil, E.-C. Wamhoff, H. G. Nguyen, W. Reutter, C. Rademacher, *Can. J. Chem.* **2016**, DOI: 10.1139/cjc-2015-0603.

[165] B. Mathew, R. R. Schmidt, *Carbohydr. Res.* **2007**, 342, 558–566.

[166] C. D. Rillahan, S. J. Brown, A. C. Register, H. Rosen, J. C. Paulson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 12534–12537; *Angew. Chem.* **2011**, 123, 12742–12745.

[167] C. D. Rillahan, A. Antonopoulos, C. T. Lefort, R. Sonon, P. Azadi, K. Ley, A. Dell, S. M. Haslam, J. C. Paulson, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8, 661–668.

[168] M. S. Macauley, B. M. Arlian, C. D. Rillahan, P.-C. Pang, N. Bortell, M. C. G. Marcondes, S. M. Haslam, A. Dell, J. C. Paulson, *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 35149–35158.

[169] J. J. Preidl, V. S. Gnanapragassam, M. Lisurek, J. Saupe, R. Horstkorte, J. Rademann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 5700–5705; *Angew. Chem.* **2014**, 126, 5808–5813.

[170] E. Hultsch, W. Reutter, K. Decker, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, 273, 132–140.

[171] H. Kayser, R. Zeitler, C. Kannicht, D. Grunow, R. Nuck, W. Reutter, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 16934–16938.

[172] H. Kayser, C. Ats, J. Lehmann, W. Reutter, *Experientia* **1993**, 49, 885–887.

[173] O. T. Keppler, R. Horstkorte, M. Pawlita, C. Schmidt, W. Reutter, *Glycobiology* **2001**, *11*, 11R–18R.

[174] D. Gagiannis, R. Gossrau, W. Reutter, M. Zimmermann-Kordmann, R. Horstkorte, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2007**, *1770*, 297–306.

[175] C. L. Jacobs, S. Goon, K. J. Yarema, S. Hinderlich, H. C. Hang, D. H. Chai, C. R. Bertozzi, *Biochemistry* **2001**, *40*, 12864–12874.

[176] P. Chefalo, Y. B. Pan, N. Nagy, Z. W. Guo, C. V. Harding, *Biochemistry* **2006**, *45*, 3733–3739.

[177] L. Dafik, M. O’Alarcao, K. Kumar, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5945–5947.

[178] K. J. Yarema, L. K. Mahal, R. E. Bruehl, E. C. Rodriguez, C. R. Bertozzi, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 31168–31179.

[179] D. J. Vocadlo, H. C. Hang, E. J. Kim, J. A. Hanover, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9116–9121.

[180] D. Keppler, *Ann. Gastroenterol. Hepatol.* **1973**, 211–221.

[181] C. H. Bauer, R. Lukasche, W. G. Reutter, *Biochem. J.* **1974**, *142*, 221–230.

[182] P. Stehling, S. Grams, R. Nuck, D. Grunow, W. Reutter, M. Gohlke, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *263*, 76–80.

[183] L. A. Bateman, B. W. Zaro, K. N. Chuh, M. R. Pratt, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4328–4330.

[184] O. T. Keppler, P. Stehling, M. Herrmann, H. Kayser, D. Grunow, W. Reutter, M. Pawlita, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 1308–1314.

[185] H. J. Gross, A. Bunsch, J. C. Paulson, R. Brossmer, *Eur. J. Biochem.* **1987**, *168*, 595–602.

[186] G. Herrler, H. J. Gross, A. Imhof, R. Brossmer, G. Milks, J. C. Paulson, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 12501–12505.

[187] R. Brossmer, H. J. Gross, *Neoglycoconjugates Part B* **1994**, *247*, 153–176.

[188] H. J. Groß, R. Brossmer, *Glycoconjugate J.* **1995**, *12*, 739–746.

[189] R. Brossmer, U. Rose, D. Kasper, T. L. Smith, H. Grasmuk, F. M. Unger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *96*, 1282–1289.

[190] A. Homann, R.-u. Qamar, S. Serim, P. Dersch, J. Seibel, *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 24.

[191] C. Oetke, S. Hinderlich, R. Brossmer, W. Reutter, M. Pawlita, O. T. Keppler, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 4553–4561.

[192] L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, *Science* **1997**, *276*, 1125–1128.

[193] N. W. Charter, L. K. Mahal, D. E. Koshland, C. R. Bertozzi, *Glycobiology* **2000**, *10*, 1049–1056.

[194] S. Goon, B. Schilling, M. V. Tullius, B. W. Gibson, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3089–3094.

[195] K. J. Yarema, *Biotechniques* **2001**, *31*, 384–393.

[196] J. J. Rodriguez, M. F. Montaron, K. G. Petry, C. Aurousseau, M. Marinelli, S. Premier, G. Rougon, M. Le Moal, D. N. Abrous, *Eur. J. Neurosci.* **1998**, *10*, 2994–3006.

[197] H. Chen, M. B. Jones, H. Teng, J. K. Rhee, G. Baskaran, N. Lahar, K. J. Yarema, *Glycobiology* **2002**, *12*, 700–701.

[198] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007–2010.

[199] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13–21.

[200] A. L. Handlon, N. J. Oppenheimer, *Pharm. Res.* **1988**, *5*, 297–299.

[201] R. J. Griffin, *Prog. Med. Chem.* **1994**, *31*, 121–232.

[202] J. A. Prescher, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nature* **2004**, *430*, 873–877.

[203] S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science* **2008**, *320*, 664–667.

[204] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108–7133.

[205] G. A. Lemieux, C. L. de Graffenreid, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4708–4709.

[206] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644–648.

[207] M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3106–3116; *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3168–3178.

[208] V. Hong, S. I. Presolski, C. Ma, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9879–9883; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 10063–10067.

[209] V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1912–1916.

[210] D. S. del Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. C. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. L. Marlow, P. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16893–16899.

[211] C. Besanceney-Webler, H. Jiang, T. Zheng, L. Feng, D. S. del Amo, W. Wang, L. M. Klivansky, F. L. Marlow, Y. Liu, P. Wu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8051–8056; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 8201–8206.

[212] K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 19–24.

[213] P. V. Chang, J. A. Prescher, E. M. Sletten, J. M. Baskin, I. A. Miller, N. J. Agard, A. Lo, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1821–1826.

[214] J. Dommerholt, O. van Rooijen, A. Borrman, C. F. Guerra, F. M. Bickelhaupt, F. L. van Delft, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5378.

[215] N. E. Mbua, J. Guo, M. A. Wolfert, R. Steet, G.-J. Boons, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1912–1921.

[216] A. Niederwieser, A.-K. Späte, L. D. Nguyen, C. Juengst, W. Reutter, V. Wittmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4265–4268; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 4359–4363.

[217] A.-K. Späte, V. F. Schart, S. Schöllkopf, A. Niederwieser, V. Wittmann, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 16502–16508.

[218] C. M. Cole, J. Yang, J. Šečkuté, N. K. Devaraj, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 205–208.

[219] A.-K. Späte, H. Bußkamp, A. Niederwieser, V. F. Schart, A. Marx, V. Wittmann, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 147–154.

[220] D. M. Patterson, K. A. Jones, J. A. Prescher, *Mol. BioSyst.* **2014**, *10*, 1693–1697.

[221] Y. A. Wainman, A. A. Neves, S. Stairs, H. Stöckmann, H. Ireland-Zecchini, K. M. Brindle, F. J. Leeper, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7297–7300.

[222] S. T. Laughlin, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 12–17.

[223] A.-K. Späte, V. F. Schart, S. Schöllkopf, A. Niederwieser, V. Wittmann, *Chemistry* **2014**, *20*, 16502–16508.

[224] D.-C. Xiong, J. Zhu, M.-J. Han, H.-X. Luo, C. Wang, Y. Yu, Y. Ye, G. Tai, X.-S. Ye, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 3911–3917.

[225] D. M. Patterson, L. A. Nazarova, B. Xie, D. N. Kamber, J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18638–18643.

[226] H.-W. Shih, J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 10036–10039.

[227] S. Stairs, A. A. Neves, H. Stöckmann, Y. A. Wainman, H. Ireland-Zecchini, K. M. Brindle, F. J. Leeper, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1063–1067.

[228] L. I. Willems, M. Verdoes, B. I. Florea, G. A. van der Marel, H. S. Overkleft, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1769–1781.

[229] J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. A. Hendriks, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl, F. L. van Delft, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422–9425; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 9612–9615.

[230] Y. Tanaka, J. J. Kohler, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3278–3279.

[231] M. R. Bond, H. Zhang, P. D. Vu, J. J. Kohler, *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 1044–1063.

[232] E. Saxon, S. J. Luchansky, H. C. Hang, C. Yu, S. C. Lee, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14893–14902.

[233] J. Wang, B. Cheng, J. Li, Z. Zhang, W. Hong, X. Chen, P. R. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 5364–5368; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 5454–5458.

[234] J. Mulzer, C. Seitz, W. Reutter, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 957–960.

[235] H. Möller, V. Böhrsch, J. Bentrop, J. Bender, S. Hinderlich, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5986–5990; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6088–6092.

[236] R. Xie, S. Hong, L. Feng, J. Rong, X. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9914–9917.

[237] L. Feng, S. Hong, J. Rong, Q. You, P. Dai, R. Huang, Y. Tan, W. Hong, C. Xie, J. Zhao, X. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9244–9247.

[238] M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 920–922; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 944–946.

[239] L. I. Willems, N. Li, B. I. Florea, M. Ruben, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4431–4434; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4507–4510.

[240] S. G. Sampathkumar, A. V. Li, M. B. Jones, Z. H. Sun, K. J. Yarema, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 149–152.

[241] S. G. Sampathkumar, M. B. Jones, K. J. Yarema, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1840–1851.

[242] J. Du, P. L. Che, U. Aich, E. Tan, H. J. Kim, S. G. Sampathkumar, K. J. Yarema, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4980–4984.

[243] R. T. Almaraz, Y. Tian, R. Bhattacharya, E. Tan, S. H. Chen, M. R. Dallas, L. Chen, Z. Zhang, H. Zhang, K. Konstantopoulos, K. J. Yarema, *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, DOI: 10.1074/mcp.M112.017558.

[244] M. Howarth, A. Y. Ting, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 127–128.

[245] Z. Hua, A. Lvov, T. J. Morin, W. R. Kobertz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5021–5024.

[246] E. Harms, W. Reutter, *Cancer Res.* **1974**, *34*, 3165–3172.

[247] R. J. Bernacki, U. Kim, *Science* **1977**, *195*, 577–580.

[248] W. Zou, S. Borrelli, M. Gilbert, T. M. Liu, R. A. Pon, H. J. Jennings, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 25390–25399.

[249] R. Horstkorte, H. Y. Lee, L. Lucka, K. Danker, L. Mantey, W. Reutter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *283*, 31–35.

[250] E. J. Kim, S. G. Sampathkumar, M. B. Jones, J. K. Rhee, G. Baskaran, S. Goon, K. J. Yarema, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 18342–18352.

[251] C. T. Campbell, S. G. Sampathkumar, K. J. Yarema, *Mol. Bio-Syst.* **2007**, *3*, 187–194.

[252] U. Aich, C. T. Campbell, N. Elmouelhi, C. A. Weier, S. G. Sampathkumar, S. S. Choi, K. J. Yarema, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 230–240.

[253] C. T. Campbell, U. Aich, C. A. Weier, J. J. Wang, S. S. Choi, M. M. Wen, K. Maisel, S. G. Sampathkumar, K. J. Yarema, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 8135–8147.

[254] N. Elmouelhi, U. Aich, V. D. P. Paruchuri, M. A. Meledeo, C. T. Campbell, J. J. Wang, R. Srinivas, H. S. Khanna, K. J. Yarema, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2515–2530.

[255] Z. Y. Wang, J. Du, P. L. Che, M. A. Meledeo, K. J. Yarema, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 565–572.

[256] J. M. Coburn, N. Bernstein, R. Bhattacharya, U. Aich, K. J. Yarema, J. H. Elisseeff, *PLoS One* **2013**, *8*, 11.

[257] J. M. Coburn, L. Wo, N. Bernstein, R. Bhattacharya, U. Aich, C. O. Bingham, K. J. Yarema, J. H. Elisseeff, *Tissue Eng. Part A* **2013**, *19*, 2035–2044.

[258] R. Schauer, *Glycoconjugate J.* **2000**, *17*, 485–499.

[259] A. T. H. Burness, I. U. Pardoe, *J. Gen. Virol.* **1981**, *55*, 275–288.

[260] H. Blanchard, X. Yu, B. S. Coulson, M. von Itzstein, *J. Mol. Biol.* **2007**, *367*, 1215–1226.

[261] U. Neu, J. Bauer, T. Stehle, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, *21*, 610–618.

[262] X. Yu, V. T. Dang, F. E. Fleming, M. von Itzstein, B. S. Coulson, H. Blanchard, *J. Virol.* **2012**, *86*, 13456–13466.

[263] J. E. Stencel-Baerenwald, K. Reiss, D. M. Reiter, T. Stehle, T. S. Dermody, *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 739–749.

[264] L. J. Ströh, U. Neu, B. S. Blaum, M. H. C. Buch, R. L. Garcea, T. Stehle, *J. Virol.* **2014**, *88*, 10831–10839.

[265] E. Villar, I. M. Barroso, *Glycoconjugate J.* **2006**, *23*, 5–17.

[266] F. Lehmann, E. Tiralongo, J. Tiralongo, *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 1331–1354.

[267] J. C. Paulson, R. P. de Vries, *Virus Res.* **2013**, *178*, 99–113.

[268] S. Kelm, J. C. Paulson, U. Rose, R. Brossmer, W. Schmid, B. P. Bandgar, E. Schreiner, M. Hartmann, E. Zbiral, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *205*, 147–153.

[269] L. D. Cahan, R. Singh, J. C. Paulson, *Virology* **1983**, *130*, 281–289.

[270] T. Stehle, Y. W. Yan, T. L. Benjamin, S. C. Harrison, *Nature* **1994**, *369*, 160–163.

[271] T. Stehle, S. C. Harrison, *Structure* **1996**, *4*, 183–194.

[272] G. Haun, O. T. Keppler, C. T. Bock, M. Herrmann, H. Zentgraf, M. Pawlita, *J. Virol.* **1993**, *67*, 7482–7492.

[273] L. Sinibaldi, P. Goldoni, V. Pietropaolo, C. Longhi, N. Orsi, *Arch. Virol.* **1990**, *113*, 291–296.

[274] M. Herrmann, C. W. von der Lieth, P. Stehling, W. Reutter, M. Pawlita, *J. Virol.* **1997**, *71*, 5922–5931.

[275] W. Weis, J. H. Brown, S. Cusack, J. C. Paulson, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Nature* **1988**, *333*, 426–431.

[276] S. J. Watowich, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Structure* **1994**, *2*, 719–731.

[277] H. H. Higa, G. N. Rogers, J. C. Paulson, *Virology* **1985**, *144*, 279–282.

[278] K. Mrkoci, S. Kelm, P. R. Crocker, R. Schauer, E. G. Berger, *Glycoconjugate J.* **1996**, *13*, 567–573.

[279] M. N. Matrosovich, A. S. Gambaryan, A. B. Tuzikov, N. E. Byramova, L. V. Mochalova, A. A. Golbraikh, M. D. Shendrovich, J. Finne, N. V. Bovin, *Virology* **1993**, *196*, 111–121.

[280] N. K. Sauter, J. E. Hanson, G. D. Glick, J. H. Brown, R. L. Crowther, S. J. Park, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9609–9621.

[281] R. Vlasak, W. Luytjes, W. Spaan, P. Palese, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 4526–4529.

[282] O. T. Keppler, M. Herrmann, C. W. von der Lieth, P. Stehling, W. Reutter, M. Pawlita, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *253*, 437–442.

[283] W. B. Puryear, H. Akiyama, S. D. Geer, N. P. Ramirez, X. Yu, B. M. Reinhard, S. Gummuluru, *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003291.

[284] N. Izquierdo-Useros, M. Lorizate, P. J. McLaren, A. Telenti, H.-G. Kräusslich, J. Martinez-Picado, *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004146.

[285] T. B. H. Geijtenbeek, Y. van Kooyk, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2003**, *276*, 31–54.

[286] E. Erikson, P. R. Wratil, M. Frank, I. Ambiel, K. Pahnke, M. Pino, P. Azadi, N. Izquierdo-Useros, J. Martinez-Picado, C. Meier, R. L. Schnaar, P. R. Crocker, W. Reutter, O. T. Keppler, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 27345–27359.

[287] G. T. Barry, W. F. Goebel, *Nature* **1957**, *179*, 206.

[288] C. W. De Dewitt, J. A. Rowe, *Nature* **1959**, *184*, 381–382.

[289] S. J. N. Devi, R. Schneerson, W. Egan, W. F. Vann, J. B. Robbins, J. Shiloach, *Infect. Immun.* **1991**, *59*, 732–736.

[290] F. A. Troy in *Biology of the Sialic Acids* (Hrsg.: A. Rosenberg), Springer, New York, **1995**, S. 95–144.

[291] F. A. Wyle, E. C. Tramont, J. P. Lowenthal, S. L. Berman, B. L. Brandt, P. L. Altieri, M. S. Artenstein, D. L. Kasper, *J. Infect. Dis.* **1972**, *126*, 514–521.

[292] E. Severi, D. W. Hood, G. H. Thomas, *Microbiology* **2007**, *153*, 2817–2822.

[293] E. R. Vimr, K. A. Kalivoda, E. L. Deszo, S. M. Steenbergen, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2004**, *68*, 132–153.

[294] M. P. Mathew, E. Tan, S. Shah, R. Bhattacharya, M. A. Meledeo, J. Huang, F. A. Espinoza, K. J. Yarema, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6929–6933.

[295] B. Schilling, S. Goon, N. M. Samuels, S. P. Gaucher, J. A. Leary, C. R. Bertozzi, B. W. Gibson, *Biochemistry* **2001**, *40*, 12666–12677.

[296] J. Plumbridge, E. Vimr, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 47–54.

[297] E. Vimr, C. Lichtensteiger, S. Steenbergen, *Mol. Microbiol.* **2000**, *36*, 1113–1123.

[298] E. Vimr, C. Lichtensteiger, *Trends Microbiol.* **2002**, *10*, 254–257.

[299] S. M. Spinola, A. Orazi, J. N. Arno, K. Fortney, P. Kotylo, C. Y. Chen, A. A. Campagnari, A. F. Hood, *J. Infect. Dis.* **1996**, *173*, 394–402.

[300] M. J. Alfa, P. DeGagne, *Microb. Pathog.* **1997**, *22*, 39–46.

[301] B. W. Gibson, A. A. Campagnari, W. Melaugh, N. J. Phillips, M. A. Apicella, S. Grass, J. Wang, K. L. Palmer, R. S. Munson, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 5062–5071.

[302] W. Melaugh, N. J. Phillips, A. A. Campagnari, M. V. Tullius, B. W. Gibson, *Biochemistry* **1994**, *33*, 13070–13078.

[303] W. Melaugh, A. A. Campagnari, B. W. Gibson, *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 564–570.

[304] R. E. Mandrell, R. McLaughlin, Y. Abukwaik, A. Lesse, R. Yamasaki, B. Gibson, S. M. Spinola, M. A. Apicella, *Infect. Immun.* **1992**, *60*, 1322–1328.

[305] K. Jann, B. Jann, *Can. J. Microbiol.* **1992**, *38*, 705–710.

[306] E. Vimr, S. Steenbergen, M. Cieslewicz, *J. Ind. Microbiol.* **1995**, *15*, 352–360.

[307] A. K. Bhattacharjee, H. J. Jennings, C. P. Kenny, A. Martin, I. C. P. Smith, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 1926–1932.

[308] M. C. J. Maiden, A. B. Ibarz-Pavon, R. Urwin, S. J. Gray, N. J. Andrews, S. C. Clarke, A. M. Walker, M. R. Evans, J. S. Kroll, K. R. Neal, D. A. A. Ala'Aldeen, D. W. Crook, K. Cann, S. Harrison, R. Cunningham, D. Baxter, E. Kaczmarski, J. MacLennan, J. C. Cameron, J. M. Stuart, *J. Infect. Dis.* **2008**, *197*, 737–743.

[309] M. P. Girard, M. P. Preziosi, M. T. Aguado, M. P. Kiény, *Vaccine* **2006**, *24*, 4692–4700.

[310] W. Egan, T. Y. Liu, D. Dorow, J. S. Cohen, J. D. Robbins, E. C. Gotschlich, J. B. Robbins, *Biochemistry* **1977**, *16*, 3687–3692.

[311] G. T. Barry, *Nature* **1959**, *183*, 117–118.

[312] C. Adlam, J. M. Knights, A. Mugridge, J. M. Williams, J. C. Lindon, *FEMS Microbiol. Lett.* **1987**, *42*, 23–25.

[313] H. J. Jennings, R. Roy, A. Gamian, *J. Immunol.* **1986**, *137*, 1708–1713.

[314] H. J. Jennings, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1988**, *228*, 495–550.

[315] J. Hayrin, H. Jennings, H. V. Raff, G. Rougon, N. Hanai, R. Gerardy-Schahn, J. Finne, *J. Infect. Dis.* **1995**, *171*, 1481–1490.

[316] H. J. Jennings, A. Gamian, F. Michon, F. E. Ashton, *J. Immunol.* **1989**, *142*, 3585–3591.

[317] P. C. Fusco, F. Michon, J. Y. Tai, M. S. Blake, *J. Infect. Dis.* **1997**, *175*, 364–372.

[318] R. A. Pon, M. Lussier, Q. L. Yang, H. J. Jennings, *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 1929–1938.

[319] A. B. Yongye, J. Gonzalez-Outeiriño, J. Glushka, V. Schultheis, R. J. Woods, *Biochemistry* **2008**, *47*, 12493–12514.

[320] G. R. Moe, T. S. Bhandari, B. A. Flitter, *J. Immunol.* **2009**, *182*, 6610–6617.

[321] M. P. Barrett, R. J. S. Burchmore, A. Stich, J. O. Lazzari, A. C. Frasch, J. J. Cazzulo, S. Krishna, *Lancet* **2003**, *362*, 1469–1480.

[322] A. P. Corfield, H. Higa, J. C. Paulson, R. Schauer, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *744*, 121–126.

[323] S. S. C. De-Rubin, S. Schenkman, *Cell. Microbiol.* **2012**, *14*, 1522–1530.

[324] R. P. Muia, H. Yu, J. A. Prescher, U. Hellman, X. Chen, C. R. Bertozzi, O. Campetella, *Glycobiology* **2010**, *20*, 833–842.

[325] S. Schenkman, M. A. J. Ferguson, N. Heise, M. L. C. de Almeida, R. A. Mortara, N. Yoshida, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1993**, *59*, 293–303.

[326] J. Mucci, M. G. Risso, M. S. Leguizamón, A. C. C. Frasch, O. Campetella, *Cell. Microbiol.* **2006**, *8*, 1086–1095.

[327] V. L. Campo, R. Sesti-Costa, Z. A. Carneiro, J. S. Silva, S. Schenkman, I. Carvalho, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 145–156.

[328] M. V. Tribulatti, J. Mucci, N. Van Rooijen, M. S. Leguizamón, O. Campetella, *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 201–207.

[329] S. Yacoub, A. O. Mocumbi, M. H. Yacoub, *Heart* **2008**, *94*, 244–248.

[330] M. L. Montpetit, P. J. Stocker, T. A. Schwetz, J. M. Harper, S. A. Norring, L. Schaffer, S. J. North, J. Jang-Lee, T. Gilmartin, S. R. Head, S. M. Haslam, A. Dell, J. D. Marth, E. S. Bennett, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 16517–16522.

[331] M. V. Chuenkova, M. A. Pereira, *Mol. Brain Res.* **2003**, *119*, 50–61.

[332] S. Buchini, A. Buschiazza, S. G. Withers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2700–2703; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2740–2743.

[333] S. T. Carvalho, M. Sola-Penna, I. A. Oliveira, S. Pita, A. S. Goncalves, B. C. Neves, F. R. Sousa, L. Freire-de-Lima, M. Kuroguchi, H. Hinou, S.-I. Nishimura, L. Mendonca-Previato, J. O. Previato, A. R. Todeschini, *Glycobiology* **2010**, *20*, 1034–1045.

[334] T. Lieke, D. Gröbe, V. Blanchard, D. Grunow, R. Tauber, M. Zimmermann-Kordmann, T. Jacobs, W. Reutter, *Glycoconjugate J.* **2011**, *28*, 31–37.

[335] S. Chen, M. Fukuda, *Methods Enzymol.* **2006**, *416*, 371–380.

[336] A. Samraj, H. Läubli, N. Varki, A. Varki, *Frontiers Oncol.* **2014**, *4*, 83.

[337] S. L. Zhang, C. Cordon-Cardo, H. S. Zhang, V. E. Reuter, S. Adluri, W. B. Hamilton, K. O. Lloyd, P. O. Livingston, *Int. J. Cancer* **1997**, *73*, 42–49.

[338] S. Hakomori, *Annu. Rev. Immunol.* **1984**, *2*, 103–126.

[339] W. G. Dippold, K. O. Lloyd, L. T. C. Li, H. Ikeda, H. F. Oettgen, L. J. Old, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 6114–6118.

[340] R. J. Bitton, M. D. Guthmann, M. R. Gabri, A. J. L. Carnero, D. F. Alonso, L. Fainboim, D. E. Gomez, *Oncol. Rep.* **2002**, *9*, 267–276.

[341] M. D. Guthmann, M. A. Castro, G. Cinat, C. Venier, L. Koliren, R. J. Bitton, A. M. Vazquez, L. Fainboim, *J. Immunother.* **2006**, *29*, 215–223.

[342] P. Chefalo, Y. Pan, N. Nagy, C. Harding, Z. Guo, *Glycoconjugate J.* **2004**, *20*, 407–414.

[343] Y. B. Pan, P. Chefalo, N. Nagy, C. Harding, Z. W. Guo, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 875–883.

[344] L. Qiu, J. Li, S. Yu, Q. Wang, Y. Li, Z. Hu, Q. Wu, Z. Guo, J. Zhang, *Oncotarget* **2015**, *6*, 5195–5203.

[345] L. Daniel, P. Durbec, E. Gautherot, E. Rouvier, G. Rougon, D. Figarella-Branger, *Oncogene* **2001**, *20*, 997–1004.

[346] D. T. Theodosis, G. Rougon, D. A. Poulin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 5494–5498.

[347] J. Roth, *Histochem. J.* **1993**, *25*, 687–710.

[348] C. M. Martersteck, N. L. Kedersha, D. A. Drapp, T. G. Tsui, K. J. Colley, *Glycobiology* **1996**, *6*, 289–301.

[349] A. Kloos, N. Woller, E. Gürlevik, C. I. Ureche, J. Niemann, N. Armbrecht, N. T. Martin, R. Geffers, M. P. Manns, R. Gerardy-Schahn, F. Kühnel, *Cancer Immunol. Res.* **2015**, *3*, 751–763.

[350] U. Valentiner, M. Mühlhoff, U. Lehmann, H. Hildebrandt, U. Schumacher, *Int. J. Oncol.* **2011**, *39*, 417–424.

[351] R. A. Pon, N. J. Biggs, H. J. Jennings, *Glycobiology* **2007**, *17*, 249–260.

[352] T. M. Liu, Z. W. Guo, Q. L. Yang, S. Sad, H. J. Jennings, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 32832–32836.

[353] H. Xiong, A.-b. Liang, B. Xiu, J.-f. Fu, Y. Ding, Y.-h. Chen, *Acta Pharmacol. Sin.* **2012**, *33*, 1557–1562.

[354] L. Chen, J. F. Liang, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *81*, 339–345.

[355] V. S. Gnanapragassam, K. Bork, C. E. Galuska, S. P. Galuska, D. Glanz, M. Nagasundaram, M. Bache, D. Vordermark, G.

Kohla, C. Kannicht, R. Schauer, R. Horstkorte, *PLoS One* **2014**, 9, 10.

[356] C. Schmidt, P. Stehling, J. Schnitzer, W. Reutter, R. Horstkorte, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 19146–19152.

[357] C. Schmidt, C. Ohlemeyer, H. Kettenmann, W. Reutter, R. Horstkorte, *FEBS Lett.* **2000**, 478, 276–280.

[358] N. L. Brooks, M. J. Corey, R. A. Schwalbe, *FEBS J.* **2006**, 273, 3287–3300.

[359] T. A. Cartwright, M. J. Corey, R. A. Schwalbe, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2007**, 1770, 666–671.

[360] M. K. Hall, W. Reutter, T. Lindhorst, R. A. Schwalbe, *FEBS Lett.* **2011**, 585, 3322–3327.

[361] B. Büttner, C. Kannicht, C. Schmidt, K. Loster, W. Reutter, H. Y. Lee, S. Nöhring, R. Horstkorte, *J. Neurosci.* **2002**, 22, 8869–8875.

[362] M. Kontou, C. Bauer, W. Reutter, R. Horstkorte, *Glycoconjugate J.* **2008**, 25, 237–244.

[363] E. P. Weledji, J. C. Assob, *Ann. Med. Surg.* **2014**, 3, 77–81.

[364] I. Franceschini, K. Angata, E. Ong, A. Hong, P. Doherty, M. Fukuda, *Glycobiology* **2001**, 11, 231–239.

[365] D. Gagiannis, R. Gossrau, W. Reutter, M. Zimmermann-Kordmann, R. Horstkorte, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2007**, 1770, 297–306.

[366] R. Horstkorte, M. Mühlenhoff, W. Reutter, S. Nöhring, M. Zimmermann-Kordmann, R. Gerardy-Schahn, *Exp. Cell Res.* **2004**, 298, 268–274.

[367] J. Vogt, R. Glumm, L. Schlüter, D. Schmitz, B. R. Rost, N. Streu, B. Rister, B. S. Bharathi, D. Gagiannis, H. Hildebrandt, B. Weinhold, M. Mühlenhoff, T. Naumann, N. E. Savaskan, A. U. Brauer, W. Reutter, B. Heimrich, R. Nitsch, R. Horstkorte, *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, 69, 1179–1191.

[368] G. Koulaxouzidis, W. Reutter, H. Hildebrandt, G. B. Stark, C. Witzel, *J. Neural Transm.* **2015**, 1–9.

[369] K. Bork, C. Kannicht, S. Nöhring, W. Reutter, W. Weidemann, G. W. Hart, R. Horstkorte, *J. Neurosci. Res.* **2008**, 86, 647–652.

[370] B. Strilic, J. Eglinger, M. Krieg, M. Zeeb, J. Axnick, P. Babal, D. J. Müller, E. Lammert, *Current Biol.* **2010**, 20, 2003–2009.

[371] D. O. Croci, J. P. Cerlani, T. Dalotto-Moreno, S. P. Mendez-Huergo, I. D. Mascanfroni, S. Dergan-Dylon, M. A. Toscano, J. J. Caramelo, J. J. Garcia-Vallejo, J. Ouyang, E. A. Mesri, M. R. Juntila, C. Bais, M. A. Shipp, M. Salatino, G. A. Rabionovich, *Cell* **2014**, 156, 744–758.

[372] N. B. Bayer, U. Schubert, Z. Senturk, S. Rudloff, S. Frank, H. Hausmann, H. Geyer, R. Geyer, K. T. Preissner, S. P. Galuska, *Molecules* **2013**, 18, 2571–2586.

[373] P. R. Crocker, J. C. Paulson, A. Varki, *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, 7, 255–266.

[374] R. P. McEver, C. Zhu, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, 26, 363–396.

[375] C. Roehlecke, R. Horstkorte, W. Reutter, *Glycoconjugate J.* **2013**, 30, 813–818.

[376] A. Ulloa-Aguirre, C. Timossi, P. Damian-Matsumura, J. A. Dias, *Endocrine* **1999**, 11, 205–215.

[377] W. Kreisel, W. Reutter, W. Gerok, *Eur. J. Biochem.* **1984**, 138, 435–438.

[378] A. Werner, R. Horstkorte, D. Glanz, K. Biskup, V. Blanchard, M. Berger, K. Bork, *Biol. Chem.* **2012**, 393, 777–783.

[379] W. Weidemann, C. Klukas, A. Klein, A. Simm, F. Schreiber, R. Horstkorte, *Glycobiology* **2010**, 20, 107–117.

[380] R. Sackstein, J. S. Merzaban, D. W. Cain, N. M. Daga, J. A. Spencer, C. P. Lin, R. Wohlgemuth, *Nat. Med.* **2008**, 14, 181–187.

[381] S. P. Thankamony, R. Sackstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 2258–2263.

[382] S. Natunen, M. Lampinen, H. Suila, I. Ritamo, V. Pitkänen, A. V. Nairn, J. Räbinä, S. Laitinen, K. W. Moremen, W. Reutter, L. Valmu, *Glycobiology* **2013**, 23, 1004–1012.

[383] T. Hirvonen, H. Suila, A. Kotovuori, I. Ritamo, A. Heiskanen, P. Sistonen, H. Anderson, T. Satomaa, J. Saarinen, S. Tüttinen, J. Rabina, S. Laitinen, S. Natunen, L. Valmu, *Stem Cells Dev.* **2012**, 21, 455–464.

[384] S. R. Stowell, C. M. Arthur, P. Mehta, K. A. Slanina, O. Blixt, H. Leffler, D. F. Smith, R. D. Cummings, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 10109–10123.

[385] G. A. Rabinovich, M. A. Toscano, *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, 9, 338–352.

[386] R. Horstkorte, K. Rau, W. Reutter, S. Nöhring, L. Lucka, *Exp. Cell Res.* **2004**, 295, 549–554.

[387] S. Wolf, S. Warnecke, J. Ehrit, F. Freiberger, R. Gerardy-Schahn, C. Meier, *ChemBioChem* **2012**, 13, 2605–2615.

[388] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596–2599; *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2708–2711.

[389] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046–15047.

[390] J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1272–1279.

[391] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 666–676.

[392] M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2394–2397; *Angew. Chem.* **2008**, 120, 2428–2431.

[393] F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. van Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2686–2695.

[394] K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang, *Org. Lett.* **2004**, 6, 4603–4606.

[395] A. P. Bussink, P. F. van Swieten, K. Ghauharali, S. Scheij, M. van Eijk, T. Wennekes, G. A. van der Marel, R. G. Boot, J. M. F. G. Aerts, H. S. Overkleef, *J. Lipid Res.* **2007**, 48, 1417–1421.

[396] T.-L. Hsu, S. R. Hanson, K. Kishikawa, S.-K. Wang, M. Sawa, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 2614–2619.

[397] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 16793–16797.

[398] S. T. Laughlin, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2009**, 4, 1068–1072.

[399] M. S. Siegrist, B. M. Swarts, D. M. Fox, S. A. Lim, C. R. Bertozzi, *FEMS Microbiol. Rev.* **2015**, 39, 184–202.

[400] A. Dumont, A. Malleron, M. Awwad, S. Dukan, B. Vauzeilles, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 3143–3146; *Angew. Chem.* **2012**, 124, 3197–3200.

[401] W. Yi, X. Liu, Y. Li, J. Li, C. Xia, G. Zhou, W. Zhang, W. Zhao, X. Chen, P. G. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 4207–4212.

[402] J. M. Pons, A. Dumont, G. Sautejeau, E. Fugier, A. Baron, S. Dukan, B. Vauzeilles, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 1275–1278; *Angew. Chem.* **2014**, 126, 1299–1302.

[403] E. Memmel, A. Homann, T. A. Oelschlaeger, J. Seibel, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 7301–7303.

[404] M. R. Bond, C. M. Whitman, J. J. Kohler, *Mol. BioSyst.* **2010**, 6, 1796–1799.

[405] C. M. Whitman, F. Yang, J. J. Kohler, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 5006–5010.

[406] J. Vanbeselaere, D. Vicogne, G. Matthijs, C. Biot, F. Foulquier, Y. Guerardel, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 11293–11295.

[407] R. K. T. Kam, T. C. W. Poon, H. L. Y. Chan, N. Wong, A. Y. Hui, J. J. Y. Sung, *Clin. Chem.* **2007**, 53, 1254–1263.

[408] S. Wopereis, S. Grünewald, K. M. L. C. Huijben, É. Morava, R. Mollicone, B. G. M. van Engelen, D. J. Lefeber, R. A. Wevers, *Clin. Chem.* **2007**, 53, 180–187.

[409] N. Pham, C. Fermaintt, A. Rodriguez, J. McCombs, N. Nischan, J. Kohler, *Glycoconjugate J.* **2015**, 1–15.

[410] P. A. Gilormini, C. Lion, D. Vicogne, T. Levade, S. Potelle, C. Mariller, Y. Guerardel, C. Biot, F. Foulquier, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 2318–2321.

[411] D. H. Dube, J. A. Prescher, C. N. Quang, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 4819–4824.

[412] H. Jiang, T. Q. Zheng, A. Lopez-Aguilar, L. Feng, F. Kopp, F. L. Marlow, P. Wu, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 698–706.

[413] J. Rong, J. Han, L. Dong, Y. Tan, H. Yang, L. Feng, Q.-W. Wang, R. Meng, J. Zhao, S.-Q. Wang, X. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 17468–17476.

[414] J. Dernedde, C. Weise, E.-C. Müller, A. Hagiwara, S. Bachmann, M. Suzuki, W. Reutter, R. Tauber, H. Scherer, *PLoS One* **2014**, *9*, e111917.

[415] K. W. Dehnert, J. M. Baskin, S. T. Laughlin, B. J. Beahm, N. N. Naidu, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 353–357.

[416] A. A. Neves, H. Stöckmann, R. R. Harmston, H. J. Pryor, I. S. Alam, H. Ireland-Zecchini, D. Y. Lewis, S. K. Lyons, F. J. Leeper, K. M. Brindle, *FASEB J.* **2011**, *25*, 2528–2537.

[417] A. A. Neves, H. Stöckmann, Y. A. Wainman, J. C. H. Kuo, S. Fawcett, F. J. Leeper, K. M. Brindle, *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 934–941.

[418] S.-W. Kang, S. Lee, J. H. Na, H. I. Yoon, D.-E. Lee, H. Koo, Y. W. Cho, S. H. Kim, S. Y. Jeong, I. C. Kwon, K. Choi, K. Kim, *Theranostics* **2014**, *4*, 420–431.

[419] P.-w. Pan, Q. Zhang, J. Hou, Z. Liu, F. Bai, M.-r. Cao, T. Sun, G. Bai, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 1661–1670.

[420] Y. Tian, R. T. Almaraz, C. H. Choi, Q. K. Li, C. Saeui, D. Li, P. Shah, R. Bhattacharya, K. J. Yarema, H. Zhang, *Clin. Proteomics* **2015**, *12*, 11.

[421] X. Li, T. Fang, G.-J. Boons, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7179–7182; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 7307–7310.

[422] H. Koo, S. Lee, J. H. Na, S. H. Kim, S. K. Hahn, K. Choi, I. C. Kwon, S. Y. Jeong, K. Kim, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11836–11840; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 12006–12010.

[423] S. Lee, H. Koo, J. H. Na, S. J. Han, H. S. Min, S. J. Lee, S. H. Kim, S. H. Yun, S. Y. Jeong, I. C. Kwon, K. Choi, K. Kim, *ACS Nano* **2014**, *8*, 2048–2063.

[424] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, *J. Controlled Release* **2000**, *65*, 271–284.

[425] C. Büll, T. Heise, D. M. Beurskens, M. Riemersma, A. Ashikov, F. P. Rutjes, T. H. van Kuppevelt, D. J. Lefebre, M. H. den Brok, G. J. Adema, T. J. Boltje, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 2353–2363.

[426] C. D. Rillahan, E. Schwartz, C. Rademacher, R. McBride, J. Rangarajan, V. V. Fokin, J. C. Paulson, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1417–1422.

[427] Z. Yu, Y. Pan, Z. Wang, J. Wang, Q. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10600–10604; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10752–10756.

[428] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518–13519.

Eingegangen am 31. Januar 2016
Online veröffentlicht am 20. Juli 2016