

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Metabolisches Oligosaccharid-Engineering
membrangebundener Sialinsäuren in hämatopoetischen Zellen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lars Mantey

aus Berlin

Datum der Promotion: 09.09.2016

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde von 1998 bis 2001 am Institut für Molekularbiologie und Biochemie des Fachbereiches Humanmedizin der Freien Universität Berlin unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. med. W. Reutter angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abstrakt	5
Abstract	6
1 Einleitung	7
1.1 Struktur von Sialinsäuren	7
1.2 Metabolismus von Sialinsäuren	9
1.3 Sialinsäuren in Glycokonjugaten	12
1.4 Biologische Funktionen von Sialinsäuren	14
1.5 Metabolisches Oligosaccharid-Engineering	18
1.5.1 Modifizierte Sialinsäuren.....	18
1.5.2 Metabolismus modifizierter Sialinsäuren und ihrer Vorläufer.....	20
1.5.3 Anwendung und biologische Effekte modifizierter Sialinsäuren.....	22
1.6 Zielsetzung der Arbeit	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Material	26
2.1.1 Chemikalien.....	26
2.1.2 Zellen	26
2.1.3 Antikörper und Lektine.....	27
2.2 Methoden	27
2.2.1 Zellkultur	27
2.2.1.1 Kultivierung der Zellen.....	27
2.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	28
2.2.1.3 Bestimmung der Vitalität und Zellzahl.....	29
2.2.1.4 Behandlung der Zellen mit <i>N</i> -Acylmannosaminen	29
2.2.1.5 Behandlung der Zellen mit Sialinsäure-Analoga.....	30
2.2.2 Durchflusszytometrische Analysen	30
2.2.2.1 Fluoreszenzmarkierung von Membranglycokonjugaten mit Lektinen.....	30
2.2.2.2 Fluoreszenzmarkierung von Sialyl-Lewis X-Strukturen (CD15s)	31
2.2.3 Sialidasebehandlung von HL60-Zellen	31
2.2.4 Proteinbestimmung	31
2.2.5 Periodat-Thiobarbitursäure-Assay	32
2.2.6 Chromatographische Methoden.....	32
2.2.6.1 Isolierung von Sialinsäuren aus Membranglycoproteinen.....	34
2.2.6.2 Markierung von Sialinsäuren mit 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzol.....	35
2.2.6.3 Trennung und Quantifizierung modifizierter Sialinsäuren über RP18-HPLC	35
2.2.6.4 Extraktion von CMP-Sialinsäuren	36
2.2.6.5 Trennung von CMP-Sialinsäuren durch HPAEC-PAD	37

2.2.6.6	Bestimmung des relativen Anteils von CMP-Neu5Prop	38
2.3	Mathematisch-statistische Methoden	38
2.3.1	Statistische Auswertung.....	38
2.3.2	Relative Retentionskoeffizienten.....	38
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Modifikation membranständiger Glykokonjugate von HL-60- und BJA-B-Zellen mit N-Propanoylmannosamin	39
3.1.1	Chromatographische Trennung und Quantifizierung modifizierter Sialinsäuren	39
3.1.2	Optimierung der Inkubationszeit zur Maximierung des Anteils modifizierter Sialinsäuren in Membranglycoproteinen.....	39
3.1.3	Optimierung der N-Acylmannosamin-Konzentration zur Maximierung des Anteils modifizierter Sialinsäuren in Membranglycoproteinen	43
3.1.4	Bestimmung des relativen Anteils von Neu5Prop in Membranglycoproteinen	44
3.1.5	Desialylierung und Resialylierung nach ManNProp-Behandlung	45
3.2	Charakterisierung ManNProp-modifizierter Membranglykokonjugate in HL60- und BJA-B-Zellen	45
3.2.1	Bestimmung des Gesamtsialinsäuregehalts in Membranglycoproteinen	45
3.2.3	Bindungsverhalten von Lektinen an Zelloberflächenglykokonjugaten nach Behandlung mit ManNProp.....	46
3.2.3.1	Bindung terminaler Neu5Prop durch LFA	48
3.2.3.2	Expression freier Sialinsäurebindungsstellen in Membranglykokonjugaten.....	49
3.2.4	Änderung der Sialyl-Lewis X-Expression nach N-Acylmannosamin-Behandlung...	52
3.3	Nachweis modifizierter CMP-Sialinsäuren.....	54
3.3.1	Trennung von CMP-Sialinsäuren mittels HPAEC-PAD.....	54
3.3.2	Quantifizierung des CMP-Sialinsäure-Gehalts in HL60- und BJA-B-Subklonen	56
3.3.3	Bestimmung des relativen Anteils modifizierter CMP-Sialinsäuren.....	57
3.4	Aufnahme und Einbau freier Sialinsäureanaloga in Membranglykokonjugate.....	59
3.4.1	Chromatographische Analyse von Sialinsäureanaloga.....	59
3.4.2	Nachweis von Sialinsäureanaloga in Membranglycoproteinen.....	61
4	Diskussion.....	64
5	Zusammenfassung	77
6	Literaturverzeichnis	78
7	Anhang.....	91
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	91
7.2	Eidesstattliche Versicherung	93
7.3	Anteilerklärung Publikationen	94
7.4	Lebenslauf	95
7.5	Publikationsliste.....	97
7.6	Danksagung.....	99

Abstrakt

Einleitung: Sialinsäuren umfassen eine Gruppe von meist terminal gebundenen Aminoazuckern, die an einer Vielzahl von biologischen Prozessen wie der Zellerkennung, Zelladhäsion und Proliferation, aber auch an pathologischen Vorgängen, beispielsweise der Virusbindung oder Tumormetastasierung, beteiligt sind. Beim metabolischen Oligosaccharid-Engineering (MOE) werden modifizierte Sialinsäurevorläufer wie *N*-Propanoylmannosamin (ManNProp) in die zelluläre Sialinsäurebiosynthese eingeschleust, zu modifizierten Sialinsäuren metabolisiert und in Sialoglycane eingebaut. Ziel der Arbeit war die Etablierung eines Zellsystems mit einer nahezu homogenen Population strukturell veränderter Sialinsäuren auf der Zelloberfläche, um den Einfluss modifizierter Sialoglycane auf biologische Vorgänge besser untersuchen zu können.

Methoden: Die hyposialylierten Subklone BJA-B K20 und HL60-I zweier hämatopoetischer Zelllinien, die keine UDP-GlcNAc-2-Epimerase, das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese, exprimieren, wurden wie die normal sialylierten Subklone BJA-B K88 und HL60-II mit 10 mM des natürlichen *N*-Acylmannosamins ManNAc oder des unnatürlichen ManNProp über 72 h inkubiert. Änderungen der Zelloberflächensialylierung und die Inkorporation modifizierter Sialinsäuren wurden mittels HPLC und Durchflusszytometrie bestimmt.

Ergebnisse: Nach Inkubation mit ManNProp enthielten die Membranglycoproteine von HL60-I- und BJA-B K20-Zellen einen Anteil von bis zu 85 % modifizierter Sialinsäuren, die HL60-II und BJA-B K88 jedoch nur 15 % bzw. 56 %. Nach *N*-Acylmannosamin-Behandlung wurde bei den HL60-I-Zellen ein signifikanter Anstieg von Sialyl-Lewis X-Epitopen nachgewiesen. Vergleiche von Änderungen des CMP-Sialinsäure-Gehalts, der Sialyl-Lewis X-Expression sowie der Lektinbindungsmuster von ManNAc- und ManNProp-behandelten Zellen belegen, dass ManNProp von den sonst permissiven Enzymen der CMP-Sialinsäurebiosynthese weniger effizient metabolisiert wurde. Jedoch fanden sich gleichzeitig Hinweise, dass offenbar manche Sialyltransferasen bevorzugt modifizierte CMP-Sialinsäuren übertragen. In dieser Arbeit konnte außerdem die lange infrage gestellte Aufnahme freier Sialinsäureanaloga gezeigt werden. Sialinsäureanaloga mit Modifikationen an C-5 oder C-9 wurden mit einem Anteil von bis zu 95 % in die Membranglycoproteine von HL60-I- und BJA-B K20-Zellen effizient inkorporiert.

Schlussfolgerung: Durch den Einsatz freier Sialinsäureanaloga lässt sich das Spektrum an Modifikationen in Sialoglycanen deutlich erweitern. Die Inkorporation modifizierter *N*-Acylmannosamine sowie freier Sialinsäureanaloga ist abhängig von der Aktivität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase. Das hier etablierte und charakterisierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase-defiziente Zellsystem ist daher für ein effizientes MOE besonders gut geeignet.

Abstract

Introduction: Sialic acids comprise a group of usually terminally bound amino sugars, which are involved in a variety of biological processes such as cell recognition, cell adhesion and proliferation but also in pathological processes such as virus binding and tumor metastasis. Modified sialic acid precursors such as *N*-propanoylmannosamine (ManNProp) are introduced by metabolic oligosaccharide engineering (MOE) into the cellular sialic acid biosynthesis, metabolized to modified sialic acids and incorporated into sialoglycans. Aim of this work was the establishment of a cell system with an almost homogeneous population of structurally altered sialic acids on the cell surface in order to investigate the influence of modified sialoglycans on biological processes.

Methods: The hyposialylated subclones HL60-I and BJA-B K20 of two hematopoietic cell lines that do not express UDP-GlcNAc 2-epimerase, the key enzyme of the sialic acid, were incubated as well as the normally sialylated subclones BJA-B K88 and HL60-II with 10 mM of the natural *N*-acetylmannosamine ManNAc or the unnatural ManNProp for 72 h. Changes in cell surface sialylation and the incorporation of modified sialic acids were determined by HPLC and flow cytometry.

Results: After incubation with ManNProp the membrane glycoproteins of HL60-I and BJA-B K20 cells contained a proportion of up to 85 % of modified sialic acids, but the HL60-II and BJA-B K88 only 15 % and 56 %. After *N*-acetylmannosamine-treatment, a significant increase of sialyl Lewis X epitopes was demonstrated in the HL60-I cells. Comparisons of changes in CMP-sialic acid content, sialyl Lewis X expression and lectin binding patterns of ManNAc- and ManNProp-treated cells demonstrate, that ManNProp was less efficiently metabolized by the enzymes of the otherwise permissive CMP-sialic acid biosynthesis than natural ManNAc. However, also evidence was found that some sialyltransferases apparently preferred to transfer modified CMP-sialic acids. In this work, the long questioned uptake of free sialic acid analogs could also be shown. Sialic acid analogs carrying modifications at C-5 or C-9 were efficiently incorporated resulting in a proportion of up to 95 % of modified sialic acids in membrane glycoproteins of HL60-I and BJA-B K20 cells.

Conclusions: By using free sialic acid analogs the range of modifications in sialoglycans can be significantly expanded. The incorporation of *N*-acetylmannosamine analogs and free sialic acid analogs depends on the activity of UDP-GlcNAc 2-epimerase. The UDP-GlcNAc 2-epimerase-deficient cell system established and characterized in this study is therefore particularly suitable for efficient MOE.

1 Einleitung

Die Struktur eukaryotischer Zellmembranen wird durch eine Vielzahl verschiedener Bausteine bestimmt. Hauptbestandteil sind amphiphile Lipidmoleküle, deren hydrophobe Enden sich gegenüberliegen und eine Lipiddoppelschicht ausbilden. Die hydrophilen Gruppen der Lipidmoleküle zeigen somit nach außen bzw. in das Innere der Zelle. In dieser Lipiddoppelschicht sind integrale Proteine als Struktur- und Funktionsträger enthalten (1). Die essentiellen Membrankomponenten sind in der Regel glycosyliert. Neben Glycoproteinen finden sich auch Glycolipide als Membranbausteine, sodass die Zellmembranen eukaryotischer Zellen einen Kohlenhydratanteil von 2-10 % besitzen (2). Die Oligosaccharide der Zellmembran bilden in ihrer Gesamtheit die sogenannte Glycocalix. Die Zuckerstrukturen der membranären Glykokonjugate sind asymmetrisch verteilt. Bei der Plasmamembran sind sie stets extrazellulär und bei den Membranen der Zellorganellen wie Lysosomen und Endosomen luminal lokalisiert. Die Glycosylierung der Proteine und Lipide trägt wesentlich zu ihren vielseitigen Funktionen und ihrer biologischen Stabilität bei (3).

1.1 Struktur von Sialinsäuren

Innerhalb der Oligosaccharidstrukturen sind die Sialinsäuren als terminale Komponenten der Glykokonjugate von herausragender Bedeutung. Sialinsäuren sind α -Ketosäuren mit einem C-9-Kohlenstoffgerüst, deren Gruppe mehr als 50 verschiedene natürliche Derivate umfasst. Ihr häufigster Vertreter ist die *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) (4). Laut einer früheren Definition verstand man unter Sialinsäuren die Derivate der Neuraminsäure (5-Amino-3,5-didesoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonsäure), kurz Neu. Nach Entdeckung der 2-Keto-3-desoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonsäure (KDN) zählt man auch die Derivate der KDN zu den Sialinsäuren (4, 5).

Die Erforschung der Sialinsäuren geht zurück in die 1930er-Jahre, als Ernst Klenk und Gunnar Blix unabhängig voneinander Sialinsäuren in Glycolipiden von Gehirnen bzw. in Mucinen von Rinderspeicheldrüsen nachwiesen (6, 7). Es dauerte jedoch mehrere Jahre bis klar wurde, dass beide die gleiche Substanz beschrieben hatten (8). Der Begriff Sialinsäure (*gr. sialos* = Speichel) wurde 1957 eingeführt (9). Die Bezeichnung Neuraminsäure stammt von Klenk (10) und leitet sich aus dem Ort ihrer Isolierung sowie ihren chemischen Eigenschaften ab: Neuro + Amin + Säure. Die Aufklärung der Sialinsäurestruktur dauerte mehr als zwei Jahrzehnte und gelang erst

Anfang der 1960er-Jahre (8). Das C-9-Kohlenhydratgrundgerüst ist an der C-2-Position carboxyliert und trägt in der offenen Form eine Ketogruppe an der C-2-Position. Unter physiologischen Bedingungen bilden Sialinsäuren durch intramolekulare Kondensation einen Pyranosering zwischen C-2 und C-6 (11). Die C-5-Position besitzt in der Regel eine Aminofunktion, welche *N*-acyliert ist. Die Ausnahme hiervon stellen Sialinsäuren dar, die sich von der desaminierten KDN ableiten, welche an der C-5-Position eine Hydroxylgruppe trägt (5). Die Carboxylgruppe verleiht dem Molekül unter physiologischen Bedingungen eine negative Ladung und charakterisiert es als starke organische Säure (pK_a 2,2) (12). In Glycokonjugaten liegen Sialinsäuren in der α -Konformation vor, während sich die β -Konformation des anomeren C-2 nur bei freien Sialinsäuren und der aktivierten Form, den CMP-Sialinsäuren, findet (13). Die Kohlenstoffatome in Position C-4, C-7, C-8 und C-9 sind hydroxyliert und können mit unterschiedlichen Substituenten versehen sein. Sie verleihen den Sialinsäuren ein hohes Maß an Vielfalt und sind teilweise für spezifische Funktionen verantwortlich. Als *N*-Substituenten an C-5 wurden bisher Acetyl- und Glycolylgruppen beschrieben. *O*-Acetylierungen gehören zu den häufigsten *O*-Modifikationen und kommen an den Hydroxylgruppen von $R^{4,7,8,9}$ vor (Abb. 1.1). Für R^8 sind außerdem Sulfatyl- und Methylgruppen sowie für R^9 Phosphoryl- und Lactoylgruppen beschrieben (14). Die Modifikationen der Hydroxylgruppen erfolgen im Golgi-Apparat durch verschiedene Enzyme (14). Erst kürzlich konnte der Mechanismus der 9-*O*-Acetylierung von CMP-Sialinsäuren im Golgi-Apparat beschrieben werden (15). Im Gegensatz dazu erfolgt die Bildung der CMP-*N*-Glycolylneuraminsäure (CMP-Neu5Gc) bereits im Cytosol aus CMP-Neu5Ac durch die CMP-Neu5Ac-Hydroxylase (16). Die Diversität der Sialinsäuren wird ergänzt durch ungesättigte und Dehydroformen sowie unterschiedlichen

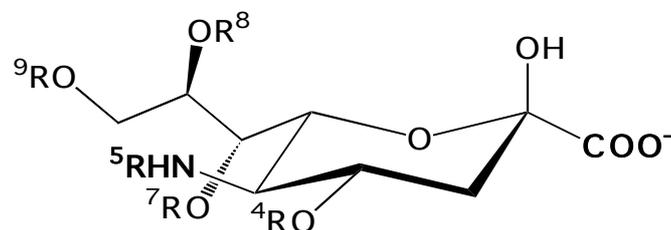


Abb. 1.1 Struktur von Sialinsäuren.

Die von der Neuraminsäure abgeleiteten Sialinsäurederivate sind *N*-acylierte (R^5 = Acetyl- oder Glycolylgruppen) α -Ketosäuren mit Acetyl-, Lactoyl-, Methyl-, Sulfatyl- und Phosphorylgruppen als mögliche *O*-Substituenten (R^4 , R^7 , R^8 , R^9). Bei der Neu5Ac sind die Hydroxylgruppen nicht substituiert. Bei der KDN findet sich keine Aminogruppe an C-5. Abbildung aus Hinderlich (17).

Verknüpfungen zu den darunterliegenden Zuckern der Oligosaccharide (18).

1.2 Metabolismus von Sialinsäuren

Die Sialinsäurebiosynthese in Vertebraten (Abb. 1.2) zweigt vom Aminozuckerstoffwechsel ab und verwendet als Ausgangssubstrat UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc). Aus UDP-GlcNAc erfolgt innerhalb von fünf Schritten die Bildung von CMP-Neu5Ac, die aktivierte Form der Neu5Ac. Die Umwandlung von UDP-GlcNAc zu *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) durch die UDP-GlcNAc-2-Epimerase wird als Ausgangspunkt der Sialinsäurebiosynthese angesehen (19). Eine detaillierte Darstellung des Reaktionsmechanismus findet sich bei Tanner (11). Im nächsten Schritt erfolgt durch die ManNAc-Kinase die Bildung von ManNAc-6-phosphat durch Übertragung des γ -Phosphat vom ATP auf die Hydroxylgruppe des C-6 des ManNAc. Diese ersten beiden Schritte der *de novo*-Synthese von Sialinsäuren werden durch das bifunktionelle Enzym UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (GNE) katalysiert (20, 21), wobei eine N-terminale Epimerase- und eine C-terminale Kinase-Domäne vorliegen. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase katalysiert den Schlüsselschritt der Sialinsäurebiosynthese. Die Bildung von ManNAc aus UDP-GlcNAc stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Sialinsäureproduktion dar (11). Über das Endprodukt CMP-Neu5Ac erfolgt eine allosterische Feedback-Hemmung des Enzyms (22). Bei der Sialurie, einer sehr seltenen Stoffwechselkrankheit, findet sich ein Defekt in der Bindung von CMP-Neu5Ac an die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne der GNE, wodurch es zu einer fehlenden Feedback-Hemmung kommt, die zu einer massiven Produktion und Ausscheidung freier Neu5Ac im Urin führt (23). Die zentrale Rolle der UDP-GlcNAc-2-Epimerase für die Regulation der Sialylierung von Glycoproteinen und Glycolipiden der Plasmamembran konnte durch Arbeiten an hämatopoetischen Zelllinien gezeigt werden, die keine Expression des Enzyms mehr aufwiesen (24). Zahlreiche weitere Regulationsmechanismen der GNE tragen zur Feinregulierung des Sialinsäurestoffwechsels bei. Eine Steigerung der Enzymaktivität wird über eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase C erreicht (25). Die GNE-Expression wird auch epigenetisch reguliert. Die Methylierung der Promotorregion führt zur Reduktion der GNE-mRNA-Expression, wie in einigen Krebszelllinien gezeigt wurde (26), was eine drastische Verminderung der zellulären Sialylierung zur Folge hat. Bei der GNE-Myopathie, früher auch Hereditäre Einschlusskörperchenmyopathie (HIBM) genannt, handelt es sich um eine seltene autosomal-rezessive Muskelerkrankung aufgrund verschiedener bialleler Mutationen im GNE-Gen, die zu einer verminderten Aktivität der GNE führen und von muskulärer Schwäche sowie einem erniedrigten Sialinsäuregehalt im Serum und Skelettmuskel

begleitet sind (27). Der genaue pathophysiologische Zusammenhang zwischen verminderter Aktivität der GNE und Muskelerkrankung ist jedoch noch nicht geklärt.

Im weiteren Verlauf der Sialinsäurebiosynthese kondensiert die Neu5Ac-9-phosphat-Synthase ManNAc-6-phosphat mit Phosphoenolpyruvat zu Neu5Ac-9-phosphat (28). Die Phosphatgruppe des Neu5Ac-9-phosphat muss vor Bildung des Nukleotidzuckers CMP-Neu5Ac durch die spezifische Neu5Ac-9-phosphat-Phosphatase abgespalten werden (29). Während die Neu5Ac-Synthese im Cytosol erfolgt, findet die Aktivierung des Zuckers zu CMP-Neu5Ac im Kern statt, was für die Aktivierung von Monosacchariden einmalig ist (4, 30). Die Bildung des aktivierten Nukleotidzuckers wird durch die CMP-Neu5Ac-Synthetase katalysiert, wobei CTP und Neu5Ac unter Abspaltung von Pyrophosphat kondensiert (31). Es konnte bislang nicht geklärt werden, warum die Aktivierung der Neu5Ac im Kern erfolgt. Spekuliert wird über eine regulatorische Funktion der CMP-Neu5Ac bei Signaltransduktions- oder Transkriptionsprozessen (32). Über einen noch unbekanntem Mechanismus wird CMP-Neu5Ac in das Cytosol freigesetzt und gelangt durch einen Antiport mit CMP in den Golgi-Apparat, wo es der Synthese von Glycokonjugaten dient (33).

Freie Sialinsäuren entstehen beim Abbau von Sialoglycokonjugaten vor allem in Endosomen/Lysosomen. Die Sialinsäuren werden durch die Sialidasen NEU1 und NEU4 von den Glycanen abgespalten (34). Die freien Sialinsäuren gelangen über den lysosomalen Sialinsäure-Transporter sialin (SLC17A5) ins Cytosol (35), wo sie entweder weiter abgebaut oder wieder verwendet werden können. Aktivitätsverluste des lysosomalen Sialinsäure-Transporter haben Störungen beim Abbau und somit einen Aufstau von Sialinsäuren zur Folge und führen zu der neurodegenerativen Salla-Krankheit und der besonders schwer verlaufenden infantilen Sialinsäure-Speicherkrankheit, ISSD (35). Vorhandene *O*-Acetylierungen werden durch 9-*O*-Acetylerasen entweder im Lysosom oder Cytosol entfernt (36). Die freie, unsubstituierte Neu5Ac wird zunächst durch die Neu5Ac-Aldolase in ManNAc und Pyruvat gespalten. ManNAc wird dann durch die GlcNAc-2-Epimerase zu GlcNAc umgewandelt. Das entstandene GlcNAc kann nach Phosphorylierung zu GlcNAc-6-phosphat entweder in die anabolen oder katabolen Zweige des Hexosaminstoffwechsel eintreten (19). Die Glycolylgruppe der Neu5Gc wird nicht abgespalten, sodass bei ihrem Abbau ManNGc entsteht, welches für die Sialinsäurebiosynthese wieder verwendet werden kann (37).

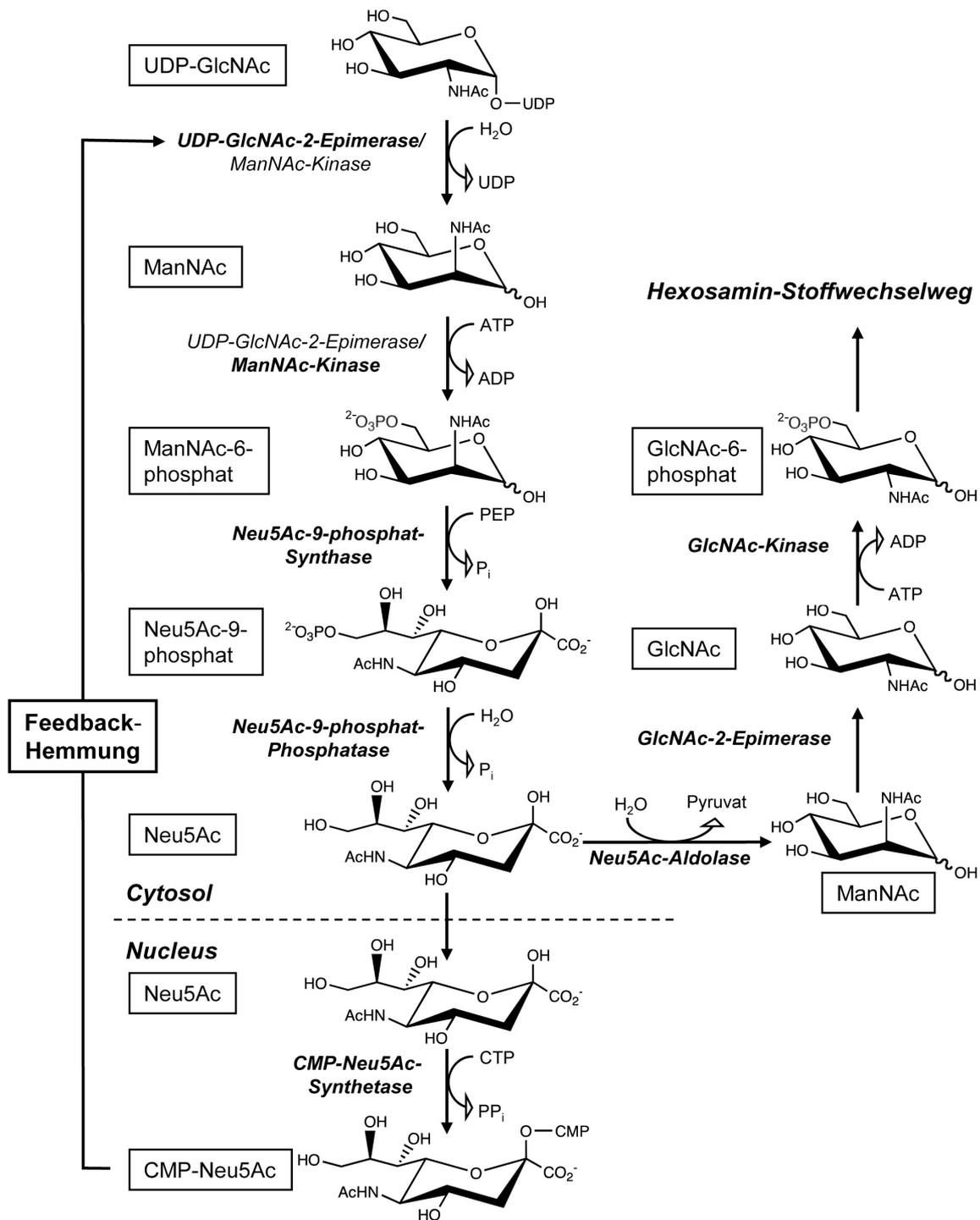


Abb. 1.2 Biosynthese und Abbau von Sialinsäuren in Vertebraten.

Die Rolle der UDP-GlcNAc-2-Epimerase als Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese wird durch die Feedback-Hemmung durch das Endprodukt CMP-Neu5Ac unterstrichen. Abbildung modifiziert nach Münster-Kühnel und Hinderlich (19).

1.3 Sialinsäuren in Glykokonjugaten

Die Übertragung der Sialinsäuren auf die Oligosaccharidketten von Glycoproteinen sowie Glycolipiden erfolgt im *trans*-Golgi-Netzwerk durch eine Reihe von Sialyltransferasen mit hoher Akzeptorspezifität unter Abspaltung von CMP. Allein beim Menschen sind 20 Sialyltransferasen bekannt, die verschiedene Typen von α -glycosidischen Bindungen zwischen Sialinsäuren und darunter liegenden Monosaccharid-Akzeptorstellen katalysieren. Es sind α 2,3- oder α 2,6-Bindungen an Galactose, α 2,6-Bindungen an *N*-Acetylgalactosamin oder *N*-Acetylglucosamin sowie α 2,8-Bindungen zwischen Sialinsäuren beim Menschen beschrieben (38). Sialinsäuren finden sich in der Regel in terminaler Position am nicht-reduzierenden Ende von Oligosacchariden der Glycoproteine und Glycolipide. Eine Ausnahme stellen die Polysialinsäuren des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) dar, bei denen über 100 Sialinsäuren über α 2,8-Bindungen miteinander verknüpft sein können (39).

Bei den Glycoproteinen unterscheidet man im Wesentlichen zwei Glycosylierungstypen: N-Glycane und O-Glycane. Ihre Bildung erfolgt im rauhen endoplasmatischen Reticulum und in den Organellen des Golgi-Apparates. N-Glycane sind meist über einen *N*-Acetylglucosaminrest amidisch an Asparagin in der Konsensussequenz Asn-X-Threonin/Serin der Polypeptidkette gebunden, wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein kann. Sie enthalten eine gemeinsame Core-Struktur aus $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (40). Die N-Glycane werden anhand ihres variablen Strukturteils in drei Subtypen unterschieden: Mannose-reiche Oligosaccharide, hybride Oligosaccharide und komplexe Oligosaccharide (Abb. 1.4). Bei den Mannose-reichen Strukturen werden an die Core-Struktur bis zu sechs weitere Mannosen angehängt. Die Struktur der komplexen N-Glycane wird geprägt durch verlängernde Lactosamineinheiten sowie die Addition von bis zu fünf Verzweigungen, auch Antennen genannt, welche von den Mannoseresten der Core-Struktur ausgehen. Beim hybriden Typ besteht eine Mischung aus Mannose-reichen und komplexen Strukturmerkmalen (40).

Bei den O-Glycanen ist das Oligosaccharid über die OH-Gruppe eines Monosaccharids, z. B. *N*-Acetylgalactosamin, *N*-Acetylglucosamin, Galactose oder Mannose, mit den Hydroxylgruppen von Serin, Threonin oder Hydroxylysin der Polypeptidkette verbunden (41). Die Struktur von O-Glycanen ist sehr heterogen. Für die sehr häufig auftretenden O-Glycane vom Mucin-Typ ($\text{GalNAc}\alpha 1\text{-Ser/Thr}$) sind acht verschiedene Core-Strukturen beschrieben worden (42), wovon sich sieben beim Menschen finden.

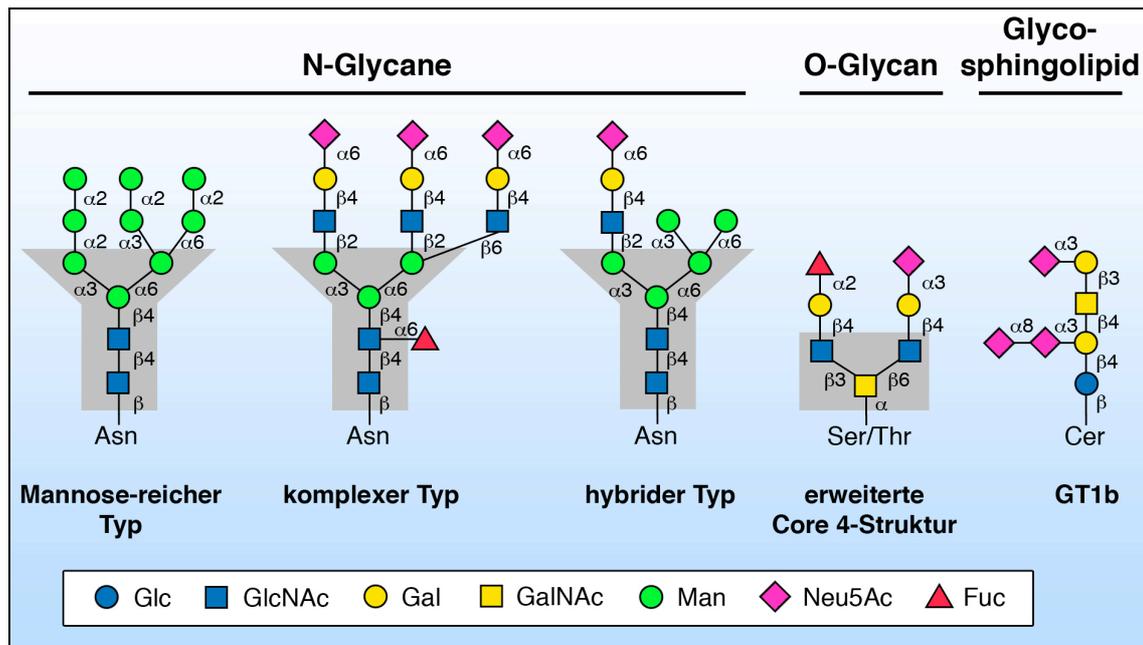


Abb. 1.4 Struktur der N-Glycane, O-Glycane und Glycane von Glycosphingolipiden.

Die gemeinsame Core-Struktur $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ der N-Glycane (grau umrandet) ist amidisch an Asparagin der Polypeptidkette gebunden. Darstellung des Mannose-reichen Typs (auch High-Mannose-Typ), eines triantennären, komplexen N-Glycans mit einer Core-Fucose sowie des hybriden Typs (40). Daneben ein O-Glycan vom Mucin-Typ mit der Core 4-Struktur (grau umrandet). Das dargestellte O-Glycan findet sich in Mucinen des menschlichen Respirationstraktes, nach (42). Das Glycosphingolipid, Gangliosid GT1b, trägt neben $\alpha 2,3$ - auch $\alpha 2,8$ -gebundene Sialinsäuren und ist eines der Hauptganglioside im Gehirn von Säugetieren und Vögeln (43).

Glycosphingolipide sind eine Gruppe von Glycolipiden, die sich in der Zellmembran vieler Organismen finden. Sie stellen insbesondere im Gehirn von Vertebraten den Hauptanteil der Glycolipide und spielen bei hämatopoetischen Zellen eine wichtige Rolle beim Membranaufbau. Ihre gemeinsame Grundstruktur ist eine Ceramideinheit bestehend aus einem langkettigen Aminoalkohol, dem Sphingosin, und einer amidisch gebundenen Fettsäure, wobei die Oligosaccharide an das Ceramid über dessen C-1-Hydroxylgruppe gebunden sind (43). Sialylierte Glycosphingolipide werden als Ganglioside bezeichnet. Die Sialinsäuren der Ganglioside sind nicht nur $\alpha 2,3$ - bzw. $\alpha 2,6$ -verknüpft, man findet auch Oligosialinsäure-Strukturen mit $\alpha 2,8$ -Bindungen wie beim GT1b (Abb. 1.4).

Glycangebundene Sialinsäuren verschiedener Vertebraten-Spezies weisen eine bemerkenswerte Vielseitigkeit an natürlichen Modifikationen auf. Beispielsweise finden sich alleine im Speichel des Rindes über 14 verschiedene Sialinsäuren (37). Beim Menschen dominieren dagegen lediglich drei verschiedene Varianten, nämlich Neu5Ac, die 9-O-acetylierte Neu5Ac

(Neu5,9Ac₂) und die 9-*O*-lactosylierte Neu5Ac (Neu5Ac9Lt) (37). Die bei vielen Säugetieren, u. a. Menschenaffen, Rindern und Schweinen, sehr verbreitete Neu5Gc, die eine zusätzliche Hydroxylgruppe an der *N*-Acetylseitenkette des C-5 aufweist, kann vom Menschen aufgrund einer Exon-Deletion/Frameshift-Mutation im CMAH-Gen nicht *de novo* synthetisiert werden (16). Durch diese Mutation kommt es bei der humanen CMP-Neu5Ac-Hydroxylase zum Verlust der *N*-terminalen Domäne, die essentiell für die Hydroxylierung der *N*-Acetylseitenkette ist. Es wird vermutet, dass diese Mutation vor etwa 2,5 bis 3 Mio. Jahren in der Linie der Hominiden auftrat (44), und es werden ihr bedeutsame Folgen für die Evolution des Menschen zugeschrieben (16). Lange nahm man an, dass die beim Menschen nachgewiesene Neu5Gc lediglich in malignen Tumoren und fetalem Gewebe vorkommt (12, 45). Neuere Untersuchungen konnten jedoch auch in gesunden humanen Epithelien und Endothelien Neu5Gc in geringen Mengen nachweisen, die vermutlich aus tierischen Nahrungsmitteln stammt (46). Der Einbau geringer Mengen von Neu5Gc in verschiedene Gewebe führt im menschlichen Körper zur Ausbildung von Antikörpern gegen diese Neu5Gc-Epitope. Die resultierenden „Xeno-Auto-Antikörper“ sind möglicherweise mitverantwortlich bei der Entstehung verschiedener Krankheitsprozesse wie Autoimmunerkrankungen, Arteriosklerose oder einer rascheren Tumorprogression (47).

1.4 Biologische Funktionen von Sialinsäuren

Die Funktionen und Eigenschaften der Sialinsäuren sind in zahlreichen Publikationen beschrieben (4, 12, 18, 48). Hier sollen nur einige teils medizinisch bedeutsame Funktionen beispielhaft dargestellt werden.

Die hohe Anzahl von Sialinsäuren auf Zellmembranen, z. B. mehr als 20 Mio. Moleküle auf der Zelloberfläche eines menschlichen Erythrozyten (49), sowie ihr hoher Anteil in sezernierten Glycoproteinen deuten daraufhin, dass sie wesentlich zur Stabilisierung der Konformation von Proteinen und Membranen beitragen und von großer Bedeutung für die Interaktion von Zellen bzw. Glykokonjugaten mit ihrer Umgebung sind (39). Die besonderen physikochemischen Eigenschaften der Sialinsäuren, etwa negative Ladung, hydrophiler Charakter und Größe, sind für zahlreiche Effekte von sialylierten Glykokonjugaten bedeutsam (12). Die starke negative Ladung der Sialinsäuren ist wichtig für die Bindung und den Transport von Kationen, z.B. Kalziumionen, der Verstärkung der Viskosität von Mucinen, der Bindung bzw. Ladungsabstoßung von Molekülen, Pathogenen oder Zellen, wie die Vermeidung unerwünschter Zellinteraktionen zwischen Erythrozyten. Die meisten der vielfältigen biologischen Funktionen

der Sialinsäuren beruhen auf zwei Grundprinzipien: Erkennen oder Verbergen von Bindungsstellen. Sialinsäuren spielen bereits zu Beginn der Ontogenese eine wichtige Rolle. Bei der Bindung von Spermien an der *Zona pellucida* der Oocyten und somit an der Befruchtung sind α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren beteiligt (50). Der Schutz der Blastocyste vor den maternalen Komplementfaktoren wird ebenfalls durch Sialinsäuren auf ihrer Oberfläche gewährleistet (51). Die Bedeutung der Sialinsäuren für die Embryonalentwicklung konnte tierexperimentell durch Schwarzkopf *et al.* gezeigt werden (52). Homozygot (-/-) GNE-defiziente Mäuse (Knock-out-Mäuse) sind embryonal letal zwischen Tag 8,5 und 9,5. Dagegen sind heterozygote (-/+) Mäuse, bei denen ein Allel ein funktionsfähiges GNE-Gen besitzt, überlebensfähig. Heterozygot GNE-defiziente Mäuse zeigen eine organspezifische Verminderung membrangebundener Sialinsäuren um etwa 25 %, wobei die Tiere phänotypisch keine weiteren relevanten Unterschiede aufweisen (53). Polysialinsäuren sind in Verbindung mit NCAM ein wichtiger Regulator bei der Migration und Differenzierung von neuronalen Zellen während der Entwicklung des Nervensystems (54). Zell-Zell-Adhäsionsprozesse und Zell-Matrix-Adhäsionsprozesse sind Bestandteile für eine gerichtete Zellmigration während der Embryogenese, Wundheilung, Entzündungsreaktionen und Immunabwehr. Viele Adhäsionsmoleküle enthalten spezifische Sialinsäure-bindende Lektine. Die meisten dieser Adhäsionsmoleküle gehören zur Familie der Selektine oder der Siglecs („sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins“) (55). Selektine werden unter anderem auf Leukozyten (L-Selektin), Endothelzellen (E-Selektin und P-Selektin) und Thrombozyten (P-Selektin) exprimiert und sind beispielsweise an der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen beteiligt, indem sie das sog. „Rolling“ der Zellen an den aktivierten Gefäßendothelien vermitteln, wodurch die Emigration der Leukozyten aus dem Gefäßsystem eingeleitet wird. Die L-Selektine spielen außerdem beim sog. Lymphozyten-Homing eine entscheidende Rolle (56). Selektine erkennen und binden an eine Reihe von Oligosaccharid-Motiven. Ein zentrales Bindungsmotiv nicht nur für Selektin-vermittelte Adhäsionsprozesse stellt das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis X dar (Abb. 1.5). Es spielt eine wesentliche Rolle bei Adhäsionsvorgängen im Rahmen von entzündlichen Prozessen (56), der Metastasierung maligner Tumoren (57, 58), der Spermienbindung an die Eizelle (50) sowie der Bindung von Pathogenen an ihre Wirtszellen (59). Aufgrund seiner vielseitigen Funktionen bei pathologischen Prozessen sind eine Reihe von Versuchen unternommen worden, die Sialyl-Lewis X-Struktur für therapeutische Verfahren nutzbar zu machen (60, 61). Ein marktreifes Medikament konnte bis heute jedoch nicht entwickelt werden.

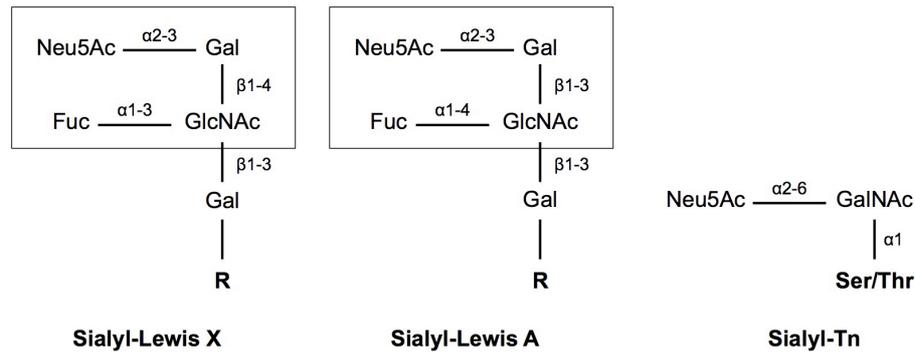


Abb. 1.5 Auswahl sialylierter Tumor-assoziiertes Antigene.

Die Glycanstrukturen membranständiger und sezernierter Glycokonjugate sind bei malignen Tumoren häufig verändert (57, 62). Verschiedene Prozesse führen dabei zu einer Veränderung des Sialylierungsmusters von malignen Zellen, wodurch das Überleben und die Ausbreitung des Tumors begünstigt wird (63). Neben einer allgemeinen Hypersialylierung sind insbesondere eine vermehrte $\alpha 2,6$ -Sialylierung, das Auftreten bestimmter Tumor-assoziiertes Kohlenhydrat-Antigene wie GD2, GD3, Sialyl-Tn (Abb. 1.5), Polysialylierung sowie ein erhöhtes Auftreten von Sialyl-Lewis X- und Sialyl-Lewis A-Epitopen beschrieben (64-66), was mit einem erhöhten Metastasierungspotential und schlechterer Prognose korreliert (58, 66, 67).

Sialinsäuren sind häufiger Bestandteil spezifischer Kohlenhydrat-haltiger Bindungsmotive, die von Lektinen verschiedener Pathogene wie Viren, Bakterien, Parasiten oder ihren Toxinen genutzt werden, um an ihre Wirtszellen zu binden oder in sie einzudringen (68). Zu den bekanntesten und am besten untersuchten Sialinsäure-bindenden Lektinen von Pathogenen gehören die Hämagglutinine der Influenzaviren. Die Hämagglutinine humaner Influenzaviren binden bevorzugt an $\alpha 2,6$ -verknüpfte Neu5Ac und die porzinen Influenzaviren an $\alpha 2,6$ - und $\alpha 2,3$ -gebundene Sialinsäuren, während aviäre Influenzaviren abhängig vom Erregerstamm $\alpha 2,6$ - und $\alpha 2,3$ -gebundene Sialinsäuren erkennen (68). Die Rolle der Influenza-Neuraminidase bei der Ablösung neu formierter Virionen von der Zelloberfläche infizierter Zellen hat sie zum Angriffspunkt für einen therapeutischen Ansatz gemacht. Neuraminidase-Inhibitoren wie Oseltamivir oder Zanamivir verhindern die Freisetzung neuer Virionen und somit die Ausbreitung im Organismus (69). Das Merozitenantigen EBA-175 des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* bindet zur Invasion in die Erythrozyten an Glycophorin A, wobei Neu5Ac bei der Erkennung und Bindung eine wesentliche Rolle spielt. Im Gegensatz dazu erkennt das korrespondierende Bindungsprotein des Parasiten *Plasmodium reichenowii*, der bei

Schimpansen und Gorillas Malaria verursacht, bevorzugt Neu5Gc (70). Eine Reihe bakterieller Toxine wie das Tetanus-Toxin (71) binden an Neu5Ac-enthaltene Ganglioside der Zellmembran und gelangen anschließend mittels Endozytose ins Zellinnere. Weitere humanpathogene Erreger mit Sialinsäure-bindenden Lektinen sind u. a. *Helicobacter pylori* (59), *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, das Mumps-Virus sowie humane Polyomaviren (68). Einige Parasiten oder Bakterien haben als Verteidigungsstrategie ein molekulares Mimikry entwickelt, wobei sie Sialinsäuren auf ihrer Oberfläche exprimieren oder wie *Neisseria meningitidis* schützende Sialinsäure-haltige Polysaccharidkapseln ausbilden (72), deren Glycanstrukturen sie als „selbst“ maskieren und somit antigene Determinanten verbergen. Der Erreger der Chagas-Krankheit, *Trypanosoma cruzi*, überträgt wirtseigene α 2,3-gebundene Sialinsäuren mit Hilfe einer Transsialidase auf seine Zelloberfläche und entzieht sich somit der Immunabwehr des Wirtsorganismus (73).

Sialinsäuren schützen Glycoproteine oder Zellen vor deren Elimination, indem sie bestimmte Erkennungsregionen maskieren. Dies ist teilweise auf ihre negative Ladung und sperrige, hydrophile Struktur zurück zu führen (39), aber vor allem durch ihre meist terminale Position in den Oligosacchariden membranständiger Glycokonjugate oder Serumglycoproteine bedingt. Sie verbergen bestimmte präterminal gebundene Monosaccharide, meist Galactosylreste, oder andere Bindungsmotive und verhindern somit die Bindung an Rezeptoren, die einen Abbau der Zellen oder Moleküle zur Folge hätte. Beispielhaft genannt sei der Asialoglycoprotein-Rezeptor, auch Ashwell-Morell-Rezeptor, dessen Erforschung vor allem durch die beiden Namensgeber erfolgte (74). Desialylierte Serumglycoproteine werden über freiliegende Galactosyl- oder *N*-Acetylgalactosaminyreste an den Asialoglycoprotein-Rezeptor auf Hepatozyten gebunden, mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose aufgenommen und in Lysosomen abgebaut. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass der Asialoglycoprotein-Rezeptor auch sialylierte Glycoproteine mit α 2,6-verknüpften Sialinsäuren erkennt und so auch an der Regulation von sialylierten Glycoproteinen im Blut beteiligt ist (75). In ähnlicher Weise trägt die Desialylierung membranständiger Glycokonjugate von alternden Erythrozyten, Lymphozyten und Thrombozyten zur Sequestration durch Leber- und Milzmakrophagen bei (39).

Die Sialinsäuren von Glycoproteinen können für ihre Funktion als Rezeptor, Enzym oder Transportmolekül von Bedeutung sein. Am Somatostatin-Rezeptor und Serotonin-Transporter sind die Sialinsäuren für eine effektive Bindung ihres Liganden bzw. ihre Transportfunktion wichtig (76, 77). Die Erhöhung der Sialinsäure-haltigen Kohlenhydratketten in einem Glycoprotein kann dessen Halbwertszeit erhöhen. Das hyperglycosylierte künstliche Erythropoetin, Darbepoetin alfa, hat zwar im Vergleich zum rekombinanten humanen

Erythropoetin eine geringere Rezeptoraffinität, aufgrund seiner verlängerten Halbwertszeit besitzt es jedoch eine höhere Bioaktivität (78).

1.5 Metabolisches Oligosaccharid-Engineering

Die große Bedeutung der Glycosylierung für die biologischen Funktionen von membranständigen und sezernierten Glycokonjugaten haben sie schon früh zum Ziel für Manipulationen gemacht (79, 80). Künstliche Veränderungen der Glycanstrukturen können beispielsweise dazu beitragen, die Funktionen von Glycoproteinen zu erforschen, sie zu beeinflussen und sie so für die medizinische Anwendung nutzbar zu machen (78, 81, 82). Eine besondere Form des Glycoengineerings stellt das Einbringen von chemisch modifizierten Monosacchariden anstelle ihrer natürlichen Vertreter in die Biosynthesewege von Glycanstrukturen dar und wird als metabolisches Glycoengineering („metabolic glycoengineering“, MGE) oder metabolisches Oligosaccharid-Engineering („metabolic oligosaccharide engineering“, MOE) bezeichnet (83, 84). Aufgrund ihrer vielseitigen Funktionen sowie ihrer terminalen Position in den Oligosacchariden von Glycokonjugaten sind Sialinsäuren zu einem bevorzugten Ziel des MOE geworden (83).

1.5.1 Modifizierte Sialinsäuren

Das metabolische Oligosaccharid-Engineering von Sialinsäuren, auch „metabolic sialic acid engineering“ (MSE) genannt (85), hat seinen Ursprung in den Versuchen, die Sialinsäurebiosynthese bzw. die Bildung von Sialoglycanen zu hemmen, da man schon früh ihre bedeutende Rolle in der Tumorbilogie erkannt hatte und sich durch die Hemmung ihrer Biosynthese eine wirkungsvolle Therapie erhoffte (86). Bei ihren Versuchen, die Sialinsäurebiosynthese mit Hilfe von *N*-Acylhexosaminen zu beeinflussen, machten mehrere Autoren unabhängig voneinander ähnliche Beobachtungen. Grünholz *et al.* (87) beschrieben die Bildung der unphysiologischen Sialinsäure *N*-Propanoylneuraminsäure (Neu5Prop) aus den *N*-Acylhexosaminen *N*-Propanoylmannosamin (ManNProp) und *N*-Propanoylglucosamin (GlcNProp). Schwartz *et al.* (88) und Hadfield *et al.* (89) beobachteten, dass nach Behandlung einer bestimmten Erythroleukämiezelllinie mit fluoridierten ManNAc-Analoga offenbar modifizierte Sialinsäuren in die Zelloberflächen eingebaut wurden. Reutter und Mitarbeiter erkannten, dass die Modifikation der *N*-Acylseitenkette der Neu5Ac eine Möglichkeit darstellt, um die Funktion der Sialinsäuren zu erforschen und ihre biologischen Eigenschaften zu

beeinflussen. Kayser *et al.* (90) wiesen *in vivo* die Metabolisierung von GlcNProp und ManNProp zu membrangebundenen modifizierten Sialinsäuren nach und konnten somit zeigen, dass die Enzyme der Sialinsäurebiosynthese permissiv im Hinblick auf bestimmte Veränderungen der *N*-Acylseitenkette sind. In den letzten Jahren sind eine Vielzahl von ManNAc-Derivaten für die metabolische Modifizierung von Sialinsäuren eingesetzt worden, wobei neben Modifikationen der *N*-Acetylseitenkette mit unterschiedlichsten Substituenten und teils reaktiven Gruppen (91, 92) auch Modifikationen der Hydroxylgruppen (93) zum Einsatz gekommen sind (Abb. 1.6).

Auch mittels freier Neu5Ac und ihrer Analoga lässt sich die Oberflächensialylierung effektiv modifizieren (94-97). Sialinsäureanaloga ermöglichen die Synthese von Sialoglycanen, deren Sialinsäuren Modifikationen sowohl an C-5 als auch an C-9 aufweisen (Abb. 1.6). An C-9-modifizierte Sialinsäuren sind durch ManNAc-Analoga nicht zu erzeugen (95, 98).

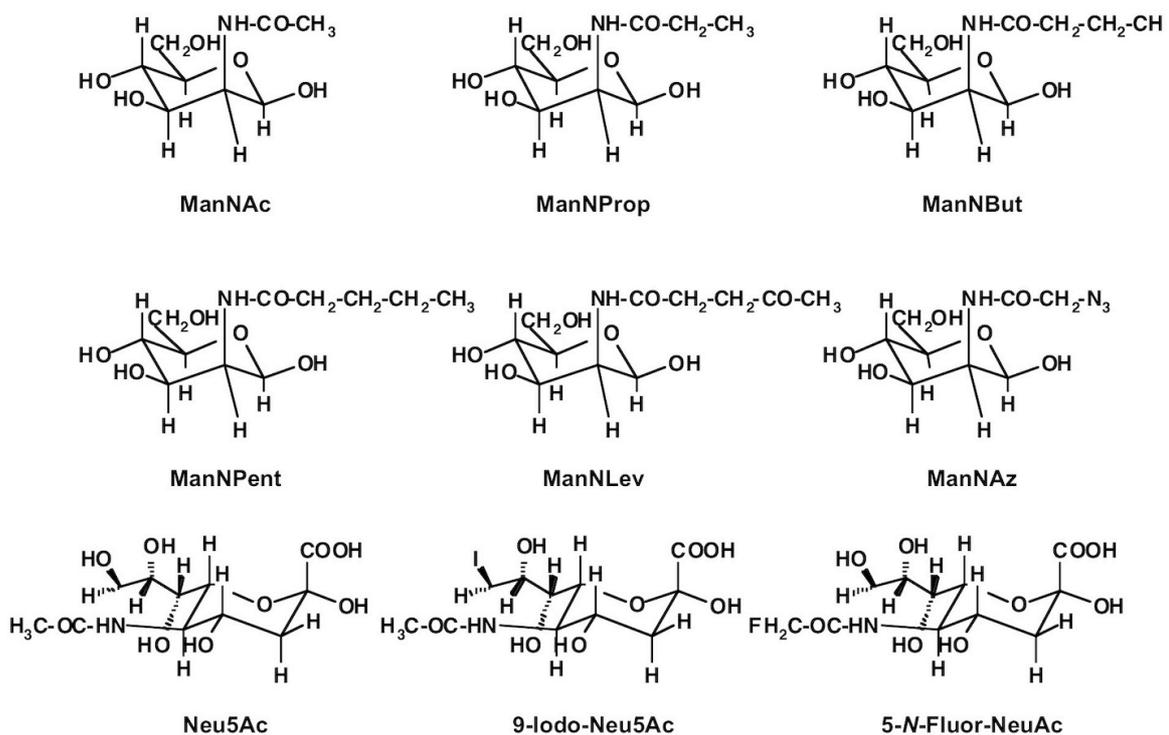


Abb. 1.6 Auswahl geeigneter ManNAc- und Sialinsäureanaloga für das MOE.

Durch die beiden ManNAc-Analoga *N*-Levulinoylmannosamin (ManNLev) und *N*-Azidoacetylmannosamin (ManNAz) können reaktive Gruppen in die Zelloberflächen eingebracht werden. Abbildung modifiziert nach Hinderlich (17).

Eine andere Methode zur Modifizierung von Sialoglycokonjugaten stellt der Transfer von CMP-aktivierten Sialinsäuren durch Sialyltransferasen auf Asialoglycoproteine dar, wobei die CMP-Sialinsäuren an der C-5- oder C-9-Position mit verschiedenen funktionellen Gruppen substituiert sein können (99). Bei der *in vitro*-Modifizierung von Glycokonjugaten auf Zelloberflächen kann diese Methode durch die vorherige enzymatische Abspaltung membranständiger Sialinsäuren ergänzt werden. Die Resialylierung der Zelloberflächen erfolgt dann wieder durch die enzymatische Übertragung der Nukleotidzucker mittels Sialyltransferasen (100). Der Vorteil dieser Technik liegt in der Spezifität der Sialyltransferasen in Bezug auf die Akzeptor-Glycoside, wodurch gezielt identische Neosialoglycokonjugate hergestellt werden können, wie sie zur Durchführung von Struktur-Funktions-Analysen bei der Erforschung der Bindungsstellen von Adhäsionsmolekülen oder pathogenen Erregern von Bedeutung sind (101). Die fehlende Membranpermeabilität der geladenen CMP-Sialinsäuren, die Antigenität der Sialyltransferasen *in vivo* und der relativ hohe Aufwand bei der Synthese der CMP-Sialinsäuren begrenzen den Einsatz dieser Technik.

1.5.2 Metabolismus modifizierter Sialinsäuren und ihrer Vorläufer

Die Aufnahme der ManNAc- und Sialinsäureanaloga in die Zellen stellt die erste Hürde beim metabolischen Oligosaccharid-Engineering dar. Im Gegensatz zu anderen Hexosen sind für ManNAc keine Transportsysteme für die zelluläre Aufnahme in Eukaryonten beschrieben. Die Konzentration der verschiedenen ManNAc-Analoga, die im Zellkulturmedium erforderlich ist, um einen biologischen Effekt zu erzielen, liegt im millimolaren Bereich (84, 102). Dies deutet darauf hin, dass die zelluläre Aufnahme von ManNAc nicht über spezifische Transportsysteme erfolgt. Hingegen führt die Reduktion der hydrophilen Eigenschaften von ManNAc-Analoga durch Veresterung ihrer Hydroxylgruppen mit kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) zu einer Erhöhung der zellulären Aufnahme und metabolischen Effizienz der Monosaccharide. Die SCFA werden durch unspezifische Esterasen im Cytosol hydrolysiert und das ursprüngliche ManNAc-Analogon fließt in die Sialinsäurebiosynthese ein (81, 103-105). Es ist daher anzunehmen, dass SCFA-Hexosaminanaloga aufgrund ihrer Lipophilie durch die Plasmamembran diffundieren, während die nicht-veresterten Mannosamine am ehesten durch pinozytotische/endozytotische Transportwege ähnlich den freien Sialinsäuren, wie es am Beispiel von Neu5Gc durch Bardor *et al.* (96) gezeigt wurde, in die Zellen aufgenommen werden (Abb. 1.7).

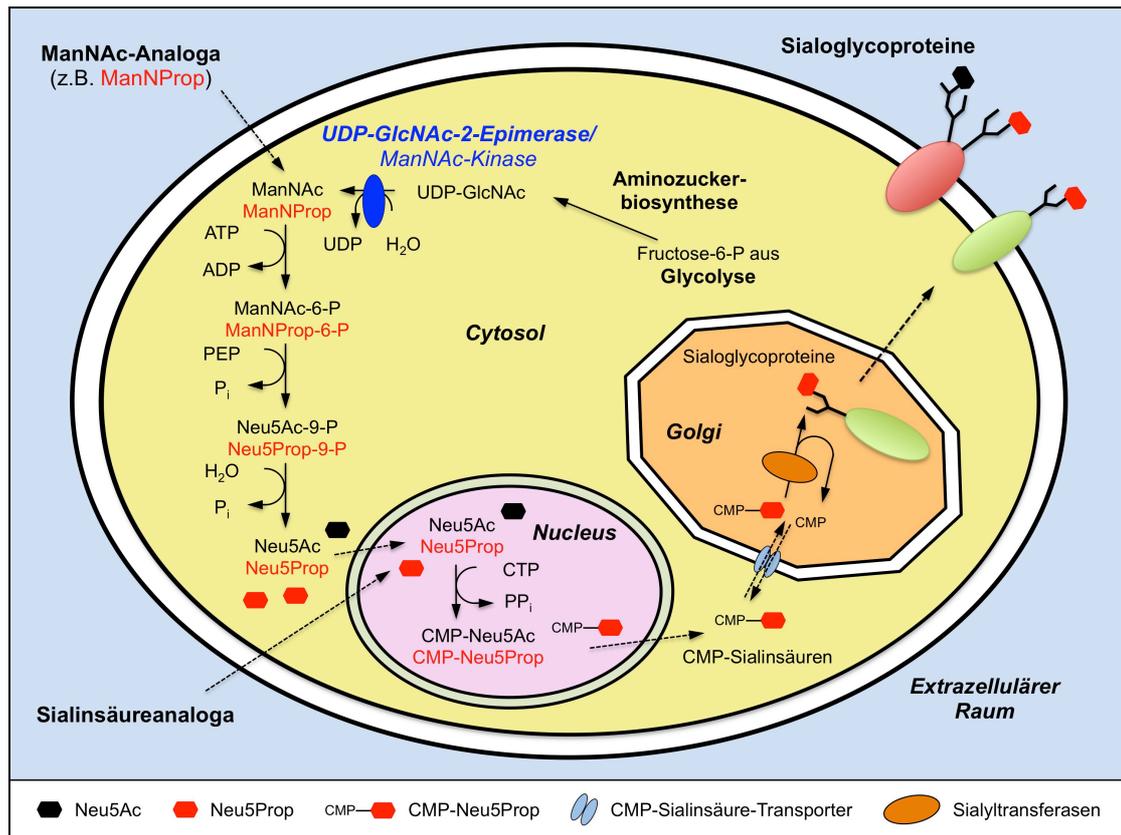


Abb. 1.7 Metabolisches Oligosaccharid-Engineering von Sialoglycanen.

ManNAc-Analoga bzw. Sialinsäureanaloga gelangen durch Pinozytose/Endozytose in das Zellinnere. Dort werden sie in den permissiven Biosyntheseapparat der Sialinsäuren eingeschleust und schließlich mit ihren chemischen Modifikationen in membrangebundene Sialoglycane eingebaut.

Erstaunlich ist die hohe Akzeptanz des Sialinsäurestoffwechsels für Sialinsäureanaloga und ihre Vorläufer. Modifizierungen an der *N*-Acylseitenkette der Mannosaminanaloga respektive der daraus resultierenden Sialinsäuren werden sowohl von den Enzymen der Sialinsäurebiosynthese, dem CMP-Neu5Ac-Transporter als auch den verschiedenen Sialyltransferasen fast ohne Ausnahme akzeptiert. So konnte der Einbau von Sialinsäuren nach Behandlung mit modifizierten Mannosaminderivaten in α 2,3-, α 2,6- und α 2,8-Bindungen nachgewiesen werden (98, 106). Ursächlich für die Permissivität der beteiligten Enzyme in Hinblick auf die *N*-Acylseitenkette könnte das natürliche Vorkommen der Sialinsäure Neu5Gc bei den meisten Säugetieren sein, die genauso wie ihr Abbauprodukt, ManNGc, im Sialinsäurestoffwechsel umgesetzt werden kann (96). Bezüglich der Akzeptanz modifizierter ManNAc-Analoga bestehen jedoch auch einige Einschränkungen. Zu lange oder zu sperrige Veränderungen der *N*-Acylseitenkette oder an der C-6-Position des ManNAc führen dazu, dass die Analoga nicht mehr oder nur sehr ineffizient metabolisiert werden, da die Phosphorylierung

der Analoga durch die ManNAc-Kinase eingeschränkt ist (98). Für ManNAc-Analoga mit längerer *N*-Acylseitenkette wie ManNBut, ManNPent und ManNLev konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Phosphorylierung dieser Substrate durch die GlcNAc-Kinase erfolgt (98). Die Aminogruppe der Mannosaminoderivate ist offenbar essentiell. Wird diese durch eine Methylengruppe ersetzt, so erfolgt keine weitere Metabolisierung des Monosaccharids (98). Auch in Polysialinsäuren konnte der Einbau der Mannosaminanaloga ManNProp und ManNLev gezeigt werden (106). Interessanterweise führte die Behandlung mit ManNBut und ManNPent zur Hemmung der PSA-Expression durch die Inhibition der Polysialyltransferasen II und IV durch das entsprechende CMP-Sialinsäurederivat (107). Neben den verwendeten ManNAc-Analoga ist der Zelltyp für das Ausmaß der Inkorporation modifizierter Sialinsäuren in die Glykokonjugate von entscheidender Bedeutung. Eine Vielzahl von Zelltypen wurde mit unterschiedlichen ManNAc-Analoga behandelt, wobei die Einbauraten der modifizierten Sialinsäuren in Abhängigkeit vom Zelltyp und dem verwendeten Analogon zwischen 15 bis 70 % lag (102). Die Dauer der Behandlung mit den Sialinsäurevorläufern, die erforderlich war, um eine maximale Einbauraten zu erzielen, variierte zwischen zwei und sechs Tagen und war im Wesentlichen vom Turnover der Oligosaccharid-gebundenen Sialinsäuren abhängig (108).

1.5.3 Anwendung und biologische Effekte modifizierter Sialinsäuren

Mit Hilfe des MOE wurden in den letzten zwei Jahrzehnten eine Vielzahl von modifizierten Sialinsäuren mit unterschiedlichen Substituenten in die membrangebundenen Glykokonjugate von Zellen eingebracht. Übersichten der verschiedenen Substituenten und ihrer biologischen Effekte finden sich bei Campbell *et al.* (83), Du *et al.* (84) oder Keppler *et al.* (102).

Die ersten Arbeiten über die Beeinflussung biologischer Prozesse durch modifizierte Sialinsäuren beschrieben die Modulation Sialinsäure-abhängiger Virus-Rezeptor-Interaktionen nach Behandlung der Wirtszellen mit den Sialinsäurevorläufern ManNProp, ManNBut oder ManNPent, wobei abhängig vom ManNAc-Analogon und Virus-Typ sowohl eine erhöhte als auch eine erniedrigte Virus-Suszeptibilität berichtet wurde (109, 110). Auch Zell-Matrix-Adhäsionsprozesse konnten durch modifizierte Sialinsäurevorläufer beeinflusst werden (97, 111). Durch die Behandlung mit ManNProp ließen sich *in vitro* die Proliferation von Mikroglia und Astrozyten (112) und das Neuritenwachstum neuronaler Zellen (113) sowie *in vivo* die Regeneration von Axonen (114) stimulieren.

Die Einführung reaktiver Gruppen in membrangebundene Sialoglycane eröffnete eine große Palette an Möglichkeiten für das MOE. Durch die Behandlung von Zellen mit

N-Levulinoylmannosamin (ManNLev) konnte eine natürlicherweise dort nicht vorkommende Ketogruppe in die Zelloberfläche eingebracht werden, die mit Hydraziden zu stabilen Hydrazonen reagiert. Über die Ketogruppe können mittels chemoselektiver Bindung unterschiedliche Hydrazid-konjugierte Moleküle an die Zelloberfläche gekoppelt werden (91). Auf diese Weise gelang u. a. ein selektives Einbringen des Toxins Rizin sowie des Zytostatikums Doxorubicin in ManNLev-behandelte Zellen (91, 115), die Markierung von Zellen mit einem MRT-Kontrastmittel (116) oder die Kopplung eines viralen Rezeptors an die Zelloberfläche zum Einschleusen eines Gentransfer-Vektors (117). Weitere ManNAc-Analoga, die andere chemisch reaktive Gruppen wie Aldehyde, Azide, Alkine oder Thiole besitzen, wurden entwickelt, um die Strategie der bioorthogonalen Chemie für die Modulation von Sialoglycanen zu optimieren (84). Hervorgehoben sei dabei die von Bertozzi und ihren Mitarbeitern weiterentwickelte Staudinger-Reaktion, bei der ein Azid mit einem Phosphin zu einem stabilen Amid reagiert (Staudinger-Ligation). Die Azidogruppe wird mittels *N*-Azidoacetylmannosamin (Abb. 1.6) in die Sialinsäurebiosynthese eingeschleust und in den Sialoglycanen der Zelloberfläche exprimiert. Dort steht sie dann als chemoselektiver Bindungspartner für Markierungsreagentien zur Verfügung. Die Bindung der Azidogruppe an Markierungsreagentien kann mittels Staudinger-Ligation mit Phosphinen (92), mittels Kupfer-katalysierter [3+2]-Cycloaddition (“Click-Kupplung”) mit Alkinen (118) oder mittels “spannungsinduzierter“ [3+2]-Cycloaddition mit Cyclooctin-Substraten erfolgen (119). Durch die bioorthogonale Markierung von Glycanstrukturen lassen sich komplexe biologische Prozesse in ihrem natürlichen zellulären Umfeld oder *in vivo* untersuchen (120, 121).

Ein weiteres Einsatzgebiet für modifizierte Sialinsäuren stellt die Immuntherapie von Tumoren dar. Mehrere Autoren setzten veränderte Sialinsäurevorläufer zur Erzeugung von Neoantigenen und zur Herstellung von Tumorstoffen ein. Nach Behandlung mit ManNProp bauten Leukämiezellen Neu5Prop in die Polysialinsäuren ihrer Zelloberfläche ein und wurden dadurch für einen Antikörper-vermittelten Zelltod empfänglicher, der durch einen spezifisch an *N*-propanoylierte Polysialinsäuren-bindenden Antikörper induziert wurde (122). Auch Lemieux und Bertozzi (123) erzeugten einen Antikörper, der spezifisch modifizierte Sialinsäuren erkannte. Nach Behandlung von HeLa-Zellen mit dem korrespondierenden Mannosaminanalogon wurde eine Komplement-vermittelte Zellyse durch den Antikörper induziert. Auch die gezielte metabolische Modifikation sialylierter Tumor-assoziiierter Kohlenhydrat-Antigene wie Sialyl-Tn und GM3 zur Herstellung spezifischer Tumorstoffe konnte gezeigt werden (124, 125). Einen anderen Weg, das metabolische Sialinsäure-Engineering für die Tumorthherapie nutzbar zu machen, zeigten Gnanapragassam *et al.* (85).

Durch die Behandlung mit ManNProp und ManNPent konnte die Oberflächensialylierung und Polysialylierung der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y deutlich reduziert werden, was zu einer Verminderung ihres Migrations- und Invasionspotentials führte. Durch die ManNProp- und ManNPent-Behandlung waren die Tumorzellen außerdem empfindlicher gegenüber Bestrahlung und den Chemotherapeutika 5-Fluorouracil und Cisplatin.

Neben dem Immunotargeting von Tumorzellen stellt die Modulation immunologischer Prozesse eine weitere Möglichkeit dar, um modifizierte Mannosaminanaloga für therapeutische Zwecke nutzbar zu machen. Die Behandlung peripherer Blutlymphozyten mit ManNProp führte zu einer Stimulation der Lymphozytenproliferation, die von einem Anstieg zweier Proliferationsmarker, dem IL-2-Rezeptor (CD25) und dem Transferrin-Rezeptor (CD71), bei gleichzeitiger Erhöhung der IL-2- Sekretion begleitet war (126).

Der Einsatz von ManNAc-Analoga bei Zellkulturexperimenten respektive der möglicherweise zukünftige Einsatz als Therapeutikum setzt eine gute Verträglichkeit und fehlende Toxizität voraus. ManNAc-Derivate mit verlängerter *N*-Acylseitenkette haben in einer Vielzahl von Zellkulturexperimenten bzw. bei *in vivo*-Untersuchungen keine Hinweise auf Toxizität oder Reduktion der Lebensfähigkeit (102, 108) oder Zeichen einer Organschädigung (90, 127) erbracht. Bei der Anwendung von ManNBut und ManProp wurde eine verminderte Zellproliferation beobachtet (109). Für einige SCFA-Hexosamine ist jedoch eine erhöhte Zytotoxizität in Abhängigkeit von der Position der veresterten SCFA beschrieben (81), die perspektivisch eventuell für eine Tumorthherapie ausgenutzt werden könnte. Unabhängig davon sind manche SCFA-Hexosamine in der Lage, die Expression proinvasiver Onkogene wie MUC1 sowie die NF- κ B-Aktivität zu supprimieren. Der Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, entscheidend ist aber offenbar ein intaktes SCFA-Monosaccharid-Hybridmolekül (81).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Zum Zeitpunkt dieser experimentellen Untersuchungen waren durch das metabolische Oligosaccharid-Engineering bereits eine Reihe unterschiedlicher Modifikationen erfolgreich in die Membranglycokonjugate verschiedener Zelllinien eingebracht worden. Der Anteil membrangebundener modifizierter Sialinsäuren lag dabei zwischen 15-70 %.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Charakterisierung eines Zellsystems, das eine möglichst homogene Gruppe modifizierter Sialinsäuren auf seiner Zelloberfläche exprimiert, um beispielsweise die Rolle von Sialinsäuren bei physiologischen und pathologischen Prozessen zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollten Subklone der hämatopoetischen Zelllinien HL60 und BJA-B, deren endogene Oberflächensialylierung aufgrund einer Regulationsstörung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase deutlich reduziert ist, mit dem modifizierten Sialinsäurevorläufer ManNProp behandelt werden. Anhand des Zellsystems sollten folgende Fragen untersucht werden:

1. Gibt es Unterschiede bei der Metabolisierung und Inkorporation modifizierter Sialinsäurevorläufer zwischen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-kompetenten und -defizienten Subklonen?
2. Von welchen Faktoren ist die Inkorporation modifizierter Sialinsäurevorläufer in die Membranglycokonjugate abhängig und wie lassen sich diese beeinflussen?
3. Werden der natürliche Sialinsäurevorläufer ManNAc und der modifizierte Sialinsäurevorläufer ManNProp vom Biosyntheseapparat unterschiedlich umgesetzt und auf welcher Stufe der Biosynthese der Sialoglycane bestehen diese Unterschiede?

Des Weiteren sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob auch freie Sialinsäureanaloge aus dem Zellkulturmedium effizient aufgenommen und in unveränderter Form in Membranglycokonjugate eingebaut werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders beschrieben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) erworben. Die Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden von der Firma Eppendorf (Hamburg) bezogen. Zellkulturmaterialien und Nährlösungen stammten von den Firmen Falcon (Heidelberg), Nunc (Wiesbaden) und Biochrom (Berlin). Diese waren entweder sterile Einmalartikel oder wurden wie nicht-sterile Glas- und Plastikmaterialien in einem Autoklaven (Integra Biosciences, Fernwald) bei 120 °C und 202,7 kPa für 30 min sterilisiert. Die Hersteller von Geräten und besonderen Materialien werden bei den entsprechenden Methoden genannt.

2.1.2 Zellen

Die HL60-Zelllinie wurde 1976 aus dem peripheren Blut einer Patientin mit der Diagnose einer akuten Promyelozytenleukämie (APL) M3 nach der French-American-British (FAB)-Klassifikation etabliert (128). Seitdem wurde die HL60-Zelllinie in vielen Publikationen als Promyelozytenleukämie-repräsentierende Zelllinie bezeichnet und wird von der ATCC (American Type Culture Collection) auch so geführt, wenngleich Ergebnisse aus neueren Untersuchungen insgesamt gegen eine Ableitung der HL60-Zellen von einer APL sprechen (129). Bei der BJA-B-Zelllinie handelt es sich um Epstein-Barr-Virus negative humane Burkitt-Lymphom-Zellen (130). Die Zellen wachsen ebenfalls in Suspension in kleineren Klumpen, lassen sich jedoch durch mechanische Manipulation vereinzeln.

Das besondere Merkmal der hier verwendeten Subklone der HL60-Zelllinie und der BJA-B-Zelllinie ist ihre unterschiedliche Oberflächensialylierung. Während die Subklone HL60-I und BJA-B K20 (24) eine reduzierte Zelloberflächensialylierung aufgrund einer fehlenden UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität aufweisen, findet sich bei den Subklonen HL60-II und BJA-B K88 eine normale Oberflächensialylierung bei regelrechter Enzymaktivität verglichen mit der Stammkultur der entsprechenden Zelllinie. Ursächlich für das Fehlen der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität in den hyposialylierten Subklonen ist ein epigenetischer Regulationsmechanismus, der die Transkription durch DNA-Methylierung der Promotorregion hemmt. Die Behandlung der Zellen mit einem DNA-Methylierungsinhibitor führt zur

Wiederherstellung von UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-mRNA sowie zur Steigerung der Enzymaktivität und Oberflächensialylierung (26).

2.1.3 Antikörper und Lektine

Mouse Anti-human-Sialyl-Lewis X-mAk (CD15s)	PharMingen, Hamburg
Mouse IgM, κ mAk-Isotype-Control	PharMingen, Hamburg
Rabbit-Anti-Mouse-IgM-FITC	Dianova, Hamburg
<i>Limax flavus</i> -Agglutinin-FITC (LFA)	EY Laboratories Inc., San Mateo
<i>Vicia villosa</i> -Agglutinin-FITC (VVA)	Sigma, Deisenhofen
<i>Canavalia ensiformis</i> -Agglutinin-FITC (Con A)	Sigma, Deisenhofen
Peanut-Agglutinin-FITC (PNA)	Sigma, Deisenhofen
Soybean-Agglutinin-FITC (SBA)	Sigma, Deisenhofen

Tab. 2.1 Lektine und ihre Bindungsstellen.

Die verwendeten Lektine erkennen mögliche Bindungsstellen für Sialinsäuren. Nur LFA bindet direkt an Sialinsäuren. Alle Lektine sind zur Analyse im Durchflusszytometer mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat) konjugiert.

Lektin	Bindungsstellen
VVA	<i>N</i> -Acetylgalactosamin; (Galactose mit geringer Affinität)
SBA	<i>N</i> -Acetylgalactosamin; Galactose
PNA	Galactose- β 1,3- <i>N</i> -Acetylgalactosamin
Con A	α -Mannose-haltige Strukturen, (α -Glucose)
LFA	Sialinsäuren

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung der Zellen

Die HL60- und BJA-B-Zellen wurden in Suspensionskultur mit dem Medium RPMI-1640 (Biochrom, Berlin) mit den aufgeführten Zusätzen im Brutschrank (Heraeus 6000, Hanau) unter 5% CO₂-Begasung bei 37 °C in 75 cm² Kulturflaschen mit Filterschraubkappen (TPP, Trasadingen, Schweiz) gehalten. Je nach Zelldichte wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage

mit frischem Nährmedium verdünnt. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Cleanbench FASTER1 (BioFlow-Technik, Meckenheim) durchgeführt.

Komplettes Zellkulturmedium HL60- und BJA-B-Zellen:

RPMI-1640 mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FKS)
 2 mM L-Glutamin
 100 U/ml Penicillin G
 100 µg/ml Streptomycin

Fetales Kälberserum (Biochrom, Berlin) wurde für 30 min auf 56 °C zur Komplementinaktivierung erwärmt, in 50 ml Portionen aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Vor Durchführung der Experimente oder dem Ernten wurden die Zellen mit einer sterilen PBS-Lösung (Zellkultur-PBS) gewaschen.

PBS-Lösung: 150 mM NaCl
 3 mM KCl
 8 mM Na₂HPO₄
 1 mM KH₂PO₄
 ad 1 l aqua bidest., pH 7,2

2.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden in Zentrifugenröhrchen bei 900 rpm für 3 min (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau) pelletiert und dann in kalter FKS-RPMI-Lösung aufgenommen und mit DMSO versetzt. Die Zellsuspension wurde in spezielle Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt, diese dann in Zellstoff eingewickelt und für 2 h bei -80 °C gefroren. Danach erfolgte die Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C. Beim Auftauen der Zellen wurden diese zweimal mit frischem Medium gewaschen, um das DMSO zu entfernen, da es für die Zellen bei Raumtemperatur schädlich ist.

Lösung zum Einfrieren der Zelllinien: 0,2 ml FKS
 0,7 ml RPMI 1640
 0,1 ml DMSO

2.2.1.3 Bestimmung der Vitalität und Zellzahl

Zur Vitalitätsbestimmung wurde eine Vitalfärbung mit Trypanblau (Gibco, Karlsruhe) verwendet. Der Test wurde auch zur Bestimmung der Zelldichte in den Kulturflaschen eingesetzt. Trypanblau färbt nur geschädigte Zellen mit nicht-intakter Plasmamembran an. In einem Reaktionsgefäß wurden 80 µl einer Zellsuspension mit 20 µl einer 0,1 %igen Trypanblaulösung versetzt, vorsichtig gemischt und für 2 min inkubiert. Von der Mischung wurden 20 µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die lebenden Zellen in vier Großquadraten mit einem Lichtmikroskop (TMS, Nikon) ausgezählt. Die Zelldichte der Zellsuspension konnte dann berechnet werden. Alternativ wurde das Gerät Coulter Counter (Beckman, Krefeld) zur Zellzahlbestimmung verwendet. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellsuspensionen entsprechend der erforderlichen Zellzahl für die Experimente verdünnt.

2.2.1.4 Behandlung der Zellen mit *N*-Acylmannosaminen

N-Acetyl-D-mannosamin (ManNAc) und dessen Analogon *N*-Propanoyl-D-mannosamin (ManNProp) wurden im Zellkulturmedium RPMI 1640 gelöst und Stammlösungen von 250 mM angelegt. Die Aufbewahrung der Stammlösung erfolgte bei -20 °C. Vor Zugabe zur Zellsuspension wurden die Lösungen steril filtriert. Die Behandlung der Zellen mit den *N*-Acylmannosaminen erfolgte in Kulturflaschen. Zellsuspensionen mit einer Dichte von 3×10^5 Zellen/ml wurden mit Zuckeranalogon-Stammlösung versetzt. Dabei wurde in den meisten Versuchen eine 10 mM Konzentration der *N*-Acylmannosamin-Analoga angestrebt. Danach wurden die Zellen über 72 h im Brutschrank inkubiert. Für die Experimente zur Konzentrationsoptimierung und zur Einbaukinetik wurden die Konzentrationen und Inkubationszeiten in der angegebenen Weise verändert. Das verwendete ManNProp wurde von Herrn Dr. Mickleit und seinen Mitarbeitern am Institut für Chemie der Freien Universität Berlin hergestellt. ManNAc wurde von Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Tab. 2.2 Chemische Charakteristika der verwendeten *N*-Acylmannosamine.

Name	molekulare Masse	Rest an C-2	Struktur
<i>N</i> -Acetyl-D-mannosamin	221 g/mol	-acetyl (Ac)	-CO-CH ₃
<i>N</i> -Propanoyl-D-mannosamin	235 g/mol	-propanoyl (Prop)	-CO-CH ₂ -CH ₃

2.2.1.5 Behandlung der Zellen mit Sialinsäureanaloga

Die Kultivierung und Behandlung der HL60-I- und BJA-B K20-Zellen mit Sialinsäureanaloga wurde von Frau Dr. Cornelia Oetke vom Institut für Angewandte Tumorstudiologie des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg durchgeführt. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben in RPMI 1640-Medium mit o. g. Zusätzen kultiviert. Um den verbliebenen Sialinsäurepool der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-defizienten Zellklone maximal zu reduzieren, wurden die Zellen für mindestens sieben Tage vor einem Experiment in serumfreien Medium mit dem Zusatz Nutridoma-HU (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) entsprechend den Herstellerangaben kultiviert. Zellen für die HPLC-Analyse wurden in serumfreien mit 40 mM HEPES, pH 7,2, gepuffertem Medium mit einem Sialinsäureanalogon mit einer Konzentration von 5 mM über 48 h inkubiert.

2.2.2 Durchflusszytometrische Analysen

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden mit einem FACS-Gerät (Fluorescence-activated Cell Sorting) der Firma BD Biosciences (Heidelberg) durchgeführt. Die Steuerung des Geräts sowie die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe der Software CellQuest II sowie der Software FlowJo v9.3.2 (Firma FlowJo, LLC, Ashland, USA).

2.2.2.1 Fluoreszenzmarkierung von Membranglykokonjugaten mit Lektinen

Unbehandelte und mit *N*-Acylmannosaminen-behandelte HL60-Zellen wurden zweimal mit Zellkultur-PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren (900 rpm Megafuge 1, 3 min) und Absaugen des Überstandes erfolgte das Resuspendieren der Zellen in FACSFlow-Puffer (BD Biosciences, Heidelberg) und Einstellen der Zellen auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml. Die weitere Bearbeitung wurde auf Eis (4 °C) durchgeführt. Je 100 µl Zellsuspension wurden in einem FACS-Röhrchen (BD Biosciences, Heidelberg) mit einem fluoreszenzmarkierten Lektin inkubiert. Die Endkonzentrationen waren je nach Lektin unterschiedlich: VVA 50 µg/ml, LFA 20 µg/ml, SBA 5 µg/ml, Con A 10 µg/ml bzw. PNA 10 µg/ml (24). Es erfolgte die Inkubation für 45 min auf Eis im Dunkeln. Nach zweimaligem Waschen mit FACSFlow-Puffer wurden die Zellen in 500 µl des selbigem aufgenommen und die Fluoreszenzintensitäten von 1×10^4 Zellen im Durchflusszytometer gemessen und analysiert.

2.2.2.2 Fluoreszenzmarkierung von Sialyl-Lewis X-Strukturen (CD15s)

Unbehandelte und mit *N*-Acylmannosaminen-behandelte HL60-Zellen wurden entsprechend dem Protokoll zur Fluoreszenzmarkierung mit Lektinen gewaschen und in FACSFlow-Puffer plus 1 % BSA (Rinderserumalbumin, Sigma) auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und mit dem Erstantikörper Anti-CD15s-mAb für 60 min bei 4 °C bei einer Konzentration von 25 µg/ml inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACSFlow-Puffer erfolgte die Markierung mit dem zweiten Antikörper in FACSFlow-Puffer plus 1 % BSA über 60 min bei 4 °C. Hierbei wurde ein FITC-konjugierter Rabbit-Anti-Mouse-IgM in einer Konzentration von 15 µg/ml verwendet. Zur Messung unspezifischer Bindungen wurde eine Kontrolle mit einem Mouse-Anti-Human-IgM-Isotype-Antikörper in entsprechender Konzentration verwendet. Nach erneutem Waschen mit FACSFlow-Puffer erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensitäten von 1×10^4 Zellen im Durchflusszytometer.

2.2.3 Sialidasebehandlung von HL60-Zellen

HL60-Zellen wurden über 72 h mit 10 mM ManNProp inkubiert. Bei einem Teil der Zellen erfolgte danach die Bestimmung der relativen Anteile von Neu5Ac und Neu5Prop in den Membranglycoproteinen mittels RP18-HPLC. Der andere Teil der Zellen wurde nach zweimaligem Waschen mit Zellkultur-PBS für 60 min mit Sialidase aus *Vibrio cholerae* (Acylneuraminyl-Hydrolase, 3.2.1.18; Behring, Marburg) in einer Enzymkonzentration von 200 mU/ml bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden hierfür auf 1×10^6 /ml bis 2×10^6 /ml eingestellt. Im Anschluss wurde die Sialidase dreimal mit Zellkultur-PBS ausgewaschen. Die Sialidase-behandelten Zellen wurden dann erneut mit 10 mM ManNProp für 72 h inkubiert. Schließlich erfolgte die Bestimmung des relativen Anteils der Neu5Prop in den Membranglycoproteinen mittels RP18-HPLC.

2.2.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (131) durchgeführt. Als Proteinstandard diente BSA (Sigma). Es wurden 20 µl proteinhaltige Proben mit 1 ml Bradford-Reagenz (10 % (v/v) Ethanol, 5 % (v/v) Phosphorsäure, 0,1 % (w/v) Coomassie R-250) versetzt und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 578 nm bestimmt (Ultrospec 3000, Pharmacia, Uppsala, Schweden).

2.2.5 Periodat-Thiobarbitursäure-Assay

In der vorliegenden Arbeit wurde der Periodat-Thiobarbitursäure-Assay für die Konzentrationsbestimmung von Standardlösungen sowie zur Überprüfung der quantitativen HPLC-Ergebnisse verwendet.

Reagenz 1: Periodat 2,5 mg/ml in 57 mM H₂SO₄

Reagenz 2: Na-Arsenit 25 mg/ml in 0,5 M HCl

Reagenz 3: Thiobarbitursäure 71 mg/ml mit NaOH auf pH 9,0 eingestellt

Reagenz 4: 6 % (v/v) 10 M HCl in Butanol

Durchführung: Nach Essigsäure-Hydrolyse und Trocknung der Proben wurden diese in 50 µl aqua bidest. gelöst, mit 135 µl Reagenz 1 vermischt und bei 37 °C für 15 min im Thermoblock (Thermomixer Compact, Eppendorf) inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl Reagenz 2. Die Probe wurde so lange gemischt, bis die anfänglich braune Färbung verblasst. Nach Zugabe von 100 µl Reagenz 3 wurde die Probe 7,5 min bei 95 °C inkubiert. Schließlich erfolgte die Extraktion des entstandenen Farbstoffs mit 1,4 ml Reagenz 4. Hierzu musste die Probe intensiv gemischt und anschließend 20 min bei 13.000 rpm (Biofuge 13, Heraeus) zentrifugiert werden. Jeweils 800 µl der oberen Phase, die den roten Farbstoff enthielt, wurden bei 549 nm im Photometer (Ultrospec 3000, Pharmacia) vermessen. Als Standard diente eine 0,2 mM Neu5Ac-Lösung aus käuflich erworbener Neu5Ac (Sigma).

2.2.6 Chromatographische Methoden

Um Sialinsäuren quantitativ nachzuweisen, gibt es eine Reihe meist kolorimetrischer Verfahren wie den zuvor beschriebenen Periodat-Thiobarbitursäure-Assay oder die direkte Ehrlich-Reaktion. Diese Methoden können jedoch nicht zwischen verschiedenen Sialinsäuren unterscheiden. Chromatographische Techniken ermöglichen hingegen eine Differenzierung unterschiedlicher Sialinsäuren in einer Probe. Mittels high performance liquid chromatography (HPLC, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie) können verschiedene Sialinsäuren exakt voneinander getrennt, identifiziert und quantifiziert werden. Nach der Methode von Hara *et al.* (132) wurden die aus den Membranglycoproteinen isolierten Sialinsäuren mit dem Farbstoff 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzol (DMB)

derivatisiert, wodurch ein fluoreszenzaktives Molekül (Abb. 2.1) entsteht, was zu einer deutlichen Erhöhung der Detektionsempfindlichkeit führt. Dadurch sind noch Sialinsäuremengen im unteren Picomolbereich nachweisbar (132, 133).

Die Trennung und Quantifizierung fluoreszenzmarkierter Sialinsäuren erfolgte dann mittels Reversed Phase-HPLC unter Verwendung einer LiChrosorb C18-Säule der Firma Bischoff (Leonberg), denn durch die Markierung der Sialinsäuren mit DMB werden diese durch den aromatischen Rest sehr lipophil. Das Chromatographiesystem bestand aus zwei HPLC-Pumpen (Knauer, Berlin), einer Mischkammer (Knauer, Berlin), einem Fluoreszenzdetektor (Gynkotek, Germering) sowie einem 3-Wege-Handinjektionsventil (Knauer, Berlin). Die Pumpen wurden über ein Interface analog angesteuert. Als Software wurde ValueChrom 4.0 (Bio-Rad, München) verwendet, mit der auch die Aufzeichnung der Detektorsignale sowie die Auswertung erfolgte.

Um die Sialinsäuren mit Sicherheit differenzieren zu können, wurden Neu5Gc und Natriumpyruvat (beides von Sigma) als interne Standards eingesetzt (Abb. 3.1), wodurch sich für alle Peaks relative Retentionskoeffizienten (RRK) berechnen ließen, die erheblich genauer sind als relative Retentionszeiten (RRT). Durch die Ermittlung der RRK war es möglich, in den Chromatogrammen der *N*-Acylmannosamin-behandelten HL60- und BJA-B-Zellen die Peaks eindeutig der Neu5Ac oder der Neu5Prop zu zuordnen und diese zu quantifizieren. In gleicher Weise konnten so auch die Sialinsäureanaloge aus den Standardlösungen bzw. den Membranglycoproteinen der Analoga-behandelten Zellen eindeutig differenziert werden.

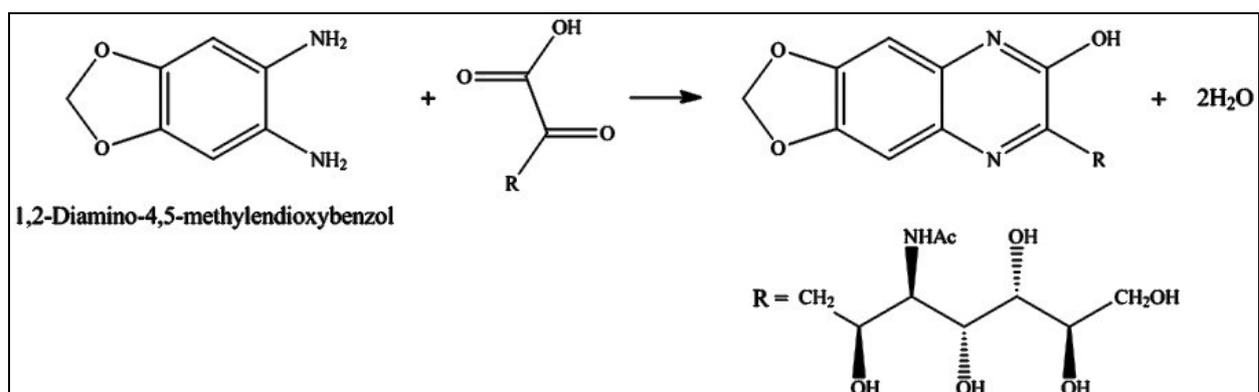


Abb. 2.1 Reaktionsschema der Fluoreszenzmarkierung einer α -Ketocarbonsäure mit DMB.

Der Farbstoff DMB reagiert spezifisch mit α -Ketocarbonsäuren und bildet ein bicyclisches fluoreszenzaktives Molekül. Mit dem Rest R wird hier die Reaktion mit Neu5Ac dargestellt. Abbildung aus Stehling (133).

Für die chromatographische Trennung von CMP-Sialinsäuren wurde ein HPLC-Gradientensystem Dionex Bio-LC (Dionex, Idstein) mit elektrochemischer Detektion (Dionex PAD II Detektor, Dionex, Idstein) verwendet. Die Aufzeichnung und Auswertung erfolgte mit einem Integrator SP 4270 (Spectra Physics, San Jose, USA) und der Software WINner/286 (Spectra Physics, San Jose, USA).

2.2.6.1 Isolierung von Sialinsäuren aus Membranglycoproteinen

Die Isolierung der Sialinsäuren aus den Membranglycoproteinen erfolgte in Anlehnung an die Vorgehensweise von Stehling (133). Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen aus den Kulturflaschen in 15 oder 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, für 3 min bei 900 rpm pelletiert und entweder sofort verarbeitet oder bei -80 °C gelagert. Zum Aufbrechen der Zellen wurden diese in 1 ml aqua bidest. aufgenommen, gemischt und für 15 min bei 4 °C belassen. Dann erfolgte die Abnahme eines Aliquots von 20 µl für die Proteinbestimmung. Nach Behandlung im Ultraschallbad über 5 min wurde die Zellen bei 13.000 rpm (Biofuge 13, Heraeus, Hanau) für 15 min zentrifugiert. Nach Abnahme und Verwerfen des Überstands wurde der Vorgang wiederholt, sodass die Zellen insgesamt dreimal mit aqua bidest. gewaschen wurden. Im Anschluss daran erfolgte die Lyophilisierung der Pellets (Lyovac GT2, Leybold-Heraeus, Köln). Die Delipidierung der getrockneten Pellets wurde danach mittels Chloroform/Methanol-Extraktion durchgeführt. Nach Aufnahme in 1 ml Chloroform/Methanol (2:1, v/v), Mischen der Proben und Behandlung über 5 min im Ultraschallbad. Anschließend Zentrifugation bei 4 °C mit 10.000 rpm 30 min zentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus, Hanau). Nach Abnahme und Verwerfen der Überstände wurde dieser Schritt mit Chloroform/Methanol (1:1, v/v) und Chloroform/Methanol (1:2, v/v) wiederholt, und die Pellets schließlich bei 37 °C im Thermoblock getrocknet. Nach Aufnahme der Pellets in 200 µl 2 M Essigsäure, Mischen und Behandlung im Ultraschallbad über 5 min erfolgte die saure Hydrolyse der Proben über 1 h bei 80 °C im Thermoblock (Thermomixer Compact, Eppendorf), um die Sialinsäuren von den Membranglycoproteinen abzuspalten. Um die Proben nach der Hydrolyse rasch weiter verarbeiten zu können, wurden sie für 15 min auf Eis abgekühlt und dann mittels Vakuumzentrifuge zur Trockne eingeengt (UNIVAPO 150H, UniEquip, Martinsried). Nach der ersten Trocknung Aufnahme der Pellets in 200 µl aqua bidest., Mischen und Behandlung im Ultraschallbad über 5 min sowie erneute Trocknung mittels Vakuumzentrifuge. Nach Resuspendierung der Proben in 100 µl aqua bidest., Mischen und erneuter Behandlung im Ultraschallbad sowie Einstellung des pH-Wertes auf 4-6 mit 2 M Essigsäure wurden die

Sialinsäure-haltigen Proben zum Entsalzen über ein Gelbett (1 ml) eines Kationenaustauscher (AG-50W-X12, H⁺-Form, 100-200 mesh, Bio-Rad, München) gegeben. Die Säule wurde mit 3 x 1 ml aqua bidest. gespült und der gesamte Durchlauf in Bördelrandgläsern aufgefangen und im Schüttelevaporator eingeeengt (Vapor Mix S-10, Eyela, Tokyo, Japan). Nach erneuter Aufnahme der Sialinsäure-haltigen Proben in 100 µl aqua bidest. waren diese bereit für die Markierung mit 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzol (DMB).

2.2.6.2 Markierung von Sialinsäuren mit 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzol

Fluoreszenzreagenz: 7 mmol/l 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzol · 2 HCl (DMB)
18 mmol/l NaHSO₃
0,75 mol/l 2-Mercaptoethanol

1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzol und 2-Mercaptoethanol wurden von der Firma Sigma bezogen. Das Fluoreszenzreagenz war nach der Herstellung bis zu 12 Wochen bei -20 °C stabil. Zur Markierung der Sialinsäuren erfolgte die Zugabe von 20 µl der Sialinsäure-haltigen Probe oder Standardlösung zu 100 µl Fluoreszenzreagenz und anschließende Inkubation für 2,5 h im Dunkeln bei 56 °C im Thermoblock. Die mit DMB-derivatisierten Sialinsäuren waren mehrere Wochen bei -20 °C stabil und zeigten keinen Verlust der Fluoreszenzintensität in der HPLC-Analyse.

2.2.6.3 Trennung und Quantifizierung modifizierter Sialinsäuren über RP18-HPLC

Die fluoreszenzmarkierten Sialinsäuren wurden in Abhängigkeit ihrer Substituenten und des daraus resultierenden Anstiegs der Hydrophobizität unterschiedlich stark von der RP18-Säule retardiert. Die Sialinsäuren wurden mit isokratischem Gradienten aus Acetonitril/Methanol mit einer Flussrate von 0,5 ml/min getrennt. Im Anschluss an jede Elution wurde die Säule für 10 min mit 100 % Eluent B gespült und für weitere 10 min reäquilibriert. Das für die HPLC-Analytik benötigte aqua bidest. wurde zuvor filtriert (Millipore, Schwalbach). Das verwendete Methanol wurde in HPLC-reiner Qualität von der Firma Roth bezogen.

Eluent A: H₂O
 Eluent B: CH₃CN/CH₃OH 6:4 (v/v)
 Säule: LiChrosorb C18 5,0 µm, 250 × 3,0 mm (Bischoff, Leonberg)
 Detektion: Fluoreszenzdetektor Gynkotek, ex 373 nm, em 448 nm

Tab. 2.3 Gradienten der Eluenten zur Trennung von DMB-markierten Sialinsäuren.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Bemerkungen
0,00	90	10	
0,01	90	10	Injektionsventil auf
1,00	90	10	Injektionsventil zu
10,00	90	10	
55,00	75	25	

2.2.6.4 Extraktion von CMP-Sialinsäuren

Die Extraktion der CMP-Sialinsäuren erfolgte nach der Methode von Fritsch *et al.* (134). Da es sich bei den CMP-Sialinsäuren um sehr säurelabile Verbindungen handelt, wurde ihre Extraktion im Basischen durchgeführt. Alle Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben geerntet und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellpellets mit 2 ml eiskaltem Extraktionspuffer (50 mM Ammoniumhydrogencarbonat, pH 8,0) resuspendiert und mit einem Ultraschallstab für 2 min behandelt. Nach Zentrifugation bei 100.000 x g (Centrifuge T-2070, Kontron Instruments) für 30 min wurde der Überstand in ein zweites Zentrifugenröhrchen überführt und ein Aliquot für die Proteinbestimmung entnommen. Zur Fällung der löslichen Proteine wurden zum Überstand 4,5 ml eisgekühltes Ethanol (70 % v/v) hinzugegeben und das Gemisch erneut bei 100.000 x g für 30 min zentrifugiert. Der CMP-Sialinsäuren-enthaltende Überstand wurde mittels Schüttelevaporator eingedunstet und anschließend erneut in 5 ml aqua bidest. gelöst und auf eine in die Acetat-Form überführte DEAE-Sephacel-Säule 0,8 ml (Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgetragen. Die Säule wurde zweimalig mit 8,0 ml aqua bidest. und anschließend mit 8,0 ml 20 mM Ammoniumacetat gespült. Freie Sialinsäuren ließen sich so von der Säule herunter waschen. Die CMP-Sialinsäuren wurden schließlich mit 8,0 ml 70 mM Ammoniumacetat eluiert. Zum Entsalzen wurde das Eluat lyophilisiert, in 5 ml aqua bidest. aufgenommen, wieder lyophilisiert und dann wieder in aqua bidest. aufgenommen. Die Trennung und Quantifizierung der CMP-Sialinsäuren erfolgte mittels

Hochdruck-Anionenaustauscherchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD).

2.2.6.5 Trennung von CMP-Sialinsäuren durch HPAEC-PAD

Die Flussrate war konstant 1,0 ml/min, die Größe des Probenauftrags betrug 50 µl. Die Säule wurde nach jeder Elution für 10 min mit 100 mM NaOH reäquilibriert. CMP-Neu5Ac von Sigma wurde als Standard zur Ermittlung der relativen Retentionszeit und zur Quantifizierung der CMP-Sialinsäuren aus den Zellen verwendet.

Eluent A: 100 mM NaOH
5,75 ml 50 %ige Natronlauge (NaOH)
ad 1 l filtriertem, Helium-begastem H₂O bidest.

Eluent B: 100 mM NaOH/600 mM NaOAc
5,75 ml 50 %ige Natronlauge (NaOH)
49,2 g Natriumacetat, wasserfrei (NaCH₃COO)
ad 1 l filtriertem, Helium-begastem H₂O bidest.

Säule: CarboPac PA-100 (250 × 4,6 mm)

Detektion: PAD, 300 nA

Die Puls-Potentiale und Puls-Zeiten des PAD-Detektors waren auf $E_1 = 0,05 \text{ V}/t_1 = 420 \text{ ms}$, $E_2 = 0,75 \text{ V}/t_2 = 180 \text{ ms}$ und $E_3 = -0,20 \text{ V}/t_3 = 360 \text{ ms}$ eingestellt.

Tab 2.4 Gradienten der Eluenten zur Trennung von CMP-Sialinsäuren.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Bemerkungen
0.00	96	4	
0.01	96	4	Injektionsventil auf
1.00	96	4	Injektionsventil zu
45.00	54	46	
46.00	0	100	
55.00	0	100	
56.00	96	4	
65.00	96	4	Neustart

2.2.6.6 Bestimmung des relativen Anteils von CMP-Neu5Prop

Aus einem Teil der CMP-Sialinsäure-Probe wurden die relativen Anteile von CMP-Neu5Ac und CMP-Neu5Prop am Gesamt-CMP-Sialinsäure-Pool bestimmt. Hierzu wurden die Sialinsäuren durch saure Hydrolyse in 2 M Essigsäure bei 80 °C freigesetzt, mit DMB fluoreszenzmarkiert und wie zuvor beschrieben mittels RP18-HPLC analysiert.

2.3 Mathematisch-statistische Methoden

2.3.1 Statistische Auswertung

Die Werte experimenteller Messungen wurden als arithmetisches Mittel mit ihrer jeweiligen Standardabweichung angegeben. Signifikanzbestimmungen für Vergleiche zwischen zwei unabhängigen Gruppen erfolgten mit dem ungepaarten Student's *t*-Tests. Für Vergleiche zwischen mehr als zwei Gruppen wurde zur Signifikanzbestimmung ein ANOVA-Test (Analysis Of Variance) gefolgt von Post-hoc-Mehrfachvergleichstests unter Verwendung von GraphPad Prism Version 6.0c (GraphPad Software, La Jolla California, USA) durchgeführt. Die Grenze für die Zufallswahrscheinlichkeit wurde auf 5 % ($p < 0,05$) festgelegt.

2.3.2 Relative Retentionskoeffizienten

Die Berechnung der relativen Retentionskoeffizienten erfolgte aus den Retentionszeiten t_R der einzelnen Peaks nach der Formel von Lomax und Conchie (135). Hierzu wurde der Retentionskoeffizient des ersten internen Standards als 1 und der des zweiten internen Standards als 2 definiert.

$$RRK = \frac{t_R (P_2 - P_1) + P_1 t_{R2} - P_2 t_{R1}}{t_{R2} - t_{R1}}$$

RRK = relativer Retentionskoeffizient

t_R = Retentionszeit

P_1 = Retentionskoeffizient des ersten internen Standards

P_2 = Retentionskoeffizient des zweiten internen Standards

t_{R1} = Retentionszeit des ersten internen Standards

t_{R2} = Retentionszeit des zweiten internen Standard

Darstellung nach Stehling (133)

3 Ergebnisse

3.1 Modifikation membranständiger Glykokonjugate von HL-60- und BJA-B-Zellen mit *N*-Propanoylmannosamin

3.1.1 Chromatographische Trennung und Quantifizierung modifizierter Sialinsäuren

Um den Einbau von natürlichen und modifizierten Sialinsäuren in Membranglycokonjugaten von kultivierten HL60- und BJA-B-Zellen nach Behandlung mit *N*-Acylmannosaminen nachzuweisen bzw. deren Anteil an der Gesamtsialylierung zu bestimmen, wurden die aus den Membranglycoproteinen isolierten Sialinsäuren mittels RP18-HPLC analysiert. Aufgrund der notwendigen Delipidierung bei der Aufarbeitung der Zellpellets für die HPLC-Analytik konnten mit Hilfe dieses Verfahrens nur die Sialinsäuren aus Membranglycoproteinen aber nicht aus den Membranglycolipiden bestimmt werden. Unter Verwendung von Neu5Gc und Natriumpyruvat als interne Standards konnte die modifizierte Sialinsäure Neu5Prop eindeutig von der natürlichen Neu5Ac unterschieden und quantifiziert werden. Im Chromatogramm C der Abb. 3.1 ist ein deutlicher Anstieg des Neu5Ac-Peaks nach Behandlung hyposialylierter HL60-I-Zellen mit ManNAc gegenüber den unbehandelten HL60-I-Zellen im Chromatogramm B erkennbar. Im Chromatogramm D tritt nach Behandlung von HL60-I-Zellen mit ManNProp ein weiterer Peak bei etwa 34 min auf, der die modifizierte Sialinsäure Neu5Prop repräsentiert.

3.1.2 Optimierung der Inkubationszeit zur Maximierung des Anteils modifizierter Sialinsäuren in Membranglycoproteinen

Aus vorherigen Arbeiten war für einige Zelllinien bekannt, dass für Sialinsäurevorläufer Konzentrationen zwischen 5 bis 10 mM im Zellkulturmedium erforderlich sind, um einen relevanten Anteil an modifizierten Sialinsäuren in den Membranglycoproteinen der behandelten Zellen zu erhalten (108, 109). Für die verschiedenen Zelltypen variierte jedoch die Dauer der gewählten Inkubationszeit. Deshalb wurde zunächst die Bestimmung der optimalen Inkubationszeit vorgenommen, nach der sich ein maximaler Anteil an modifizierten Sialinsäuren in den Membranglycoproteinen findet. Hierzu wurden HL60- und BJA-B-Subklone über 96 h mit einer Konzentration von 10 mM ManNProp inkubiert. Nach jeweils 24 h erfolgte die Entnahme eines Aliquots aus der Zellkultur.

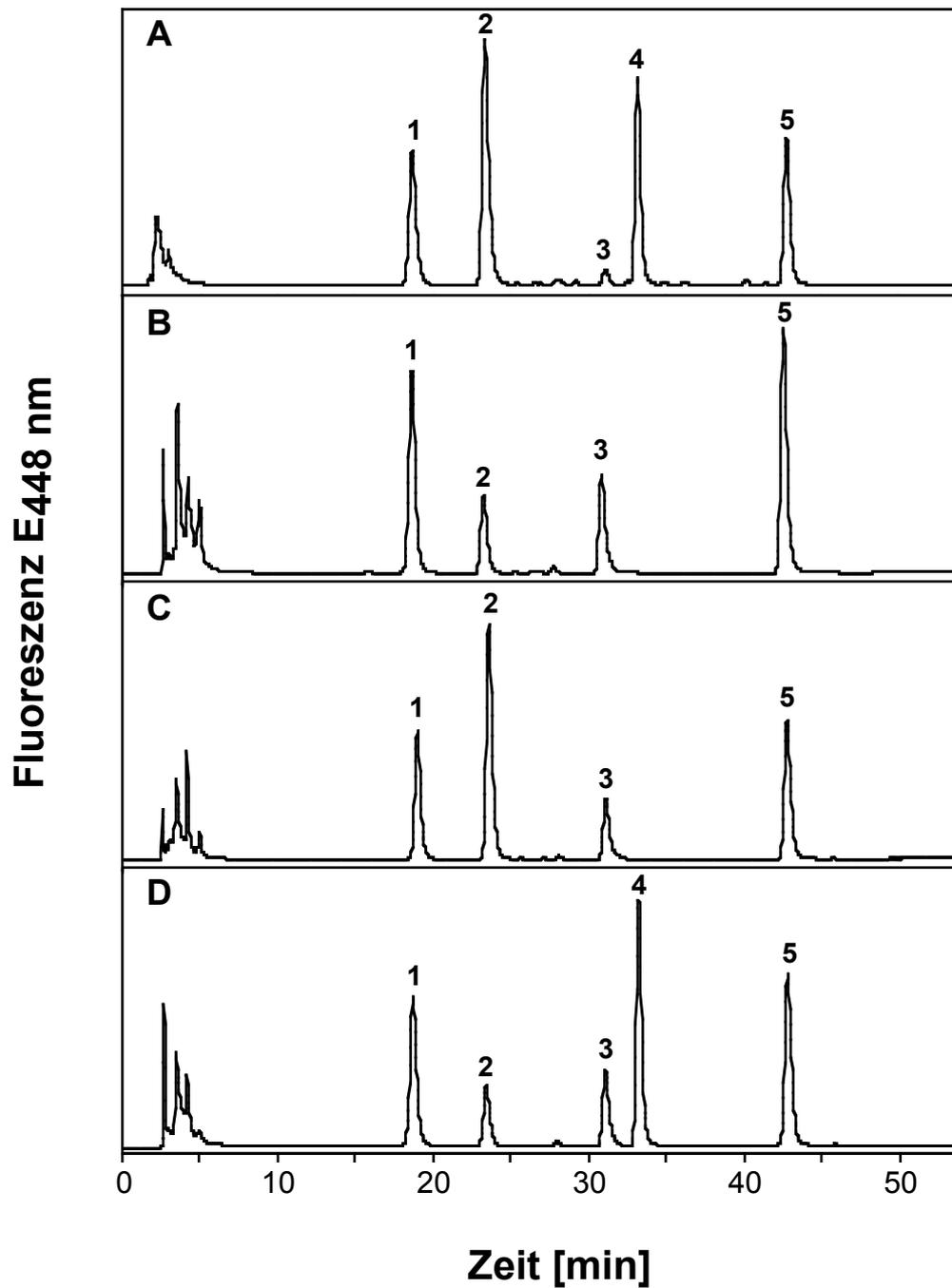


Abb. 3.1 Trennung von DMB-markierten Sialinsäuren über RP18-HPLC.

(A) Standard; (B) unbehandelte HL60-I-Zellen; (C) ManNAc-behandelte HL60-I-Zellen; (D) ManNProp-behandelte HL60-I-Zellen. Zellen wurden über je 72 h mit 10 mM des *N*-Acylmannosamin-behandelt und die Sialinsäuren gemäß 2.2.6.1 und 2.2.6.2 aus den Membranglycoproteinen isoliert und mit DMB markiert. 1 = Neu5Gc (interner Standard); 2 = Neu5Ac; 3 = freies DMB; 4 = Neu5Prop; 5 = Na-Pyruvat (interner Standard).

In der Durchflusszytometrie ManNProp-behandelter HL60-I-Zellen, die keine Aktivität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase aufweisen, zeigte sich nach Färbung mit dem Sialinsäure-bindenden Lektin LFA bereits nach 24 h ein sprunghafter Anstieg der Oberflächensialylierung (Abb. 3.2). Nach 72 h erfolgte keine weitere Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). Stattdessen kam es sogar zu einem leichten Rückgang der Oberflächensialylierung nach 96 h. Aus dem Versuch ergab sich, dass bei HL60-I-Zellen eine Maximierung der Oberflächensialylierung innerhalb von 72-96 h erfolgt war. Als Inkubationszeit für die nachfolgenden Experimente wurden daher 72 h als sinnvoll erachtet.

Die Untersuchung der verwendeten Zellen mit LFA in der Durchflusszytometrie zeigte nur Veränderungen der Gesamtoberflächensialylierung an und erlaubt keine Aussage über die Anteile verschiedener Sialinsäurederivate in den Membranglycoproteinen. Deshalb erfolgte im nächsten Schritt die Analyse der Sialinsäuren mittels HPLC (Abb. 3.3). Diese zeigte eine

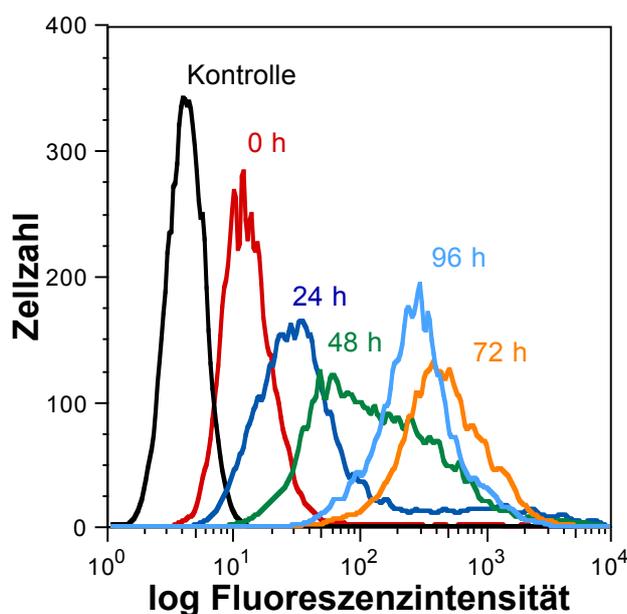


Abb. 3.2 Kinetik der Oberflächensialylierung von HL60-I-Zellen nach Behandlung mit ManNProp und Bestimmung der LFA-Bindung in der Durchflusszytometrie.

Die Oberflächensialylierung wurde durch das Sialinsäure-bindende und FITC-konjugierte Lektin LFA mittels Durchflusszytometrie zu Beginn der Inkubationsperiode (0 h) sowie nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h mit 10 mM ManNProp bestimmt. Als Kontrolle sind hier nicht gefärbte HL60-I-Zellen dargestellt.

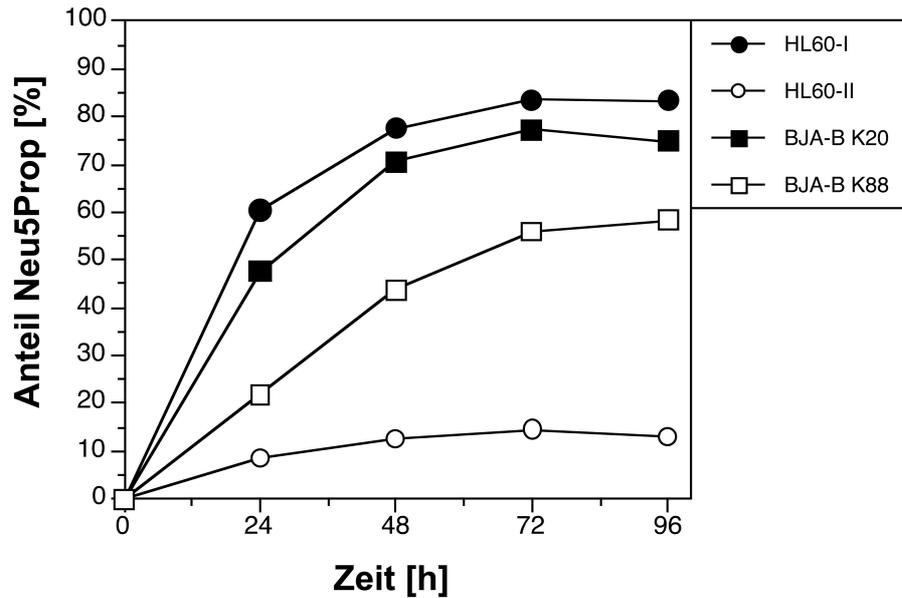


Abb. 3.3 Kinetik des Einbaus von Neu5Prop in membrangebundene Glycoproteine von HL60- und BJA-B-Subklonen.

Zellen wurden über 96 h mit 10 mM ManNProp inkubiert. Die Bestimmung des Anteils von Neu5Prop zu Neu5Ac erfolgte mittels RP18-HPLC. Die Werte der HL60-Subklone stellen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten dar. Für die BJA-B-Subklone erfolgte jeweils nur eine Messung.

Zunahme des relativen Anteils der modifizierten Sialinsäure Neu5Prop gegenüber Neu5Ac in allen Subklonen innerhalb der ersten 72 h. Danach kam es zur Ausbildung eines Plateaus ohne relevanten Anstieg des Anteils der Neu5Prop trotz längerer Inkubation bis 96 h. Interessanterweise erreichte die modifizierte Sialinsäure Neu5Prop in beiden UDP-GlcNAc-2-Epimerase-defizienten Subklonen HL60-I und BJA-B K20 maximale Einbauraten um 80 %, während sich die Neu5Prop-Anteile in UDP-GlcNAc-2-Epimerase-kompetenten HL60-II- und BJA-B K88-Zellen mit etwa 14 % und 56 % deutlich unterschieden. Die optimale Inkubationszeit mit *N*-Acylmannosaminen lag für die untersuchten Subklone somit bei 72 h, da sich zu diesem Zeitpunkt der höchste Anteil von Neu5Prop im Verhältnis zu Neu5Ac in den Membranglycoproteinen fand.

3.1.3 Optimierung der *N*-Acylmannosamin-Konzentration zur Maximierung des Anteils modifizierter Sialinsäuren in Membranglycoproteinen

Die Ergebnisse, die bei der Bestimmung der optimalen Inkubationszeit gewonnen wurden, belegten, dass sich mit einer ManNProp-Konzentration von 10 mM im Zellkulturmedium ein relativer Neu5Prop-Anteil von über 80 % in dem UDP-GlcNAc-2-Epimerase-defizienten HL60-I-Subklon erzielen lässt. Im Folgenden galt es zu prüfen, ob vergleichbar hohe Anteile modifizierter Sialinsäuren in den Membranglycoproteinen auch mit einer geringeren Konzentration an ManNProp erreichbar sind. Deshalb wurden HL60-I- und HL60-II-Zellen über 72 h mit Konzentrationen von 5 mM, 7,5 mM und 10 mM ManNProp inkubiert.

Wie in Abbildung 3.4 dargestellt, war der Anteil modifizierter Sialinsäuren in membrangebundenen Glycoproteinen beider HL60-Subklone bei einer ManNProp-Konzentration von 10 mM im Kulturmedium am größten. Für die HL60-I-Zellen wurde im Mittel ein maximaler Anteil von Neu5Prop von 78 % und für die HL60-II-Zellen von knapp

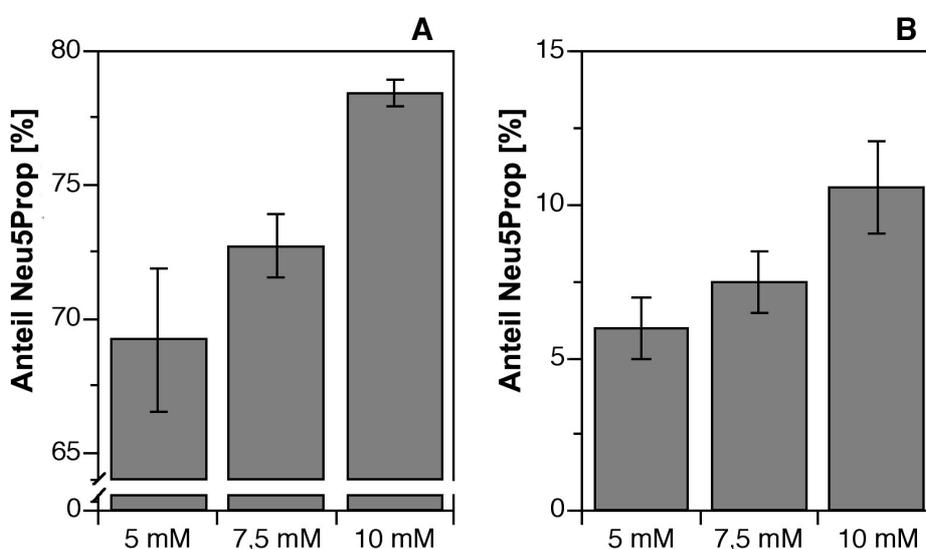


Abb. 3.4 Neu5Prop-Anteil in membrangebundenen Glycoproteinen bei unterschiedlichen ManNProp-Konzentrationen im Kulturmedium.

Dargestellt ist der Anteil von Neu5Prop im Verhältnis zu Neu5Ac in den membrangebundenen Glycoproteinen von (A) HL60-I- und (B) HL60-II-Zellen. Die Zellen wurden jeweils über 72 h bei unterschiedlichen ManNProp-Konzentrationen inkubiert. Die Bestimmung der Verhältnisse von Neu5Prop zu Neu5Ac erfolgte mittels RP18-HPLC nach 2.2.6.3. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) aus fünf unabhängigen Messungen.

11 % gemessen. Während sich bei den HL60-II-Zellen der Anteil von Neu5Prop im Verhältnis zu Neu5Ac in den Membranglycoproteinen bei einer Erhöhung der ManNProp Konzentration von 5 mM auf 10 mM fast verdoppelte, zeigte sich bei einer Konzentrationssteigerung von 7,5 mM auf 10 mM noch ein Anstieg um den Faktor 1,4. Im Vergleich hierzu fiel die Steigerung des Neu5Prop-Anteils bei HL60-I-Zellen, die durch eine Konzentrationserhöhung von 5 mM auf 10 mM ManNProp zu erzielen war, mit einem Faktor von 1,1 zwar sehr viel geringer aus, führte aber zu einer signifikanten Erhöhung des Neu5Prop-Anteils in den Membranglycoproteinen von 69 % auf 78 %. Für den untersuchten Konzentrationsbereich lag die optimale *N*-Acylmannosamin-Konzentration im Zellkulturmedium für HL60-Zellen somit bei 10 mM.

3.1.4 Bestimmung des relativen Anteils von Neu5Prop in Membranglycoproteinen

Nach Bestimmung der optimalen Inkubationszeit und der optimalen Konzentration von ManNProp im Kulturmedium zur Maximierung des relativen Anteils *N*-propanoylierter Sialinsäuren in Membranglycokonjugaten sollte für die HL60-Zellen mit einer höheren Anzahl von Messungen geklärt werden, ob die Neu5Prop-Inkorporation unter den gewählten Inkubationsbedingungen größeren Schwankungen unterworfen sein würde, oder ob für die weiteren Experimente von einer stabilen Expression von modifizierten Sialinsäuren in den Membranglycoproteinen ausgegangen werden konnte. Für die HL60-I-Zellen wurde ein Neu5Prop-Anteil bis zu 85 %, jedoch im Mittel von rund 80 %, und für die HL60-II-Zellen von 15 % bei $n = 13$ bzw. $n = 20$ gemessen (Tab. 3.1). Für die weiteren Versuche konnte also von stabilen Einbauraten der Neu5Prop in HL60-Zellen ausgegangen werden. Im Vergleich dazu wurde für den BJA-B K20-Subklon ein Wert von 80 % und für den K88-Subklon ein Neu5Prop-Anteil von 56 % in den Membranglycoproteinen bestimmt (jeweils $n = 3$).

Tab. 3.1 Relativer Anteil von Neu5Prop an den Gesamtsialinsäuren in Zellkulturen.

Relativer Anteil von Neu5Prop zu Neu5Ac in membrangebundenen Glycoproteinen von HL60-I- ($n = 13$), HL60-II- ($n = 20$) sowie den BJA-B-Subklonen K20 ($n = 3$) und K88 ($n = 3$) nach Inkubation mit 10 mM ManNProp über 72 h. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD.

Zelltyp	Relativer Anteil von Neu5Prop [%]
HL60-I	80,5 \pm 3,1
HL60-II	15,0 \pm 5,1
BJA-B K20	79,0 \pm 1,9
BJA-B K88	56,2 \pm 0,2

3.1.5 Desialylierung und Resialylierung nach ManNProp-Behandlung

Um zu prüfen, ob sich der Anteil modifizierter Sialinsäuren in den Membranglykokonjugaten weiter steigern lässt, wurden HL60-Zellen über 72 h mit 10 mM ManNProp behandelt. Anschließend erfolgte bei einem Teil der behandelten Zellen die Bestimmung des Anteils modifizierter Sialinsäuren in den Membranglycoproteinen mittels RP18-HPLC. Bei dem anderen Teil der behandelten Zellen wurde die Zelloberfläche enzymatisch mit Sialidase aus *Vibrio cholerae* desialysiert. Dann wurden die desialylierten Zellen erneut mit ManNProp über 72 h kultiviert. Abschließend erfolgte auch bei diesen Zellen die Bestimmung des relativen Neu5Prop-Anteils in den Membranglycoproteinen (Tab. 3.1). Auf diesem Weg sollte der CMP-Sialinsäure-Pool mit modifizierten CMP-Sialinsäuren angereichert werden und dann für die Resialylierung einer Sialinsäure-freien Zelloberfläche zur Verfügung stehen. Bei den HL60-I-Zellen konnte keine Steigerung des bereits hohen Anteils modifizierter Sialinsäuren in den Membranglycoproteinen erzielt werden. Bei den HL60-II-Zellen ließ sich der Neu5Prop-Anteil leicht, aber dennoch signifikant, erhöhen.

Tab. 3.2 Neu5Prop-Anteil ohne und mit Sialidase-Behandlung.

Relativer Anteil von Neu5Prop an den Sialinsäuren der Membranglycoproteine in Prozent von HL60-Zellen vor bzw. nach Behandlung mit Sialidase und erneuter Inkubation mit 10 mM ManNProp. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Messungen.

Zelltyp	ohne Sialidase-Behandlung	mit Sialidase-Behandlung
HL60-I	78,2 \pm 0,2	80,2 \pm 4,7
HL60-II	8,8 \pm 1,6	12,7 \pm 0,7

3.2 Charakterisierung ManNProp-modifizierter Membranglykokonjugate in HL60- und BJA-B-Zellen

3.2.1 Bestimmung des Gesamtsialinsäuregehalts in Membranglycoproteinen

Um zu klären, ob sich der Sialinsäuregehalt in den Membranglycoproteinen von HL60-Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen *N*-Acylmannosaminen unterscheidet, erfolgte die Bestimmung der Gesamtsialinsäuremenge nach Behandlung der Zellen mit 10 mM *N*-Acylmannosaminen über 72 h mittels quantitativer RP18-HPLC-Analyse.

Während es bei den hyposialylierten HL60-I-Subklonen zu einer Verfünffachung der membrangebundenen Sialinsäuren kam, ließ sich bei den UDP-GlcNAc-2-Epimerase-kompetenten HL60-II-Subklonen kein signifikanter Anstieg der Gesamtsialinsäuremenge nachweisen (Tab. 3.2). Die Veränderung der Gesamtsialinsäuremenge war unabhängig vom verwendeten *N*-Acylmannosamin, d.h. die beiden im Medium angebotenen Sialinsäurevorläufer ManNAc und ManNProp wurden offenbar in etwa gleicher Menge in die Membranglycoproteine der jeweiligen Subklone eingebaut. Die Menge modifizierter Sialinsäuren kann bei den HL60-I-Subklonen mehr als 1 nmol/10⁷ Zellen betragen.

Tab. 3.3 Sialinsäuregehalt der Membranglycoproteine von HL60-Zellen ohne und mit *N*-Acylmannosamin-Behandlung.

HL60-Zellen wurden ohne und mit 10 mM *N*-Acylmannosaminen über 72 h inkubiert. Der Sialinsäuregehalt wurde mittels quantitativer HPLC-Analyse bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte ± SD aus mindestens fünf unabhängigen Messungen.

Zelltyp	Sialinsäuregehalt [nmol/10 ⁷ Zellen]
HL60-I	0,2 ± 0,1
HL60-I + ManNAc	1,2 ± 0,4
HL60-I + ManNProp	1,0 ± 0,4
HL60-II	2,5 ± 0,4
HL60-II + ManNAc	2,8 ± 0,8
HL60-II + ManNProp	2,8 ± 0,7

3.2.3 Bindungsverhalten von Lektinen an Zelloberflächenglycokonjugaten nach Behandlung mit ManNProp

Um die Bindungspartner von *N*-acetylierten und *N*-propanoylierten Sialinsäuren sowie mögliche Unterschiede in den Glycanstrukturen zwischen HL60-I- und HL60-II-Zellen zu bestimmen, wurde das Bindungsverhalten verschiedener Lektine an unbehandelten und *N*-Acylmannosamin-behandelten Zellen untersucht. In der Regel binden Lektine an terminale Mono- oder Oligosaccharide von Polysacchariden oder Glycokonjugaten. Eine Ausnahme bildet das Lektin Con A, das auch an interne Mannose-haltige Strukturen bindet (siehe auch Tab. 2.1). Die verwendeten Lektine VVA, PNA, SBA und Con A binden selber nicht an Sialinsäuren. Stattdessen erkennen sie die häufigsten Bindungspartner der Sialinsäuren, Galactose und *N*-Acetylgalactosamin. Einzig das Lektin LFA bindet direkt an terminale Sialinsäuren der

Oligosaccharide. Das Bindungsverhalten der mit einem fluoreszierenden Farbstoff konjugierten Lektine an die Membranglykokonjugate *N*-Acylmannosamin-behandelter HL60-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

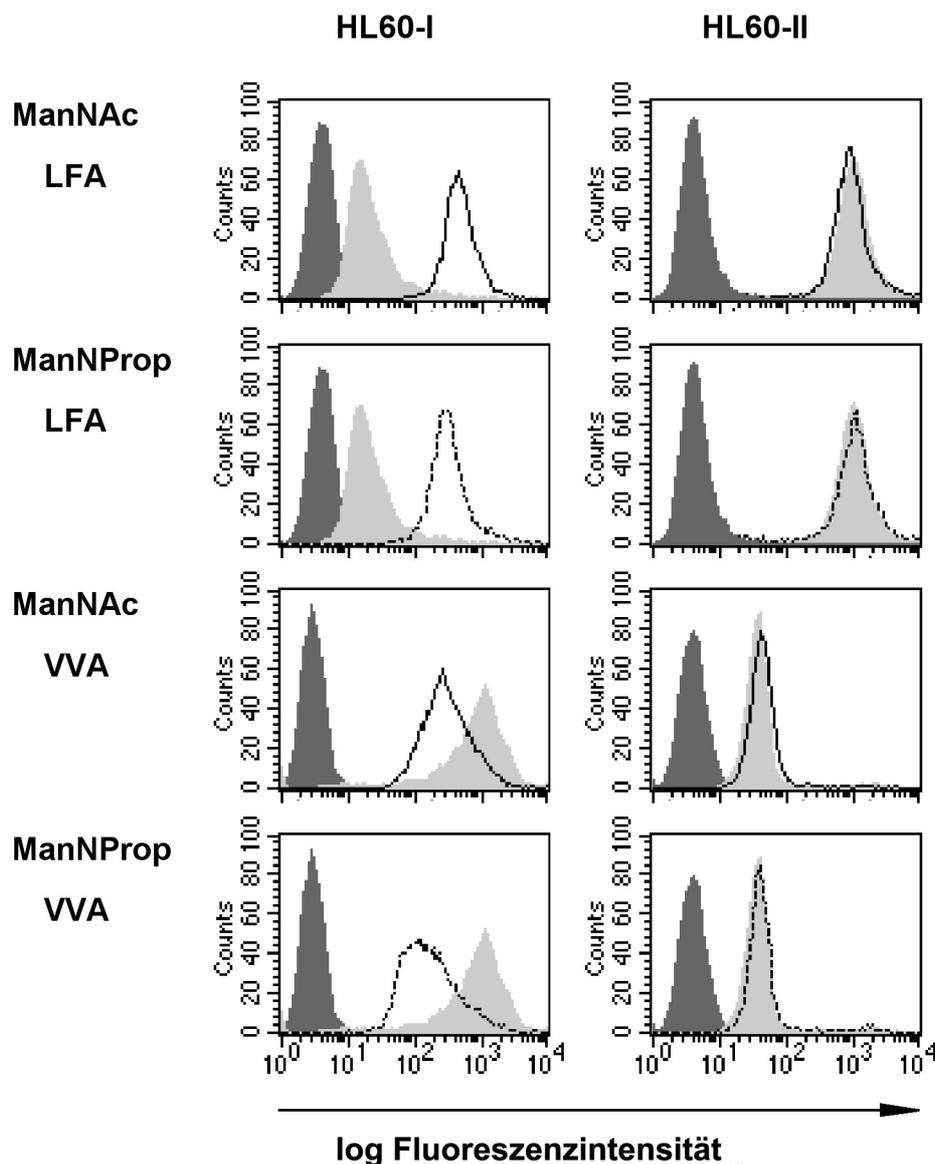


Abb. 3.6 Bestimmung der Zelloberflächensialylierung mittels Durchflusszytometrie.

Die Histogramme stellen die Expression von Sialinsäuren (LFA) oder unmaskierten GalNAc-Resten (VVA) auf der Oberfläche von hyposialylierten HL60-I- und normal sialylierten HL60-II-Zellen dar. Die Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte mit den FITC-konjugierten Lektinen LFA und VVA in der Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden zuvor drei Tage mit 10 mM ManNAc (schwarze Linie) oder ManNProp (gebrochene schwarze Linie) behandelt. Die Histogramme unbehandelter Zellen (hellgrau) und von Zellen ohne Lektin-Färbung (dunkelgrau) sind als Vergleichswerte dargestellt.

3.2.3.1 Bindung terminaler Neu5Prop durch LFA

In der Durchflusszytometrie zeigte sich eine vielfach höhere Bindungsaktivität des Lektins LFA an die unbehandelten normal sialylierten HL60-II-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten hyposialylierten und UDP-GlcNAc-2-Epimerase-defizienten HL60-I-Zellen (Abb. 3.6, obere vier Histogramme). Entsprechend fand sich eine geringere VVA-Bindung an den HL60-II-Zellen gegenüber den HL60-I-Zellen, da bei den HL60-II-Zellen die VVA-Bindungsstellen durch Sialinsäuren besetzt waren (Abb. 3.6, untere vier Histogramme).

Nach Behandlung der HL60-I-Zellen mit ManNAc oder mit ManNProp konnte ein deutlicher Anstieg der Bindung des Lektins LFA gegenüber den unbehandelten Zellen nachgewiesen werden. Dieser Anstieg spiegelt eine Erhöhung der Oberflächensialylierung der HL60-I-Zellen wider. Entsprechend fand sich ein Rückgang der VVA-Bindung infolge Besetzung präterminaler GalNAc-Reste durch Neu5Ac bzw. Neu5Prop. Bei den ManNProp-behandelten HL60-I-Zellen war die MFI nach LFA-Färbung jedoch signifikant niedriger gegenüber den ManNAc-behandelten Zellen (Abb. 3.7). Wie auch bei der quantitativen HPLC-Analyse erreichten die HL60-I-Zellen im LFA-Bindungsassay nach Behandlung mit den *N*-Acylmannosaminen nicht die Werte der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-kompetenten HL60-II-Zellen.

Bei den HL60-II-Subklonen waren keine signifikanten Veränderungen der Lektinbindung messbar. Jedoch fällt auch hier eine tendenziell niedrigere MFI nach LFA-Färbung der ManNProp-behandelten gegenüber den ManNAc-behandelten Zellen auf (Abb. 3.7).

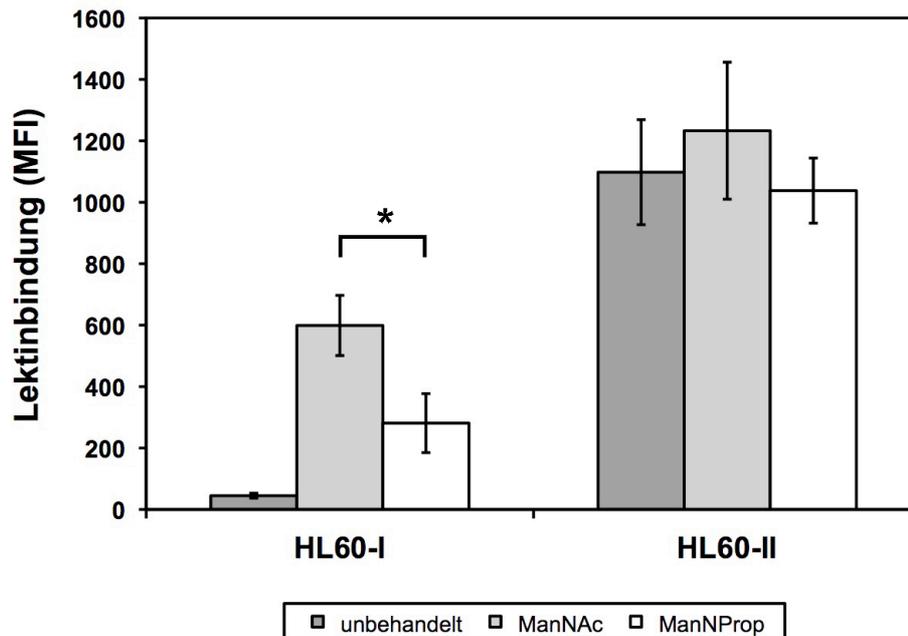


Abb. 3.7 Einfluss *N*-Acyl-modifizierter Sialinsäuren auf das Bindungsverhalten von LFA.

Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) von HL60-Subklonen in der Durchflusszytometrie nach Färbung mit FITC-konjugiertem LFA. Nach dreitägiger Behandlung mit 10 mM ManNProp ist die Bindung von LFA bei den HL60-I-Zellen deutlich geringer als nach ManNAc-Behandlung. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD aus fünf unabhängigen Messungen. Der Stern * markiert einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den beiden *N*-Acylmannosamin-behandelten Gruppen.

3.2.3.2 Expression freier Sialinsäurebindungsstellen in Membranglykokonjugaten

Durch das Lektin LFA konnte ein deutlicher Anstieg der Oberflächensialylierung nach Behandlung der HL60-I-Zellen sowohl durch ManNAc als auch durch ManNProp nachgewiesen werden. Allerdings fiel der signifikant geringere Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität bei den ManNProp-behandelten Zellen auf. Dies widerspricht der Annahme, dass Neu5Ac und Neu5Prop gleichermaßen in die Membranglycoproteine eingebaut werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese erfolgte eine genauere Analyse der Veränderung freier Bindungsstellen für Sialinsäuren durch die Lektine VVA, SBA und PNA in den Membranglykokonjugaten unbehauelter, ManNAc- und ManNProp-behandelter HL60-I- und HL60-II-Zellen.

In der Durchflusszytometrie war die MFI der Lektine, die freie Sialinsäurebindungsstellen anzeigen, bei den unbehauelten, hyposialylierten HL60-I-Zellen höher im Vergleich zu den HL60-II-Zellen (Abb. 3.8). Bei den HL60-I-Zellen reduzierte sich die MFI bei der VVA-, SBA-

und PNA-Färbung nach Behandlung mit ManNAc oder ManNProp deutlich. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede im Lektinbindungsmuster von VVA, SBA und PNA zwischen den ManNAc- und ManNProp-behandelten HL60-I-Zellen (Abb. 3.8 A). Jedoch bestand ein tendenziell stärkerer Abfall der Lektinbindung nach ManNProp-Behandlung.

Bei den HL60-II-Subklonen war nach Behandlung mit den *N*-Acylmannosaminen keine Änderung der Lektinbindung von VVA und SBA messbar (Abb. 3.8 B). Für das Lektin PNA, das an Gal- β 1,3-GalNAc-Reste bindet, waren die MFI nach ManNAc- bzw. ManNProp-Behandlung signifikant niedriger gegenüber den unbehandelten HL60-II-Zellen (Abb. 3.8 B). Durch die Behandlung mit den *N*-Acylmannosaminen wurden offensichtlich freie Gal- β 1,3-GalNAc-Reste durch Sialinsäuren besetzt, sodass es zu einem Abfall der PNA-Bindung kam. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der quantitativen Analyse, die auch bei dem HL60-II-Subklon nach *N*-Acylmannosamin-Behandlung eine tendenzielle Zunahme des Gesamtsialinsäuregehalts in den Membranglycoproteinen gezeigt hat, wenngleich diese nicht signifikant war.

Das Lektin Con A, das nicht an den typischen freien Bindungsstellen für Sialinsäuren bindet, wies bei den HL60-I-Zellen eine signifikant höhere Bindung nach *N*-Acylmannosamin-Behandlung gegenüber unbehandelten HL60-I-Zellen auf (Abb. 3.8 A). Zwischen den ManNAc- und ManNProp-behandelten HL60-I-Zellen konnte ebenfalls eine signifikant höhere MFI für die ManNProp-behandelten Zellen gemessen werden. Offenbar hatte sich durch die Behandlung mit den *N*-Acylmannosaminen die Anzahl von Con A-zugänglichen Mannose-haltigen Strukturen erhöht. Bei den HL60-II-Zellen fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen unbehandelten und *N*-Acylmannosamin-behandelten Zellen mit dem Lektin Con A (Abb. 3.8 B). Jedoch zeigte sich auch bei den HL60-II-Zellen nach ManNAc- oder ManNProp-Behandlung tendenziell eine höhere Con A-Bindung.

Im Vergleich der beiden HL60-Subklone miteinander fanden sich Unterschiede im Bindungsverhalten des Lektins Con A. Für die unbehandelten HL60-II-Zellen war eine signifikant höhere MFI (Faktor 1,5) als für die unbehandelten HL60-I-Zellen messbar. Dieser Unterschied blieb auch nach Behandlung der HL60-I-Zellen mit den *N*-Acylmannosaminen bestehen. Sowohl nach ManNAc- bzw. ManNProp-Behandlung wiesen die HL60-I-Zellen eine signifikant niedrige MFI in der Con A-Färbung gegenüber den entsprechend behandelten HL60-II-Zellen auf.

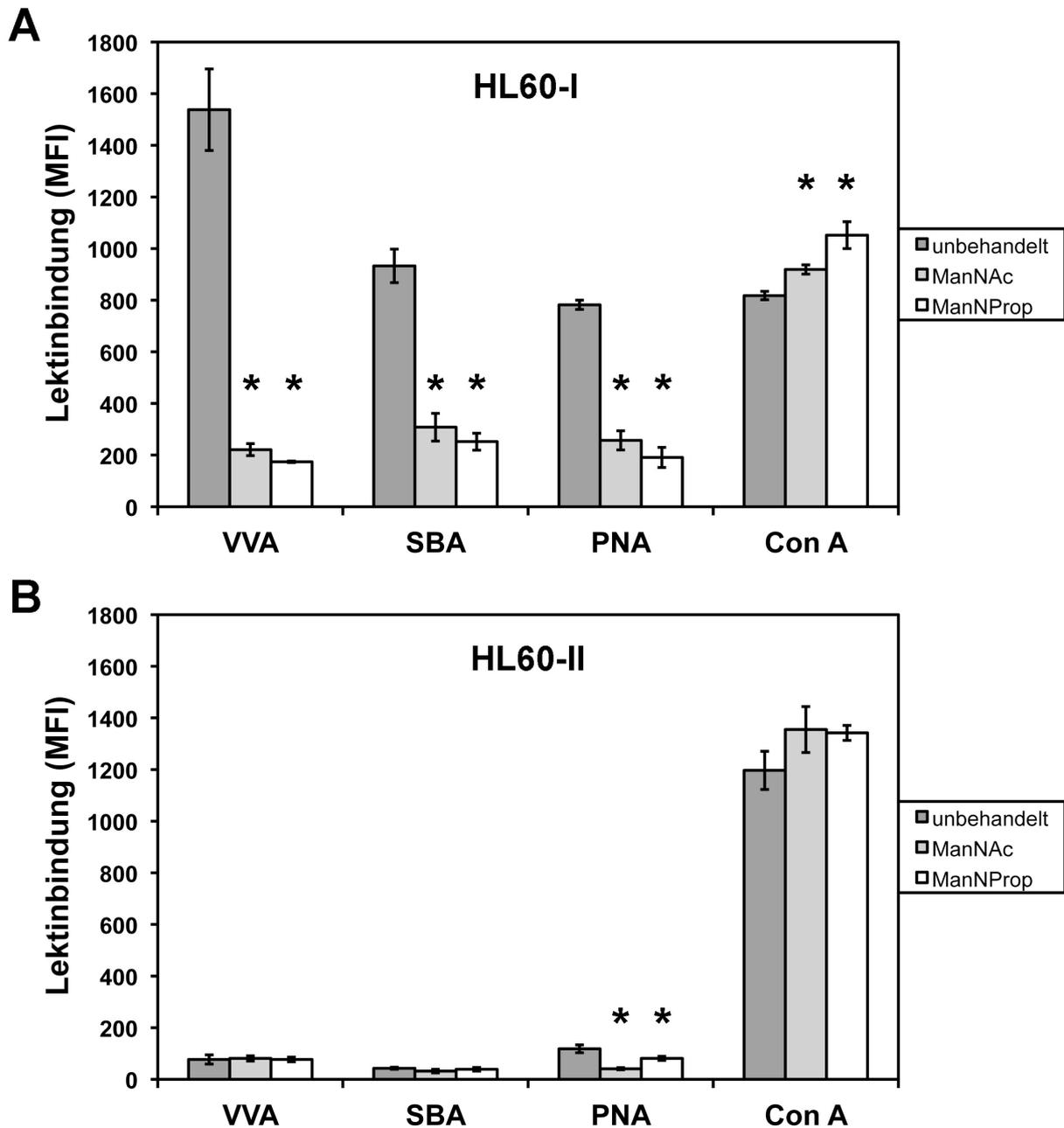


Abb. 3.8 Expression freier Sialinsäurebindungsstellen auf HL60-Zellen nachgewiesen durch Lektinbindung in der Durchflusszytometrie.

Nachweis freier Sialinsäurebindungsstellen sowie von Mannose-haltigen Strukturen in den Zelloberflächenglycokonjugaten von HL60-I- (A) und HL60-II-Zellen (B) mit und ohne Behandlung mit 10 mM ManNAc bzw. ManNProp über 72 h. Die Bestimmung freier Sialinsäurebindungsstellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie mit den FITC-konjugierten Lektinen VVA, SBA und PNA. Mannosestrukturen wurden in gleicher Weise durch das FITC-konjugierte Lektin Con A bestimmt. Die MFI-Werte sind Mittelwerte \pm SD aus $n = 3$. Die Sterne * markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen unbehandelten und *N*-Acylmannosamin-behandelten Zellen.

3.2.4 Änderung der Sialyl-Lewis X-Expression nach *N*-Acylmannosamin-Behandlung

Der Einfluss der ManNProp-Behandlung auf die Expression funktionell bedeutsamer, sialylierter Oligosaccharidstrukturen wurde am Beispiel der Sialyl-Lewis X-Struktur untersucht (Abb. 1.5). Bei den unbehandelten HL60-I-Subklonen waren in der Durchflusszytometrie mit Hilfe eines selektiven Antikörpers kaum Sialyl-Lewis X-Strukturen auf der Zelloberfläche nachweisbar. Nach Behandlung der HL60-I-Zellen mit *N*-Acylmannosaminen über 72 h konnte in der Durchflusszytometrie sowohl für ManNAc als auch für ManNProp ein deutlicher Anstieg des Tetrasaccharids gegenüber unbehandelten HL60-I-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.9). Zwischen den ManNAc- und den ManNProp-behandelten HL60-I-Zellen fand sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von Sialyl-Lewis X-Epitopen, wenngleich nach ManNProp-Behandlung die MFI 1,4-fach höher war als nach ManNAc-Behandlung. Auch nach Behandlung der HL60-I-Zellen mit *N*-Acylmannosaminen lag die Expression von Sialyl-Lewis X-Epitopen weiter unter jener der HL60-II-Zellen (Abb. 3.10). Bei den normal sialylierten unbehandelten HL60-II-Zellen fand sich eine mehr als 100-fach höhere Sialyl-Lewis X-

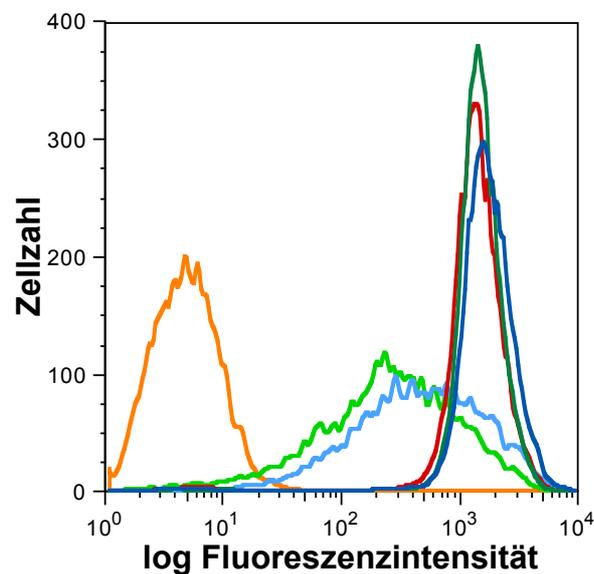


Abb. 3.9 Expression von Sialyl-Lewis X bei HL60-Zellen.

Veränderung der Anzahl von Sialyl-Lewis X-Strukturen auf den Zelloberflächen nach *N*-Acylmannosamin-Behandlung von HL60-I-Zellen (unbehandelt orange, ManNAc hellgrün, ManNProp hellblau) und HL60-II-Zellen (unbehandelt rot, ManNAc dunkelgrün, ManNProp dunkelblau) in der Durchflusszytometrie. Die HL60-Zellen waren zuvor mit 10 mM ManNAc bzw. ManNProp über 72 h behandelt.

Expression gegenüber den unbehandelten HL60-I-Zellen. Nach *N*-Acylmannosamin-Behandlung der HL60-II-Zellen waren keine signifikanten Unterschiede gegenüber unbehandelten HL60-II-Zellen in der Sialyl-Lewis X-Expression messbar (Abb. 3.10). Die MFI-Werte waren für die unbehandelten HL60-II-Zellen und die ManNAc-behandelten Zellen nahezu identisch, für die ManNProp-behandelten Zellen tendenziell, aber nicht signifikant, höher als für die unbehandelten bzw. ManNAc-behandelten HL60-II-Zellen.

Durch die Behandlung von Zellen des hyposialylierten HL60-I-Subklons wurde die Expression des Tetrasaccharids Sialyl-Lewis X sowohl durch ManNAc als auch durch ManNProp deutlich gesteigert. Es lässt sich daher ableiten, dass nach ManNProp-Behandlung auf der Zelloberfläche von HL60-I-Zellen eine nahezu homogene Population modifizierter Sialyl-Lewis X-Epitope exprimiert wurde.

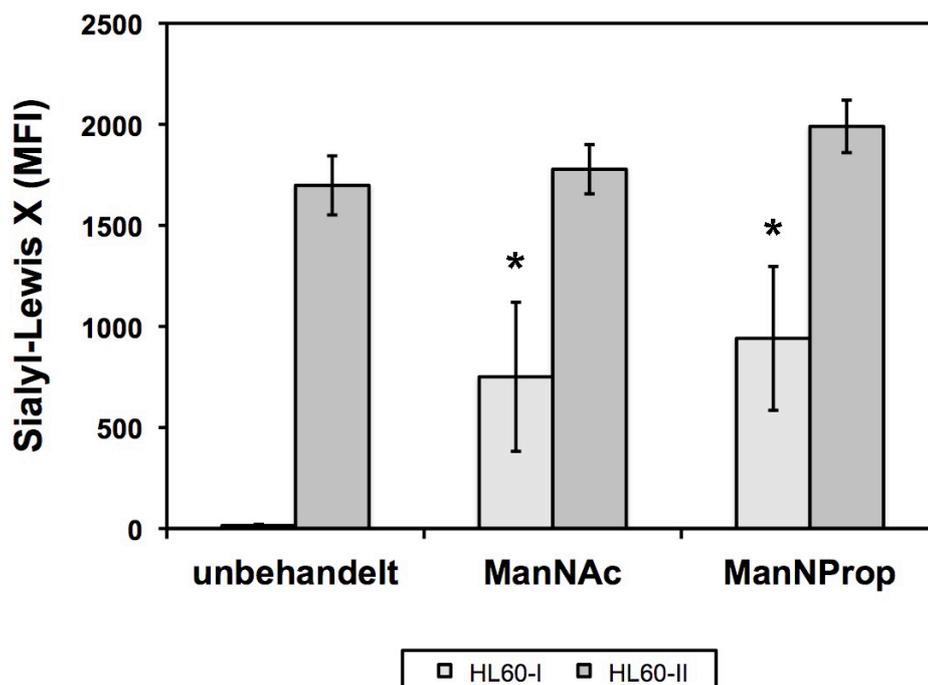


Abb. 3.10 Expression von Sialyl-Lewis X nach *N*-Acylmannosamin-Behandlung.

Dargestellt ist die Sialyl-Lewis X-Expression bei HL60-I- und HL60-II-Subklonen als Ausdruck der mittleren Fluoreszenzintensität in der Durchflusszytometrie nach Behandlung der Zellen mit 10 mM ManNAc bzw. ManNProp über 72 h und. Die MFI-Werte sind Mittelwerte \pm SD aus $n = 3$. Der Stern * markiert signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen unbehandelten und *N*-Acylmannosamin-behandelten Zellen.

3.3 Nachweis modifizierter CMP-Sialinsäuren

Die Voraussetzung für die Modifikation von membrangebundenen Sialinsäuren ist die Annahme, dass modifizierte Sialinsäurevorläufer in die Sialinsäurebiosynthese eingeschleust werden wie natürliches ManNAc und dass aus den modifizierten Sialinsäuren mit CTP ein Nukleotidzucker gebildet wird. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit war der Nachweis eines modifizierten Nukleotidzuckers in der Literatur nicht beschrieben worden. Unbekannt war insbesondere, in welchem Ausmaß modifizierte CMP-Sialinsäuren nach Behandlung mit *N*-Acylmannosamin-Analoga entstehen und inwieweit die Bildung modifizierter CMP-Nukleotidzucker von der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität beeinflusst wird.

3.3.1 Trennung von CMP-Sialinsäuren mittels HPAEC-PAD

Ein Nachweis von CMP-Sialinsäuren mit RP18-HPLC war aufgrund der erforderlichen Aufarbeitung der Zellextrakte nicht möglich. Daher erfolgte die Bestimmung des CMP-Sialinsäure-Gehalts mittels HPAE-PAD-Chromatographie.

Bei den unbehandelten HL60-I- und BJA-B K20-Zellen konnte nicht zweifelfrei ein CMP-Neu5Ac-Peak nachgewiesen werden (Abb. 3.11 A), sodass ihre CMP-Neu5Ac-Konzentration als kleiner $0,02 \text{ nmol}/10^7$ Zellen eingestuft wurde, welches auch die Detektionsgrenze dieses Verfahrens ist (Fritsch *et al.*, 1996). Nach Behandlung von BJA-B K20-Zellen mit ManNAc zeigte sich im Chromatogramm ein deutlicher Peak (Abb. 3.11 B), der eine identische Elutionszeit und ein identisches Elutionsprofil wie kommerziell erhältliche CMP-Neu5Ac bzw. CMP-Neu5Ac in BJA-B K88-Zellen (nicht dargestellt) aufwies. Die Behandlung der BJA-B K20-Zellen mit ManNProp führte ebenfalls zur Ausbildung eines deutlichen Peaks mit einer leicht kürzeren Elutionszeit um 0,4 min verglichen mit CMP-Neu5Ac (Abb. 3.11 C). Diese nur geringe Änderung der Elutionszeit passt zu dem kleinen strukturellen Unterschied zwischen CMP-Neu5Ac und CMP-Neu5Prop. Letzteres würde man zum überwiegenden Anteil in BJA-B K20-Zellen nach Behandlung mit ManNProp erwarten, da die endogene Bildung von ManNAc und somit Neu5Ac in diesen Zellen gestört ist. Da bei der Anionenaustauscherchromatographie die Trennung der Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladungen erfolgt, diese Eigenschaft bei der Verlängerung der *N*-Acylseitenkette der Neu5NAc zu Neu5Prop nicht verändert wird, ist folglich nur mit einer geringen Veränderung der Elutionszeit zu rechnen. Aufgrund des nur geringen Unterschieds in

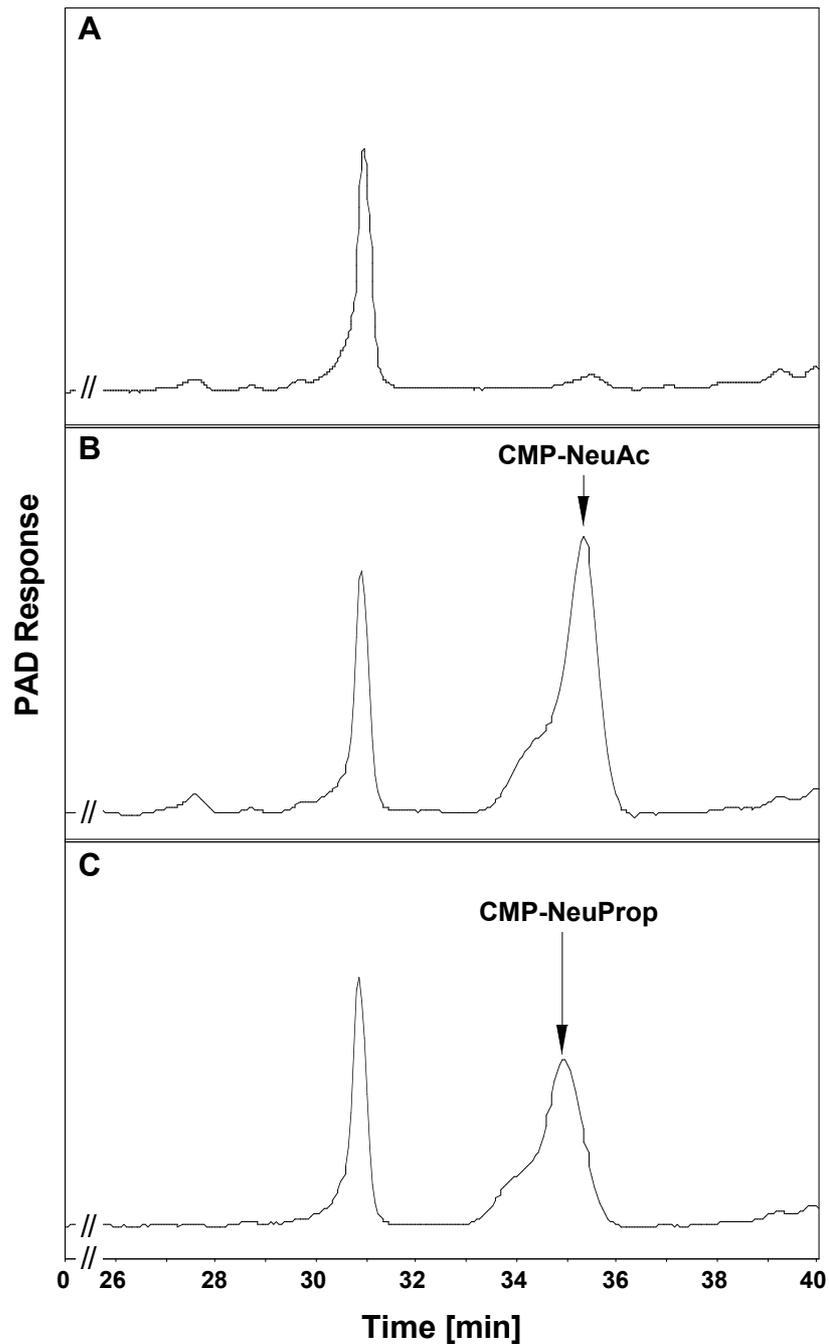


Abb. 3.11 Nachweis zellulärer CMP-Sialinsäuren nach Behandlung mit *N*-Acylmannosaminen. Nachweis des zellulären CMP-Sialinsäure-Pools mittels Anionenaustauscherchromatographie (HPAE-PAD-Chromatographie) von unbehandelten (A), ManNAc-behandelten (B) und ManNProp-behandelten (C) BJA-B K20-Zellen (jeweils 10 mM für 72 h). Während der Elution trat bei 31 min ein konstanter, aus der Probe stammender, aber nicht identifizierter Peak auf, der als interner Standard diente.

den Elutionszeiten von CMP-Neu5Ac und CMP-Neu5Prop kam es insbesondere bei den UDP-GlcNAc-2-Epimerase-kompetenten HL60-II- und BJA-B K88-Zellen nach ManNProp-Behandlung nicht zur Ausbildung von zwei separaten Peaks, sodass eine Bestimmung des relativen Anteils an modifizierten CMP-Sialinsäuren mittels HPAE-PAD-Chromatographie nicht möglich war. Mittels RP18-HPLC konnte aus den hydrolysierten CMP-Sialinsäuren Neu5Prop nachgewiesen werden (Chromatogramm nicht dargestellt), womit auch zweifelsfrei gezeigt werden konnte, dass es sich bei der CMP-Sialinsäure, die in der HPAE-PAD-Chromatographie 0,4 min vor dem CMP-Neu5Ac-Standard eluiert wurden, um CMP-Neu5Prop handelte.

3.3.2 Quantifizierung des CMP-Sialinsäure-Gehalts in HL60- und BJA-B-Subklonen

Bei den HL60- und BJA-B-Zellen konnte in fast allen untersuchten Subklonen ein Anstieg des CMP-Sialinsäure-Pools sowohl nach ManNAc- als auch nach ManNProp-Behandlung nachgewiesen werden. Besonders deutlich ist dieser Anstieg bei den UDP-GlcNAc-2-Epimerase-defizienten Subklonen HL60-I und BJA-B K20, deren endogener CMP-Sialinsäure-Gehalt unter $0,02 \text{ nmol}/10^7$ Zellen liegt (Tab. 3.3).

Bei den UDP-GlcNAc-2-Epimerase-kompetenten Subklonen HL60-II und BJA-B K88 fallen Unterschiede im Anstieg des CMP-Sialinsäure-Gehalts nach Behandlung mit ManNAc und ManNProp auf. Zwar kommt es bei den BJA-B K88-Zellen sowohl nach Behandlung mit beiden *N*-Acylmannosaminen zu einem Anstieg des CMP-Sialinsäure-Gehalts, jedoch ist dieser nach ManNAc-Behandlung mehr als doppelt so groß wie nach ManNProp-Behandlung. Interessanterweise kommt es bei den HL60-II-Zellen nur nach ManNAc-Behandlung zu einem signifikanten Anstieg des CMP-Sialinsäure-Pools. Nach ManNProp bleibt eine Erhöhung des CMP-Sialinsäure-Gehalts in diesem Subklon aus. Offensichtlich wird das modifizierte *N*-Acylmannosamin-Analogon ManNProp von den UDP-GlcNAc-2-Epimerase-kompetenten Subklonen HL60-II und BJA-B K88 anders behandelt als von den UDP-GlcNAc-2-Epimerase-defizienten Subklonen HL60-I und BJA-B K20, bei denen es unabhängig vom verwendeten *N*-Acylmannosamin zu einem identischen Anstieg des CMP-Sialinsäure-Pools kommt.

Tab. 3.4 CMP-Sialinsäure-Gehalt in HL60- und BJA-B-Subklonen vor und nach Behandlung mit *N*-Acylmannosaminen.

Die Zellen wurden inkubiert mit 10 mM ManNAc bzw. 10 mM ManNProp für 72 h. Der CMP-Sialinsäure-Gehalt wurde mittels HPAE-PAD-Chromatographie bestimmt. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Experimenten dar.

Zelltyp	CMP-Sialinsäure-Gehalt in [nmol/10 ⁷ Zellen]
HL60 I	< 0,02
HL60 I + ManNAc	0,24 \pm 0,04
HL60 I + ManNProp	0,26 \pm 0,06
HL60 II	0,28 \pm 0,06
HL60 II + ManNAc	1,04 \pm 0,12
HL60 II + ManNProp	0,26 \pm 0,08
BJA-B K20	< 0,02
BJA-B K20 + ManNAc	1,06 \pm 0,14
BJA-B K20 + ManNProp	0,78 \pm 0,16
BJA-B K88	0,34 \pm 0,08
BJA-B K88 + ManNAc	2,50 \pm 0,04
BJA-B K88 + ManNProp	1,12 \pm 0,06

3.3.3 Bestimmung des relativen Anteils modifizierter CMP-Sialinsäuren

Aufgrund des geringen Unterschieds der Elutionszeiten von CMP-Neu5Prop und CMP-Neu5Ac war die gesonderte Bestimmung der CMP-Neu5Prop-Menge im CMP-Sialinsäure-Pool mittels Anionenaustauscherchromatographie nicht möglich. Daher erfolgte mittels RP18-HPLC die Analyse der Sialinsäuren, die nach saurer Hydrolyse aus einem Aliquot der aus den Zellen isolierten CMP-Sialinsäuren gewonnen wurden. Für ManNProp-behandelte HL60-I-Zellen konnte ein Verhältnis von 80 % Neu5Prop zu 20 % Neu5Ac bei den hydrolytisch freigesetzten Sialinsäuren gemessen werden (Abb. 3.12). Diese Werte entsprachen dem Verhältnis von Neu5Prop zu Neu5Ac in den Membranglycoproteinen dieses Subklons nach ManNProp-Behandlung. Für die ManNProp-behandelten HL60-II-Zellen wurde ein CMP-Neu5Prop-Anteil von ca. 16 % bestimmt, was dem Neu5Prop-Anteil in den Membranglycoproteinen entsprach (Abb. 3.12.).

Bei den BJA-B-Zellen wurde für den UDP-GlcNAc-2-Epimerase-defizienten Subklon K20 ein Anteil um 90 % für CMP-Neu5Prop und für den UDP-GlcNAc-2-Epimerase-kompetenten Subklon K88 ein Anteil von 78 % gemessen, der in beiden Fällen von dem Verhältnis Neu5Prop zu Neu5Ac in den membrangebundenen Glycoproteinen abwich. Besonders deutlich war der

Unterschied bei dem BJA-B K88-Subklon, bei dem sich in den Membranglycoproteinen nur ein Neu5Prop-Anteil von 56 % nach Behandlung mit ManNProp fand.

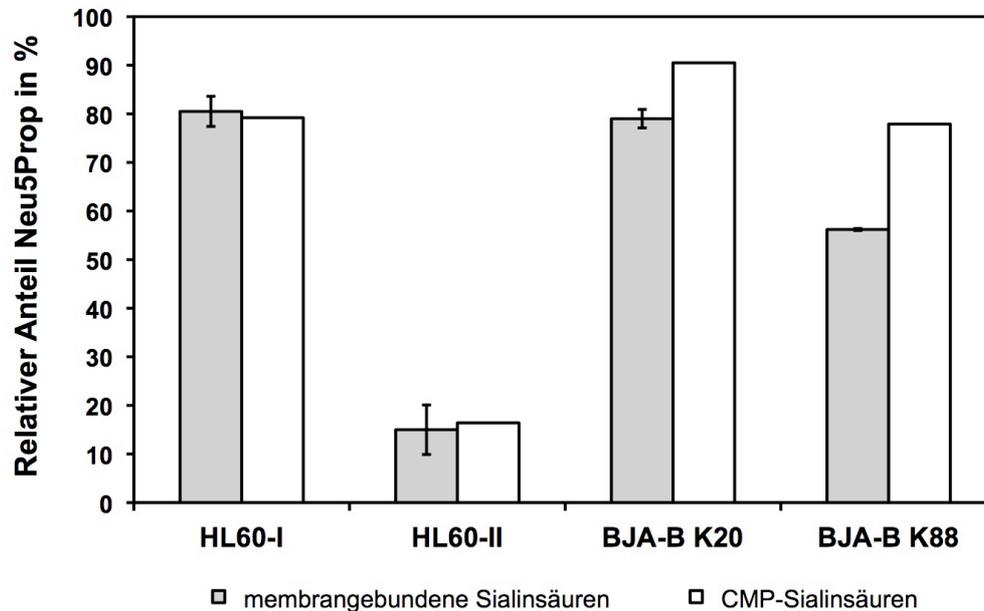


Abb. 3.12 Relativer Anteil von Neu5Prop im CMP-Sialinsäure-Pool und in Membranglycoproteinen.

Dargestellt ist der relative Anteil von *N*-Propanoyl-modifizierten CMP-Sialinsäuren am Gesamt-CMP-Sialinsäure-Pool (weiß) in HL60- und BJA-B-Subklonen nach ManNProp-Behandlung (10 mM für 72 h). Die Sialinsäuren wurden durch saure Hydrolyse mit 2 M Essigsäure vom CMP abgespalten, anschließend durch RP18-HPLC chromatographisch aufgetrennt und der relative Anteil von Neu5Prop bestimmt. Die Werte für CMP-Sialinsäuren sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Die relativen Neu5Prop-Anteile in den Membranglycoproteinen (grau) aus Tab. 3.3 sind zur besseren Vergleichbarkeit hier nochmals dargestellt.

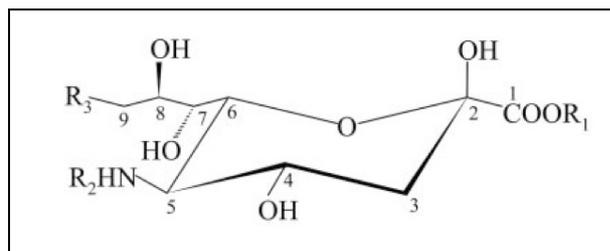
3.4 Aufnahme und Einbau freier Sialinsäureanaloga in Membranglycokongjugate

Im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation mit Frau Dr. Cornelia Oetke aus der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Pawlita vom Institut für Angewandte Tumorstudiologie des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg wurden Untersuchungen zur Aufnahme und zum Einbau von freien Sialinsäureanaloga in membrangebundene Glycokongjugate durchgeführt. Die verwendeten Sialinsäureanaloga wurden von Herrn Prof. Dr. Dr. Reinhard Brossmer vom Biochemie-Zentrum der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg synthetisiert. Im Rahmen dieser Dissertation erfolgte die chromatographische Charakterisierung der Sialinsäureanaloga, die Isolierung der Sialinsäuren aus den Membranglycoproteinen der behandelten Zellen sowie die Analyse der isolierten Sialinsäuren mittels RP18-HPLC.

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit war bereits gezeigt worden, dass sich durch freie Sialinsäuren im Zellkulturmedium der Sialylierungszustand der Zelloberflächen beeinflussen ließ (94, 136). Die Arbeitsgruppe von Dr. Pawlita konnte für einige Neu5Ac-Analoga Veränderungen des Sialylierungsgrades der behandelten Zellen mit Hilfe von verschiedenen Lektinen nachweisen (95). Eine Aussage über die Struktur der Sialinsäuren, die auf der Zelloberfläche präsentiert wurden, konnte durch die Lektine und andere Bindungsassays jedoch nicht gemacht werden. Es blieb somit unklar, ob die Neu5Ac-Analoga in ihrer modifizierten Form aufgenommen und unverändert in die Membranglycokongjugate eingebaut wurden, oder ob es im Medium oder intrazellulär zu einer Degradation der Analoga zu Sialinsäurevorläufern bzw. zur Abspaltung der biochemischen Modifikationen und somit zum Einbau von Neu5Ac und seinen natürlichen Derivaten gekommen war.

3.4.1 Chromatographische Analyse von Sialinsäureanaloga

Um sicherzustellen, ob die verwendeten Neu5Ac-Analoga mit ihren spezifischen Modifikationen überhaupt mittels RP18-HPLC nachweisbar waren, wurden die Sialinsäureanaloga als Reinsubstanz zunächst einzeln chromatographisch analysiert. Hierbei konnte nicht für alle Analoga ein eindeutiges Signal während der Elution detektiert werden (Tab. 3.5). Bei einem Teil der Sialinsäureanaloga kam es offenbar zum Verlust der modifizierten Substituenten. Beispielsweise wies Neu5Ac-Et-Ester die gleiche Retentionszeit wie Neu5Ac auf, sodass vom Verlust der Ethylgruppe im Rahmen der Derivatisierung mit DMB ausgegangen werden musste. Bei einem anderen Teil der Analoga, z.B. bei 5-N-Gly-Neu, konnte unter den verwendeten Elutionsgradienten überhaupt kein Signal detektiert werden. Somit war der sichere Nachweis

**Abb. 3.13** Position der Substituenten.

Sialinsäureanaloge basieren auf Neu5Ac. C-1 (R_1), C-5 (R_2) oder C-9 (R_3) waren mit den in Tab. 3.5 dargestellten Substituenten versehen. Abbildung aus Oetke *et al.* (95).

Tab. 3.5 Struktur und Nachweisverfahren der Neu5Ac-Analoga.

Die verwendeten Sialinsäureanaloge waren entweder an C-1 (R_1), C-5 (R_2) oder C-9 (R_3) substituiert. Der Sialylierungszustand von HL60-I-Zellen nach Inkubation mit den Neu5Ac-Analoga (5 mM für 24 h) wurde durch die Bindung fluoreszenzmarkierter Lektine in der Durchflusszytometrie bestimmt. Es wurden die beiden Sialinsäure-bindenden Lektine LFA bzw. TML sowie das GalNAc-erkennende Lektin VVA verwendet. Das Lektinbindungsverhalten war verändert (+), nicht verändert (–) oder nicht eindeutig bestimmbar (+/–). Mittels RP18-HPLC ließ sich die Reinsubstanz eindeutig (+) bzw. nicht eindeutig (–) nachweisen. Das mit \emptyset gekennzeichnete Analogon wurde nicht getestet. Tabelle modifiziert nach Oetke *et al.* (95).

Sialinsäureanalogon	Substituenten			Effekte auf Lektinbindung			HPLC
	R_1	R_2	R_3	VVA	LFA	TML	
Neu5Ac	H-	CH ₃ CO-	HO-	+	+	+	+
9-Desoxy-Neu5Ac	H-	CH ₃ CO-	H-	+	+	+	+
9-Desoxy-9-Amino-Neu5Ac	H-	CH ₃ CO-	H ₂ N-	+/-	-	-	-
9-Desoxy-9-Acetamido-Neu5Ac	H-	CH ₃ CO-	CH ₃ CO-NH-	+/-	-	+/-	+
9-Desoxy-9-N-Gly-Neu5Ac	H-	CH ₃ CO-	H ₂ NCH ₂ CO-NH-	+/-	-	-	-
9-Desoxy-9-N-Succ-Neu5Ac	H-	CH ₃ CO-	HOOC(CH ₂) ₂ CO-NH-	+/-	-	-	+
9-Desoxy-9-Iodo-Neu5Ac	H-	CH ₃ CO-	I-	+	+	+	+
9-Desoxy-9-Thio-Neu5Ac	H-	CH ₃ CO-	HS-	+	+	+	+
9-Desoxy-9-SCH ₃ -Neu5Ac	H-	CH ₃ CO-	CH ₃ S-	+	+	+	-
9-Desoxy-9-SO ₂ CH ₃ -Neu5Ac	H-	CH ₃ CO-	CH ₃ SO ₂ -	+	+	+	-
5-N-Fluoroac-Neu	H-	FCH ₂ CO-	HO-	+	+	+	+
5-N-Trifluoroac-Neu	H-	CF ₃ CO-	HO-	+	+/-	+/-	+
5-N-Gly-Neu	H-	H ₂ NCH ₂ CO-	HO-	+/-	-	-	-
5-N-Succ-Neu	H-	HOOC(CH ₂) ₂ CO-	HO-	+/-	-	-	+
5-N-Thioac-Neu	H-	CH ₃ CS-	HO-	+	+/-	+	+
Neu5Ac-Me-Ester	H ₃ C-	CH ₃ CO-	HO-	+	+	+	\emptyset
Neu5Ac-Et-Ester	H ₅ C ₂ -	CH ₃ CO-	HO-	+	+	+	-

eines Einbaus in die Membranglycokonjugate der Zellen nur für eine bestimmte Auswahl von Sialinsäureanaloga mittels RP18-HPLC möglich.

3.4.2 Nachweis von Sialinsäureanaloga in Membranglycoproteinen

Aufgrund der Annahme, dass UDP-GlcNAc-2-Epimerase-defiziente Zellen einen Großteil der in ihren Membranglycokonjugaten vorhandenen Sialinsäuren über einen „salvage pathway“ aus dem Kulturmedium gewinnen, wurden BJA-B K20-Zellen zunächst für sieben Tage in serumfreiem Kulturmedium gehalten und dann für 48 h mit einem Sialinsäureanalogon (5 mM) inkubiert. Die Aufarbeitung der behandelten BJA-B K20-Zellen zur Analyse der membrangebundenen Sialinsäuren mittels RP18-HPLC erfolgte entsprechend der Aufarbeitung der *N*-Acylmannosamin-behandelten Zellen.

Die Sialinsäureanaloga 5-Fluorac-Neu, 5-Trifluorac-Neu, 9-Desoxy-Neu5Ac und 9-Desoxy-9-Iod-Neu5Ac konnten nach entsprechender Vorbehandlung der Zellen eindeutig in der Fraktion der Membranglycoproteine nachgewiesen werden. Die Elution der Sialinsäureanaloga erfolgte jeweils in einem gut abgrenzbaren Peak. Die RRK der aus den Zellen isolierten modifizierten Sialinsäuren waren mit den RRK ihrer Standards identisch (Tab. 3.6), sodass die entsprechenden Sialinsäureanaloga zweifelfrei in der Probe nachgewiesen werden konnten.

Um auszuschließen, dass sich nach der Aufarbeitung der behandelten Zellen noch Rückstände von freien Sialinsäureanaloga in der Probe befänden und diese dann fälschlicherweise mittels RP18-HPLC nachgewiesen würden, wurde zu den vorbehandelten Zellen kurz vor der Herstellung des Pellets ein zweites Neu5Ac-Analogon in äquimolarer Konzentration in das

Tab. 3.6 Relative Retentionskoeffizienten (RRK) der Neu5Ac-Analoga im Standard und in den Membranglycokonjugaten behandelter BJA-B K20-Zellen.

Neu5Ac-Analogon	Relativer Retentionskoeffizient (RRK) des Standards	Relativer Retentionskoeffizient (RRK) in Probe
Neu5Ac	1,200 ± 0,002	1,198 ± 0,003
5- <i>N</i> -Fluoroac-Neu	1,269 ± 0,002	1,269 ± 0,002
5- <i>N</i> -Trifluoroac-Neu	2,110 ± 0,003	2,113 ± 0,006
9-Desoxy-Neu5Ac	1,305 ± 0,005	1,305 ± 0,002
9-Desoxy-9-Iodo-Neu5Ac	1,842 ± 0,004	1,842 ± 0,005

Medium als interne Kontrolle gemischt. Dies geschah in der Annahme, dass ein Zeitraum von wenigen Sekunden zu kurz sei, um die zelluläre Aufnahme und den Einbau in die Membranglycoproteine des zweiten Sialinsäureanalogons zu gewährleisten, jedoch für die Erzeugung von Rückständen freier Neu5Ac-Analoga ausreichen würde.

Exemplarisch wurde dies mit 9-Desoxy-9-Iod-Neu5Ac und 5-*N*-Fluorac-Neu behandelten BJA-B K20-Zellen durchgeführt. Unmittelbar vor der Herstellung der Zellpellets wurden die mit 5-*N*-Fluorac-Neu behandelten BJA-B K20-Zellen mit 9-Desoxy-9-Iod-Neu5Ac und die 9-Desoxy-9-Iod-Neu5Ac behandelten Zellen mit 5-*N*-Fluorac-Neu versetzt. In der anschließend durchgeführten HPLC-Analyse konnte nur das Neu5Ac-Analogon nachgewiesen werden, das sich über 48 h im Kulturmedium befand (Abb. 3.14). Die kurz vor Herstellung der Zellpellets zugesetzte modifizierte Sialinsäure war nicht detektierbar. Eine Verunreinigung durch freie Sialinsäureanaloga konnte somit ausgeschlossen werden.

Die Bestimmung der relativen Anteile der modifizierten Sialinsäuren an den membrangebundenen Sialinsäuren erbrachte für das Analogon 5-*N*-Fluorac-Neu einen Wert von 95 %, für 9-Desoxy-9-Iod-Neu5Ac von 92 %, für 9-Desoxy-Neu5Ac von 90 % und für 5-*N*-Trifluorac-Neu von 64 % gegenüber Neu5Ac.

Diese Daten belegen, dass an C-5- und C-9-modifizierte Sialinsäureanaloga in endogen hyposialylierten Zellen in erheblichem Umfang aufgenommen und unverändert in Membranglycokonjugate eingebaut werden können.

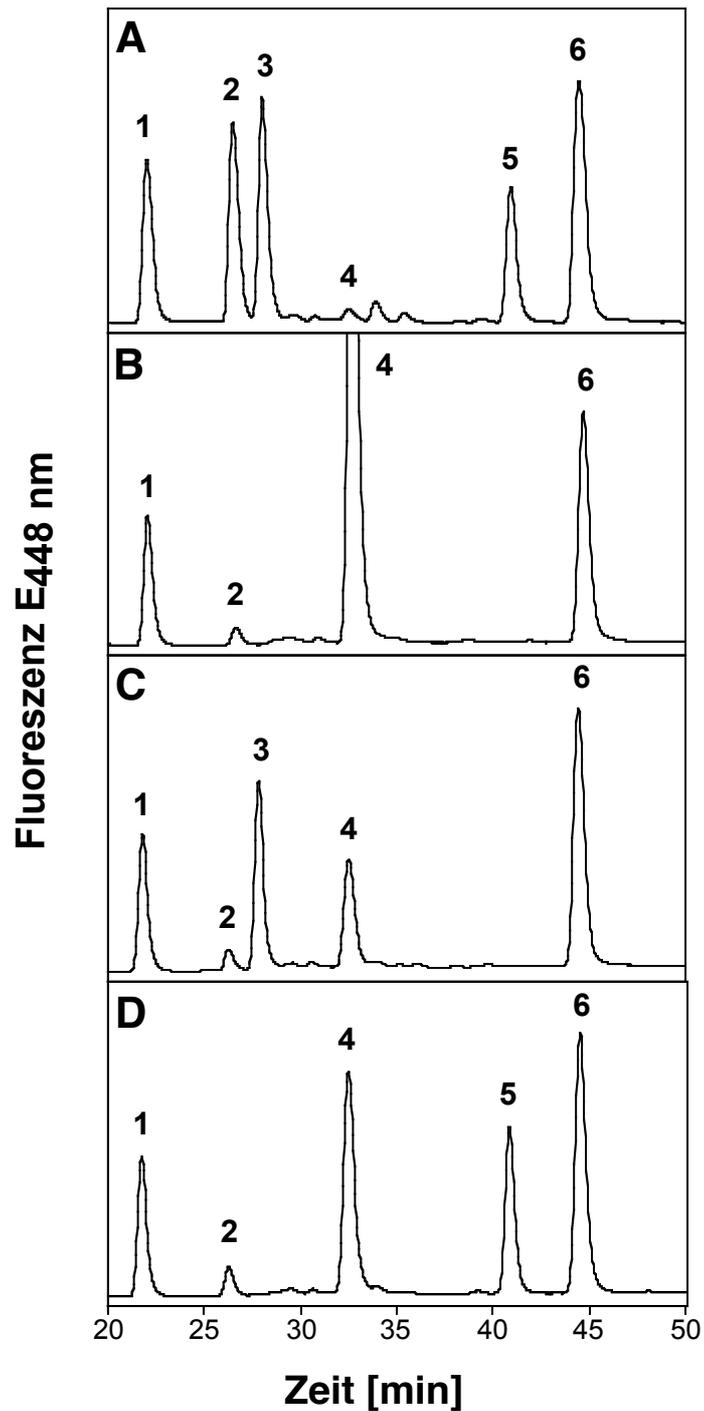


Abb. 3.14 Chromatographische Trennung von DMB-markierten Sialinsäuren aus Membranglycoproteinen von BJA-B K20-Zellen nach Kultivierung mit Sialinsäureanaloga.

(A) Standard; (B) unbehandelte BJA-B K20-Zellen; (C) BJA-B K20-Zellen mit 5 mM 5-*N*-Fluorac-Neu für 48 h kultiviert; (D) BJA-B K20-Zellen mit 5 mM 9-Desoxy-9-Iod-Neu5Ac für 48 h kultiviert. Unmittelbar vor Erstellung der Zellpellets wurde ein zweites Sialinsäureanalogon hinzugefügt, welches mittels RP18-HPLC jedoch nicht nachweisbar war. 1 = Neu5Gc (interner Standard); 2 = Neu5Ac; 3 = 5-*N*-Fluorac-Neu; 4 = freies DMB; 5 = 9-Desoxy-9-Iod-Neu5Ac; 6 = Na-Pyruvat (interner Standard).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zellsystem etabliert und optimiert, auf dessen Zelloberfläche sich nach Behandlung mit dem Sialinsäurevorläufer ManNProp ein hoher Anteil modifizierter Sialinsäuren exprimieren lässt. Die verwendeten hämatopoetischen Zellen weisen eine Störung in der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Expression auf, die zu einer endogenen Hyposialylierung der Zelloberflächen führt. Das Zellsystem wurde in Bezug auf den Anteil modifizierter membrangebundener Sialinsäuren und ihrer Verteilung auf der Zelloberfläche charakterisiert. Zudem wurde der Einfluss einer *N*-Acylmannosamin-Behandlung auf den CMP-Sialinsäure-Pool der Zellen sowie auf die Oberflächenexpression von Sialyl-Lewis X-Strukturen untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem die effiziente Aufnahme und der Einbau verschiedener Sialinsäureanaloga in membrangebundene Glycoproteine gezeigt werden.

Um den Anteil modifizierter Sialinsäuren in den Zelloberflächenglycokonjugaten zu maximieren, wurden systematisch die optimale Inkubationsdauer mit ManNProp und die optimale Konzentration des ManNAc-Analogons im Zellkulturmedium untersucht. Hierbei zeigte sich, dass sowohl bei den UDP-GlcNAc-2-Epimerase-defizienten als auch bei UDP-GlcNAc-2-Epimerase-kompetenten Subklonen der HL60- und BJA-B-Zelllinien nach einer Inkubationszeit von 72 h kein relevanter Anstieg von Neu5Prop in den Membranglycoproteinen mittels HPLC-Analytik messbar war. Die Untersuchung der zeitabhängigen Modulation der Oberflächensialylierung mit dem fluoreszenzmarkierten Lektin LFA in der Durchflusszytometrie zeigte bei HL60-I-Zellen ein entsprechendes Ergebnis. Als optimale Konzentration von ManNProp im Zellkulturmedium für die Maximierung des Neu5Prop-Inkorporation in membrangebundene Glycokonjugate von HL60-Zellen konnte eine Konzentration von 10 mM bestimmt werden. Für eine Reihe von Zelllinien sind in der Literatur vergleichbare Inkubationszeiten von 24-96 h und ManNAc-Analoga-Konzentrationen von 3-20 mM beschrieben worden (96, 98, 102, 108-113, 126, 137). Es finden sich zwar nur in wenigen Arbeiten Angaben zu systematischen Untersuchungen der optimalen Inkubationszeit und Konzentration für den Zelltyp und das verwendete ManNAc-Analogon (96, 108), es darf aber davon ausgegangen werden, dass in den übrigen Arbeiten entsprechende Vorversuche durchgeführt worden sind, da bekanntermaßen deutliche Unterschiede bei der Inkorporation von ManNAc-Analoga zwischen verschiedenen Zelllinien bestehen (102, 108). Die in allen Arbeiten

gewählte Inkubationszeit von maximal vier Tagen für eine optimale Analoga-Inkorporation in die Glycane ist höchstwahrscheinlich auf die Dauer der Neusynthese von Glycoproteinen sowie auf den raschen intramolekularen Turnover von Oligosacchariden zurückzuführen (108, 138). Die Glycoproteine werden dabei in maximal 90 Stunden entweder neu synthetisiert oder partiell abgebaut und reglycosyliert. Innerhalb dieses Zeitraums kann dann die Inkorporation von ManNAc-Analoga erfolgen, während anschließend nur noch ein dynamisches Gleichgewicht von Degradation und Resynthese vorliegt (108, 138). Der Einsatz millimolarer Konzentrationen der Analoga war notwendig, da es für ManNAc sowie seine Analoga keine Membrantransporter gibt und ihre Aufnahme vermutlich über passive Diffusion bzw. vor allem über Pinozytose erfolgt (96). In den letzten Jahren ist man zunehmend dazu übergegangen Mannosaminanaloga zu verwenden, deren Hydroxylgruppen mit kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) verestert sind, wodurch die Analoga besser durch die Plasmamembran diffundieren und sich die metabolische Effizienz um ein Vielfaches erhöhen lässt (84, 104). Dadurch werden deutlich niedrigere, mikromolare Konzentrationen der SCFA-Hexosaminanaloga im Zellkulturmedium benötigt, weshalb die heutigen Angaben über die verwendeten ManNAc-Analoga-Konzentrationen im Zellkulturmedium nur bedingt mit den früheren Untersuchungen vergleichbar sind.

Die relativen Anteile modifizierter Sialinsäuren in den Membranglycoproteinen nach Behandlung mit dem Sialinsäurevorläufer ManNProp unterschieden sich zwischen den UDP-GlcNAc-2-Epimerase-defizienten und den UDP-GlcNAc-2-Epimerase-kompetenten Subklonen der beiden Zelllinien HL60 und BJA-B deutlich. Für die HL60-I- und BJA-B K20-Subklone konnten jeweils Neu5Prop-Anteile um 80 % gemessen werden. Für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-kompetenten Subklone HL60-II und BJA-B K88 fanden sich deutlich geringere Neu5Prop-Anteile. Dabei ist der Unterschied zwischen den HL60-II- und BJA-B K88-Zellen, für die Neu5Prop-Anteile von 15 % bzw. 56 % gemessen wurden, bemerkenswert. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen in der Literatur beschriebenen, so finden sich für eine Reihe von UDP-GlcNAc-2-Epimerase-kompetenter Zelllinien vergleichbare Werte von modifizierten Sialinsäuren in den Membranglycokonjugaten. Keppler *et al.* (109) beschrieben einen Anteil modifizierter Sialinsäuren von 33-45 % in BJA-B-Zellen nach Inkubation mit 5 mM ManNProp für 48 h. Diese Werte entsprechen etwa den hier gemessenen Anteilen nach einer Inkubation der BJA-B-Zellen über 48 h mit 10 mM ManNProp. Für die gleichen Zellen haben die Autoren Werte von 40-55 % nach Inkubation mit 5 mM ManNBut bzw. ManNPent für 48 h angegeben. Bardor *et al.* konnten für humane epitheliale Coca-2-Zellen nach Behandlung mit 3 mM ManNGc über 72 h einen Anteil von knapp 60 % in der kombinierten Fraktion von löslichen und membrangebundenen Proteinen messen (96). In der neueren Literatur wurden für den BJA-

B K88-Subklon ein Anteil von 34 % sowie für den K20-Subklon ein Anteil von 50 % modifizierter Sialinsäuren nach 48-stündiger Inkubationszeit mit dem peracetylierten Diazirin-modifizierten ManNAc-Analogon (Ac₄ManNDaz) angegeben (139). Für BJA-B K20-Zellen wurden von der gleichen Arbeitsgruppe ein Anteil von 100 % modifizierten Sialinsäuren in Membranglycokonjugaten beschrieben, wenn die Zellen zuvor unter serumfreien Bedingungen kultiviert worden waren (139). Vergleichbar hohe Einbauraten konnten im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls für serumfrei-kultivierte BJA-B K20-Subklone erzielt werden, die über 48 h mit Sialinsäureanaloga behandelt wurden. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Sialidase-Behandlung ManNProp-behandelter HL60-Zellen und die erneute Inkubation mit ManNProp führte zu keiner signifikanten Erhöhung des Neu5Prop-Anteils in den Membranglycoproteinen von HL60-I-Zellen. Für die HL60-II-Zellen ergab sich zwar in dieser Versuchsreihe ein signifikanter Anstieg des Neu5Prop-Anteils von 8,8 auf 12,7 %, jedoch lag dieser Wert in dem Bereich membrangebundener Neu5Prop von $15,0 \pm 5,1$ %, wie er für HL60-II-Zellen insgesamt bestimmt werden konnte.

Die vorbeschriebene hohe Akzeptanz des ManNAc-Analogons ManNProp durch die Enzyme der CMP-Sialinsäurebiosynthese konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (90, 102, 109). Gleichzeitig konnten eine Reihe von Befunden erhoben werden, die zeigen, dass ManNProp nicht in identischer Weise vom Biosyntheseapparat der Sialoglycane umgesetzt wird wie ManNAc. Mehrere Autoren haben bereits Einschränkungen bei der Umsetzung von ManNAc-Analoga beschrieben (97, 98, 108). Hervorzuheben ist die Arbeit von Jacobs *et al.* (98), in der differenzierte Untersuchungen zur Metabolisierung von *N*-Acylmannosaminen mit unterschiedlich langen bzw. komplexen *N*-Acylseitenketten durchgeführt wurden. Insgesamt wurde ein inverses Verhältnis von *N*-Acylseitenkettenlänge und Metabolisierung der ManNAc-Analoga durch den Biosyntheseapparat der *N*-Acetylneuraminsäure festgestellt. Als Bottleneck für die Umsetzung modifizierter Sialinsäurevorläufer konnte die Phosphorylierung durch die ManNAc-Kinase bestimmt werden. Die GlcNAc-Kinase ist jedoch in der Lage, neben GlcNAc auch ManNAc zu phosphorylieren (140). Es wird daher angenommen, dass ManNAc-Analoga wie ManNBut oder ManNPent, die von der ManNAc-Kinase nicht umgesetzt werden, durch die GlcNAc-Kinase phosphoryliert werden (98). Bei den hier verwendeten HL60-I- und BJA-B K20-Subklonen wird keine UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mRNA des bifunktionellen Enzyms gebildet, sodass die Zellen konsequenterweise neben einem UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Mangel auch einen ManNAc-Kinase-Mangel aufweisen. Die ManNAc-Kinase-Aktivität wird in diesen Zellen von der GlcNAc-Kinase übernommen (140).

Berücksichtigt man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie vorheriger Untersuchungen, so ist die Effizienz der Inkorporation von ManNAc-Analoga von mehreren Faktoren abhängig. Einerseits ist die Struktur des modifizierten *N*-Acylmannosamins für die Umsetzung des selbigen von essentieller Bedeutung wie durch Jacobs *et al.* (98) nachgewiesen wurde. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass andererseits für die effiziente Inkorporation von *N*-Acylmannosaminanaloga auch die endogene Synthese von ManNAc ausschlaggebend ist, da ManNAc von den Enzymen des Sialylierungsapparates kompetitiv und aufgrund seiner natürlichen Struktur bevorzugt gegenüber den ManNAc-Analoga umgesetzt wird. Der geringere bzw. für HL60-II-Zellen fehlende Anstieg des CMP-Sialinsäure-Gehalts nach ManNProp-Behandlung im Vergleich zur ManNAc-Behandlung bei den UDP-GlcNAc-2-Epimerase-kompetenten Subklonen ist ein Hinweis dafür, dass der modifizierte Sialinsäurevorläufer ManNProp oder seine Metaboliten in Anwesenheit hoher ManNAc-Konzentrationen von den Enzymen bzw. Transportern des Biosyntheseapparates der CMP-Sialinsäuren weniger effizient umgesetzt wurden. Im Vergleich dazu kam es bei den UDP-GlcNAc-2-Epimerase-defizienten Subklonen zu einem identischen Anstieg des CMP-Sialinsäure-Gehalts nach ManNAc- bzw. ManNProp-Behandlung. Hierzu passen auch die Befunde von Galuska *et al.* (141), die bei PC12-Zellen nach Behandlung mit ManNProp einen geringeren Anstieg freier Neu5Prop bzw. CMP-Neu5Prop im Vergleich zu freier Neu5Ac und CMP-Neu5Ac nach ManNAc-Behandlung zeigten. Dass die intrazelluläre Konzentration des natürlichen ManNAc wesentlichen Einfluss auf die Inkorporation modifizierter *N*-Acylmannosamine hat, wird durch das inverse Verhältnis zwischen der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität und der Umsetzung von ManNProp zu membrangebundener Neu5Prop verdeutlicht. Den größten Anteil inkorporierter Neu5Prop von 80 % fand sich hier in den UDP-GlcNAc-2-Epimerase-defizienten Subklonen, während sich in den BJA-B K88-Zellen mit einer mittleren Enzymaktivität von $18 \pm 2 \mu\text{U}/\text{mg}$ Protein (24) ein relativer Neu5Prop-Anteil von 56 % und in den HL60-II-Zellen mit einer hohen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität von $50 \pm 11 \mu\text{U}/\text{mg}$ Protein (24) nur ein relativer Anteil von 15 % Neu5Prop in den Membranglycoproteinen fand. Dies wird durch Ergebnisse von Yarema *et al.* (142) unterstrichen, die zeigten, dass in Jurkat-Zellen mit einer hyperaktiven UDP-GlcNAc-2-Epimerase vom Sialurie-Typ fast keine Inkorporation modifizierter Sialinsäuren nach Behandlung mit *N*-Acylmannosaminanaloga aufgrund der hohen Konzentration an konkurrierendem ManNAc erfolgte. Der endogenen ManNAc-Synthese lässt sich durch das Ausschalten der UDP-GlcNAc-2-Epimerase, beispielsweise durch Knock-Out oder Knock-Down (52, 143), entgegenwirken, wodurch die Inkorporation modifizierter Sialinsäuren gesteigert werden kann. In dieser Arbeit wurden entsprechend selektierte Subklone der

hämatopoetischen Zelllinien BJA-B und HL60 eingesetzt, die aufgrund eines epigenetischen Regulationsmechanismus keine UDP-GlcNAc-2-Epimerase bilden (26). Alternativ konnte durch RNA-Interferenz (RNAi) eine UDP-GlcNAc-2-Epimerase-defiziente HEK293-Zelllinie generiert werden, die ähnlich effiziente Einbausraten von ManNAc-Analoga aufwies (143).

Ein weiterer Faktor, der neben der endogenen *de novo*-Synthese von ManNAc das Ausmaß der Analoga-Inkorporation bestimmt, ist die Aufnahme von Sialinsäuren oder sialylierten Glycoproteinen aus dem Zellkulturmedium. Sialinsäuren können über den endosomalen/lysosomalen Weg in das Cytosol gelangen und dort für die Synthese von CMP-Sialinsäuren genutzt werden (96). Die Kultivierung der Zellen in serumfreiem Medium, welches heute für sehr viele Zelllinien zur Verfügung steht (144), stellt somit eine einfache Möglichkeit der Optimierung des Analoga-Einbaus dar (95).

Das Ausmaß der Inkorporation der ManNAc-Analoga wird neben der Struktur ihrer Modifikation und der Verfügbarkeit des natürlichen Sialinsäurevorläufers ManNAc offenbar noch durch einen anderen Faktor entschieden. Wie beschrieben besteht in direkter Konkurrenz zwischen ManNAc und ManNProp offenbar bis zur Bildung der CMP-Sialinsäuren eine Präferenz zugunsten des natürlichen Sialinsäurevorläufers. Das Bindungsmuster der Lektine VVA, SBA und PNA der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-defizienten HL60-I-Zellen zeigte einen tendenziell stärkeren, wenngleich nicht signifikanten, Abfall freier Sialinsäurebindungsstellen auf den Zelloberflächen nach ManNProp-Behandlung. Dies könnte als größerer Umsatz von CMP-Neu5Prop durch bestimmte Sialyltransferasen im Vergleich zu CMP-Neu5Ac gedeutet werden. Interessanterweise finden sich bei den BJA-B-Subklonen gegenteilige Hinweise. Der relative Anteil von CMP-Neu5Prop liegt bei beiden BJA-B-Subklonen über dem Anteil an membrangebundener Neu5Prop. Dies spricht eher dafür, dass CMP-Neu5Prop von den Sialyltransferasen in diesen Zellen weniger gut umgesetzt wird. Der in dieser Arbeit tendenziell größere Anstieg von Sialyl-Lewis X-Epitopen bei den HL60-Subklonen nach ManNProp-Behandlung könnte wiederum so interpretiert werden, dass manche Sialyltransferasen eine größere Affinität zu CMP-Neu5Prop besitzen. Horstkorte *et al.* (145) konnten später für die beiden hier verwendeten HL60-Subklone nach ManNProp-Behandlung einen signifikant größeren Anstieg von Sialyl-Lewis X-Epitopen gegenüber einer ManNAc-Behandlung nachweisen. Die Autoren vermuteten ebenfalls unterschiedliche Affinitäten der Sialyltransferasen zu den beiden CMP-Sialinsäuren als Ursache. Untersuchungen über den Einfluss unnatürlicher *N*-Acylmannosamine auf die Polysialylierung von NCAM zeigten

deutliche Unterschiede zwischen den beiden Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV (146). Während ST8SiaIV-transfizierte Zellen in der Lage waren, modifizierte Polysialinsäuren zu bilden, kam es bei den ST8SiaII-transfizierten zu einer massiven Reduktion bzw. zum Verlust der Polysialinsäuresynthese in Abhängigkeit vom verwendeten ManNAc-Analogen. Diese Befunde unterstützen die These, dass die Entscheidung über die Bildung modifizierter Sialoglykokonjugate auch auf der Ebene der Sialyltransferasen getroffen wird. Ob bestimmte Sialyltransferasen, die in den HL60-Zellen exprimiert werden, eine höhere Affinität zu CMP-Neu5Prop gegenüber CMP-Neu5Ac aufweisen, müsste in einem vergleichbaren Experiment wie für die Polysialyltransferasen untersucht werden (146).

Natürlich stellt sich die Frage, warum ein unnatürliches Substrat gegenüber einem natürlichen bevorzugt werden sollte. Als Erklärung für die hohe Permissivität des Sialinsäurestoffwechsels gegenüber den ManNAc-Analoga wird die Existenz der Neu5Gc vermutet (84). Auch wenn diese von Menschen nicht mehr *de novo* synthetisiert werden kann (16), so wird diese Sialinsäure ebenso wie das bei ihrem Abbau entstandene ManNGc vom menschlichen Sialinsäurebiosyntheseapparat umgesetzt (46, 96). Der Umstand, dass die Modifikation der Neu5Gc erst auf der Ebene der CMP-Sialinsäuren im Cytosol erfolgt (16), könnte auch den scheinbaren Widerspruch erklären, warum innerhalb einer Zelle die natürlichen oder die unnatürlichen Metaboliten der *N*-Acylmannosamine von einzelnen Enzymen bevorzugt werden. Bis zu den CMP-Sialinsäuren scheint eine Bevorzugung des natürlichen ManNAc und seinen Metaboliten zu bestehen. Mit der Bildung von CMP-Neu5Gc kommt nun aber ein weiteres, ursprünglich natürliches, Substrat für die Sialyltransferasen hinzu. Untersuchungen bezüglich der Affinität humaner Sialyltransferasen zu verschiedenen CMP-Sialinsäuren fehlen. Jedoch zeigten sich in Untersuchungen verschiedener Säuger-Sialyltransferasen CMP-Neu5Gc und CMP-Neu5Ac als gleichwertig geeignete Donorsubstrate (147). Die Zelloberflächen der Erythrozyten von Menschenaffen enthalten überwiegend Sialoglycane mit Neu5Gc, während die Glycoproteine im Plasma überwiegend Neu5Ac aufweisen (148). Daraus lässt sich vermuten, dass einige Sialyltransferasen eine höhere Affinität zu CMP-Neu5Gc besitzen könnten. Diese könnten somit auch CMP-Neu5Prop bevorzugen. Ob diese Sialyltransferasen, deren DNA-Sequenz im Gegensatz zu ihrer Gewebeexpression hoch konserviert ist (148), in humanen Zellen überhaupt exprimiert werden oder ob sie ggf. nur bei maligne transformierten Zellen auftreten, kann im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht beantwortet werden.

Die Bestimmung der Oberflächensialylierung durch das Sialinsäure-bindende Lektin LFA in der Durchflusszytometrie zeigte für die HL60-I-Subklone aufgrund der fehlenden UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Expression einen deutlich geringeren Sialylierungsstatus gegenüber den normal sialylierten HL60-II-Subklonen an. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Befunden anderer Autoren (24, 149). Erwartungsgemäß konnte nach *N*-Acylmannosamin-Behandlung der HL60-I-Zellen ein signifikanter Anstieg der Oberflächensialylierung nachgewiesen werden. Allerdings fiel dieser Anstieg nach ManNProp-Behandlung deutlich geringer aus als nach ManNAc-Behandlung. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der HPLC-Analyse, die für beide *N*-Acylmannosamine einen vergleichbaren Anstieg der membrangebundenen Sialinsäuren zeigte. Ursächlich hierfür ist vermutlich eine verminderte Bindungsaffinität des Lektins LFA gegenüber der modifizierten Sialinsäure Neu5Prop, da die *N*-Acetylseitenkette der Sialinsäuren bei der Bindung an LFA eine wesentliche Rolle spielt (Abb. 4.1) (150). So besteht beispielsweise für Neu5Gc eine 20-fach geringere Bindungsaffinität gegenüber LFA im Vergleich zu Neu5Ac. Bei den ManNProp-behandelten HL60-II-Zellen ist dieser Unterschied gegenüber den ManNAc-behandelten Zellen aufgrund des geringeren Anteils an modifizierten Sialinsäuren auf der Zelloberfläche geringer ausgeprägt.

Sowohl in HPLC-Analytik als auch im LFA-Bindungsassay konnte zwar nach *N*-Acylmannosamin-Behandlung ein deutlicher Anstieg der Gesamtsialylierung von HL60-I-Zellen nachgewiesen werden, jedoch erreichten die HL60-I-Zellen nicht den Sialylierungsgrad der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-kompetenten HL60-II-Zellen. Das Bindungsmuster der Lektine VVA, SBA und PNA, die alle an desialylierte Strukturen binden, zeigte jedoch an, dass es auf

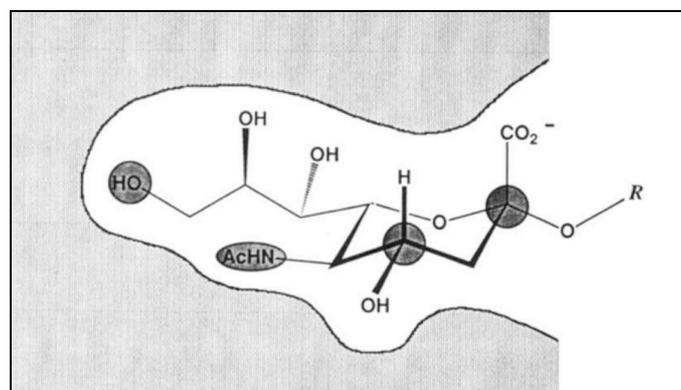


Abb. 4.1 Modell der LFA-Bindungstasche für Sialinsäuren.

Dargestellt sind die erforderlichen Komponenten der Sialinsäure für eine Bindung an LFA mit hoher Affinität. Die *N*-Acetylgruppe spielt hierbei eine wichtige Rolle. Abbildung aus Knibbs *et al.* (150).

den Zelloberflächen der *N*-Acylmannosamin-behandelten HL60-I-Zellen noch freie Sialinsäurebindungsstellen gab. Die Gesamtsialylierung der HL60-II-Zellen konnte durch die Zugabe von *N*-Acylmannosaminen geringfügig gesteigert werden, wie sowohl in der HPLC-Analyse für beide *N*-Acylmannosamine als auch im LFA-Bindungsassay nach ManNAc-Behandlung gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es auch auf den unbehandelten UDP-GlcNAc-2-Epimerase-kompetenten HL60-Zellen noch freie Sialinsäure-Bindungsstellen verfügbar waren. Unterstützt wird diese Annahme durch den signifikanten Abfall der PNA-Bindung bei den *N*-Acylmannosamin-behandelten gegenüber den unbehandelten HL60-II-Zellen. Ursächlich könnte die erhöhte intrazelluläre CMP-Sialinsäure-Konzentration durch die exogene Zufuhr von ManNAc bzw. ManNProp sein. Dadurch könnten die entsprechenden Sialyltransferasen im Golgi-Apparat die PNA-Bindungsstellen möglicherweise effektiver sialylieren, was zu einem leichten Anstieg der Gesamtsialylierung führt. Allerdings stand dem HL60-I-Subklon ein entsprechend erhöhtes Angebot an CMP-Sialinsäuren nach *N*-Acylmannosamin-Behandlung zur Verfügung. Es stellt sich somit die Frage, warum der Sialylierungsgrad der HL60-II-Zellen dennoch nicht erreicht wurde. Zum einen könnten HL60-I-Zellen ein anderes Expressionsmuster oder eine insgesamt geringere Expression von Sialyltransferasen aufweisen, sodass die Glykokonjugate weniger effizient sialyliert werden. Hierzu müsste eine Analyse der mRNA-Expression der Sialyltransferasen erfolgen. Die zweite Möglichkeit wäre eine verringerte Expression der Akzeptorstellen für Sialinsäuren, also Glycoproteine oder Glycolipide. Eine komplette Erfassung dieser Glycoconjugate erfordert Massenspektrometrie-basierte Untersuchungen, die in diesem Umfang derzeit methodisch noch nicht für den Routinegebrauch zur Verfügung stehen.

Auffällig sind in diesem Zusammenhang die Veränderungen der Con A-Bindung bei *N*-Acylmannosamin-behandelten gegenüber den unbehandelten HL60-I-Zellen. Das Lektin Con A bindet an Mannose-haltige Strukturen und Glucosylreste der Oligosaccharide (24). Sowohl nach ManNAc als auch nach ManNProp-Behandlung kommt es bei den HL60-I-Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der Con A-Bindung. Bei den HL60-II-Zellen finden sich nach *N*-Acylmannosamin-Behandlung ebenfalls tendenziell höhere Werte für die Con A-Bindung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Diese Befunde könnten darauf hindeuten, dass es nach Behandlung mit den *N*-Acylmannosaminen zu einer vermehrten Bildung von Glycanstrukturen auf den Zelloberflächen kommt. Bei den HL60-Zellen besteht zwar ein Defizit an Sialinsäuren, die wesentlicher Bestandteil membrangebundener Glycane sind. Allerdings würde man bei einem alleinigen Sialinsäuremangel erwarten, dass die Saccharidstrukturen, die unterhalb der Sialinsäuren liegen, bereits vorhanden sein müssten. Dies ist aber offenbar nicht der Fall.

Bemerkenswert ist, dass der Effekt einer verstärkten Con A-Bindung bei den ManNProp-behandelten HL60-I-Zellen signifikant größer ist als bei den ManNAc-behandelten HL60-I-Zellen. Ob eine Synthese von Oligosaccharidstrukturen möglicherweise durch den angestiegenen CMP-Sialinsäure-Spiegel induziert wurde, oder welcher Mechanismus dem Anstieg der Con A-Bindung zugrunde liegt, kann hier nicht beantwortet werden. Über Spekulationen zum Einfluss von *N*-Acylmannosaminen oder ihren metabolischen Produkten auf die Genregulation bzw. auf Prozesse zur Enzymregulation wird später eingegangen.

Vergleicht man die Con A-Bindung von unbehandelten HL60-I- und HL60-II-Zellen miteinander, so fällt die deutlich geringere Con A-Bindung bei den HL60-I-Zellen auf. Die Oligosaccharidstrukturen der beiden Subklone unterscheiden sich also nicht nur in Bezug auf ihren Sialinsäuregehalt, sondern verfügen offenbar auch über unterschiedliche Glycanstrukturen unterhalb der Sialinsäuren. Diese Befunde werden von einer systematischen Analyse der N-Glycanstrukturen auf hämatopoetischen Zelllinien unterstützt, die u. a. die hier verwendeten HL60-I- und HL60-II-Subklone sowie die beiden BJA-B-Subklone K20 und K88 mit Hilfe der Massenspektrometrie untersucht hat (149). In der Studie wurden eine Reihe von Unterschieden im Aufbau bzw. Verzweigungsmuster der N-Glycane von HL60-I- und HL60-II-Zellen beschrieben. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass sich die beiden Subklone HL60-I und HL-60-II nicht nur in der Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase oder der Sialyltransferasen unterscheiden, sondern auch in zahlreichen anderen Proteinen, die mit der Bildung und Regulation von Glycokonjugaten in Zusammenhang stehen. Ursache für diese Unterschiede in den beiden Zelllinien könnte eine unterschiedliche epigenetische Regulation sein, die als übergeordneter Mechanismus zahlreiche Gene betrifft. Für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase wurde eine solche epigenetische Regulation sowohl für HL60-Zellen als auch für die BJA-B-Zellen in unterschiedlicher Ausprägung beschrieben (26). In der Massenspektrometrie-gestützten Untersuchung der N-Glycane fanden sich die bei den HL60-Zellen beschriebenen Unterschiede bei den BJA-B-Zellen nicht (149). Interessanterweise erreichen die BJA-B K20-Subklone nach *N*-Acylmannosamin-Behandlung den Sialylierungsgrad des K88-Subklons (151). Für die geringeren Unterschiede zwischen den beiden BJA-B-Subklonen könnte ursächlich sein, dass sie anders als die HL60-Subklone zeitgleich aus einer gemeinsamen Stammkultur gewonnen wurden (152).

In dieser Arbeit konnte weiterhin die Modifikation der Sialyl-Lewis X-Struktur mittels MOE gezeigt werden. Auf der Zelloberfläche unbehandelter HL60-I-Zellen war die Tetrasaccharid-Struktur durch einen spezifischen Antikörper in der Durchflusszytometrie kaum nachweisbar. Im

Vergleich dazu fand sich bei den HL60-II-Zellen eine mehr als 100-fach höhere Expression des Sialyl-Lewis X-Epitops. Nach ManNAc-Supplementation im Kulturmedium der HL60-I-Subklone konnte eine deutliche Erhöhung der Expression von Sialyl-Lewis X-Epitopen auf den Zelloberflächen gemessen werden, wie es für ManNAc zuvor auch schon gezeigt worden war (24). Nach Behandlung der HL60-I-Zellen mit ManNProp kam es ebenfalls zu einem deutlichen Anstieg der Sialyl-Lewis X-Epitope in der Durchflusszytometrie, der tendenziell etwas stärker ausfiel als für die ManNAc-behandelten HL60-I-Zellen. Für die HL60-II-Zellen konnte kein signifikanter Anstieg der Sialyl-Lewis X-Epitope nach Behandlung mit den *N*-Acylmannosaminen gemessen werden. Jedoch fanden sich auch für die HL60-II-Zellen nach ManNProp-Behandlung tendenziell höhere Fluoreszenzintensitäten in der Durchflusszytometrie als für die unbehandelten oder ManNAc-behandelten Zellen. Horstkorte *et al.* (145) griffen diese Befunde auf und konnten eine dreifach höhere Expression von Sialyl-Lewis X-Strukturen nach ManNProp-Behandlung in HL60-I- und HL60-II-Zellen mittels Western-Blot als alternative Methode sowie eine verstärkte Adhäsion der ManNProp-behandelten Zellen an P- und E-Selektinen nachweisen. Die Modifikation der für inflammatorische Prozesse bedeutsamen Sialyl-Lewis X-Struktur zeigt exemplarisch, dass mit Hilfe des MOE die Rolle von Glycanstrukturen in pathologischen Prozessen untersucht und daraus mögliche therapeutische Strategien entwickelt werden können (60, 153).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nach Behandlung der beiden hämatopoetischen Zelllinien mit den *N*-Acylmannosaminen ein Anstieg der CMP-Sialinsäuren gemessen werden. Die von Fritsch *et al.* (134) bereits beschriebene Vervielfachung des CMP-Neu5Ac-Pools nach Behandlung von MDCK-Zellen mit ManNAc verdeutlicht, dass die sonst durch Feedback-Hemmung straff regulierte Sialinsäurebiosynthese (22) durch Zufuhr des Reaktionsproduktes der UDP-GlcNAc-2-Epimerase umgangen werden kann. Wie bereits erwähnt wurde bei allen Subklonen, außer den HL60-II-Zellen, ein Anstieg des CMP-Sialinsäure-Pools nach Behandlung mit ManNProp gemessen. Der Anteil modifizierter CMP-Sialinsäuren entsprach bei den HL60-Zellen in etwa dem Anteil inkorporierter Neu5Prop, bei den BJA-B-Zellen lag er über diesem. Ähnliche Befunde zum Verhältnis von membrangebundenen modifizierten Sialinsäuren zu modifizierten CMP-Sialinsäuren wurden auch von anderen Autoren nach Inkubation von PC12-Zellen mit ManNProp beschrieben (141).

Ein Reihe von biologischen Effekten, die nach Behandlung verschiedener Zelllinien mit ManNAc bzw. ManNAc-Analoga beobachtet wurden, sind zweifelsfrei auf eine Struktur-Wirkungsbeziehung durch die inkorporierten Sialinsäureanaloga über Sialinsäure-bindende

Lektine zurückzuführen (95, 109, 110). Unabhängig davon wurden aber immer wieder Effekte beschrieben, die sich nicht durch den Einbau der ManNAc-Analoga respektive ihrer korrespondierenden Sialinsäuren in Membranglycokonjugate erklären lassen (32, 111-113, 126). Beispielsweise konnte nach ManNAc- aber vor allem nach ManNProp-Behandlung die Proliferation von Astrozyten und Mikroglia (112), das Neuritenwachstum von PC12-Zellen (113) sowie die Proliferation von Lymphozyten und die Expression von CD25, CD71 bzw. die IL-2-Sekretion (126) stimuliert werden. Dabei wurden Veränderungen in der Expression verschiedener cytosolischer Proteine, die teilweise an Signaltransduktionsprozessen (113) beteiligt sind, sowie eine erhöhte Expression von Transkriptionsfaktoren (126, 154) beobachtet. Inwieweit diesen Befunden ähnliche Mechanismen wie den Onkogen-supprimierenden Eigenschaften der SCFA-Hexosamine (81) zugrunde liegen, deren Wirkungsweise bisher jedoch auch noch nicht vollständig geklärt ist, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht beurteilt werden. Die für Monosaccharide einzigartige Aktivierung der Sialinsäuren im Zellkern unter Verwendung von CTP (4) führte bereits bei ihrer Entdeckung zu Spekulationen über eine mögliche regulatorische Funktion der CMP-Neu5Ac-Synthetase bzw. der CMP-Sialinsäuren über den Sialinsäurestoffwechsel hinaus (30). Die neueren Untersuchungen, die eine enge Verknüpfung des Sialinsäurestoffwechsels mit Signaltransduktionsvorgängen in Zusammenhang bringen, liefern vielversprechende Daten, die zu weiterführenden Untersuchungen Anlass geben. Auf jeden Fall mehren sich die Hinweise dafür, dass natürliche und modifizierte Sialinsäurevorläufer, Sialinsäuren oder die CMP-Sialinsäuren mehr als nur einfache Bausteine der Glycosylierungsmaschinerie sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass freie Sialinsäureanaloga in relevantem Umfang durch eukaryotische Zellen aufgenommen und in membrangebundene Sialoglycane eingebaut werden können. Lange Zeit wurde angenommen, dass eine Aufnahme freier Sialinsäuren aus dem extrazellulären Raum aufgrund ihrer negativen Ladung und hydrophilen Eigenschaften von eukaryotischen Zellen nicht effektiv möglich sei, wenngleich immer wieder Hinweise für eine Aufnahme und Inkorporation beschrieben wurden (136). Oetke *et al.* (94) konnten 2001 zeigen, dass eine effiziente Aufnahme und der Einbau freier Neu5Ac mit konsekutivem Anstieg der Oberflächensialylierung möglich ist. Aufbauend auf diese Ergebnisse sollte die Aufnahme und Inkorporation verschiedener Sialinsäureanaloga mit Modifikationen an C-1, C-5 und C-9 untersucht werden. Durch eine Reihe von Lektinen konnten Veränderungen der Oberflächensialylierung festgestellt werden, die Ausdruck einer Inkorporation von Sialinsäuren in membrangebundene Glycokonjugate war (95). Die geänderte

Lektinbindung allein erlaubte jedoch keine Aussage darüber, ob die Sialinsäureanaloga unverändert mit ihren Modifikationen in die Membranglycokonjugate eingebaut wurden bzw. zuvor extra- oder intrazellulär degradiert worden sind. Der Anstieg der Oberflächensialylierung wäre dann durch eine *de novo*-Synthese unter Wiederverwendung der Abbauprodukte zustande gekommen. Mittels HPLC-Analytik konnte in dieser Arbeit der Nachweis geführt werden, dass ein Teil der eingesetzten Sialinsäureanaloga unverändert in die Zellen aufgenommen und in die Membranglycokonjugate eingebaut wurde.

In HPLC-Analyse der verwendeten Sialinsäurederivate konnte von der Reinsubstanz nicht in jedem Fall ein eindeutiges bzw. teilweise überhaupt kein Signal detektiert werden, wobei die Ursachen der fehlenden Nachweisbarkeit nicht immer eindeutig benannt werden können. Möglicherweise waren einige Derivate zu polar, beispielsweise 5-*N*-Gly-Neu oder 9-Desoxy-9-*N*-Gly-Neu5Ac, um von der RP18-Säule retiniert zu werden, oder eine Markierung mit DMB konnte nicht erfolgen aufgrund sterischer Behinderungen durch sperrige Substituenten wie bei 9-Desoxy-9-Acetamido-Neu5Ac. In anderen Fällen, z. B. beim Analogon Neu5Ac-Et-Ester, kam es während der Aufarbeitung zum Verlust der modifizierten Gruppe, denn die Retentionszeit des Peaks im Chromatogramm entsprach dem der Neu5Ac. Ursächlich könnte die Hydrolyse der Esterbindung während der Derivatisierung des Sialinsäureanalogons mit DMB bei 56 °C und einem pH-Wert unter 6 sein. Intrazellulär werden diese Modifikationen durch unspezifische Esterasen abgespalten (81). Mit einer Auswahl von Sialinsäureanaloga wurden dann HL60-I- und BJA-B K20-Zellen behandelt, und der Anteil modifizierter Sialinsäuren in ihren Membranglycoproteinen analysiert. Dieser betrug in Abhängigkeit vom untersuchten Analogon 65-95 %, sodass unter Verwendung bestimmter Analoga eine nahezu homogen modifizierte Oberflächensialylierung erzeugt werden konnte. Dafik *et al.* (97) behandelten ebenfalls die hier verwendeten endogen hyposialylierten HL60-Zellen mit peracetylierten Sialinsäurederivaten und erzielten mit bis zu 72 % modifizierten Sialinsäuren in den Membranglycoproteinen vergleichbare Werte. Bardor *et al.* wiesen nach Behandlung mit freier Neu5Gc abhängig vom Zelltyp 40-70 % Neu5Gc in der kombinierten Fraktion von löslichen und membrangebundenen Proteinen nach (96). Die Aufnahme der teils hydrophilen Sialinsäureanaloga erfolgt vermutlich analog zur Neu5Gc durch Pinozytose wie von Bardor *et al.* beschriebenen (96). Trotz des offenbar hohen Grades an Permissivität in Bezug auf die Aufnahme, Metabolisierung und Inkorporation freier Sialinsäureanaloga scheinen bestimmte chemische Modifikationen nicht umgesetzt zu werden. Bei den hier verwendeten Sialinsäureanaloga, die an C-5 oder C-9 einen Glycin- oder Succinylrest trugen bzw. über eine Amino- oder Acetamido-Gruppe in Position C-9 verfügten, konnte mittels Lektinen kein signifikanter Effekt auf die Oberflächensialylierung

nachgewiesen werden (95). Andererseits lassen sich durch den Einsatz modifizierter Sialinsäurederivate eine Reihe struktureller Limitationen überwinden, wie sie bei der Verwendung von ManNAc-Analoga bestehen. Im Gegensatz zu *N*-Acylmannosaminanaloga, für die bisher neben *N*-Acylderivaten nur C-4-Modifikationen (93) erfolgreich eingesetzt wurden, sind Sialinsäurederivate unabhängig vom mehrstufigen Biosyntheseprozess der *N*-Acetylneuraminsäure. So können beispielsweise durch die Verwendung von ManNAc-Analoga keine an C-9-modifizierten Sialinsäuren gebildet werden, denn Modifikationen der Hydroxylgruppe an der C-6-Position des ManNAc, aus der nach der Kondensation der Hexose mit Pyruvat die C-9-Position der Neu5Ac hervorgeht, verhindern die Phosphorylierung durch die ManNAc-Kinase und somit die weitere Metabolisierung (95, 98). Im Gegensatz dazu sind Modifikationen von Sialinsäuren an der Position C-9 sowie theoretisch auch an den Positionen C-1, C-3, C-4, C-7 oder C-8 bei Verwendung entsprechender Sialinsäureanaloga denkbar. Limitationen beim Einsatz von Sialinsäureanaloga bestehen darin, dass sie als Substrate von der CMP-Neu5Ac-Synthetase, dem CMP-Sialinsäure-Transporter in den Golgi-Membranen sowie den Sialyltransferasen akzeptiert werden müssen. Jedoch ist auch für diese Enzyme bzw. Transportmoleküle bereits eine relativ hohe Permissivität gegenüber modifizierten Sialinsäuren gezeigt worden (99, 100, 155).

Die Kombination von endogen hyposialylierten Zellen mit modifizierten *N*-Acylmannosaminen oder freien Sialinsäureanaloga ermöglicht die Erzeugung einer nahezu homogenen Population von definierten, strukturell veränderten Sialinsäuren auf der Zelloberfläche und erweitert das Spektrum an möglichen Modifikationen in membrangebundenen und sezernierten Sialoglycokonjugaten.

Das metabolische Oligosaccharid-Engineering stellt somit ein vielseitiges und Erfolg versprechendes Instrument dar, mit dessen Hilfe biologische Prozesse erforscht und neue therapeutische Verfahren entwickelt werden können. In den letzten Jahren wurden zunehmend rekombinante Glycoproteine wie Antikörper oder Hormone in der Tumorthherapie und Behandlung chronischer Erkrankungen eingesetzt. Durch die Techniken des MOE lassen sich die Pharmakokinetik und die Pharmakodynamik Glycoprotein-basierter Medikamente weiter optimieren (82, 156, 157), um den Patienten möglichst effektive und gut verträgliche Therapien anbieten zu können.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zellsystem etabliert, bei dem die Zellen durch metabolisches Oligosaccharid-Engineering (MOE) eine nahezu homogene Population definierter, strukturell veränderter Sialinsäuren auf der Zelloberfläche präsentieren. Anhand der erhobenen Befunde konnten außerdem Erkenntnisse über den Metabolismus modifizierter *N*-Acylmannosamine wie *N*-Propanoylmannosamin (ManNProp) gewonnen werden.

1. Die Gesamtsialylierung konnte nach Inkubation mit 10 mM ManNAc bzw. ManNProp über 72 h in hyposialylierten HL60-I-Zellen gesteigert werden, erreichte aber nicht die Werte des normal sialylierten UDP-GlcNAc-2-Epimerase-kompetenten HL60-II-Subklons.
2. Mittels HPLC wurde in den UDP-GlcNAc-2-Epimerase-defizienten HL60-I- und BJA-B K20-Subklonen nach ManNProp-Behandlung ein Anteil von bis zu 85 % modifizierter Sialinsäuren in den Membranglycoproteinen bestimmt. Für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-kompetenten Subklone, HL60-II und BJA-B K88, lag der Anteil nur bei 15 % bzw. 56 %. Die Inkorporation modifizierter *N*-Acylmannosamine ist somit abhängig von der Aktivität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase. Für ein effizientes MOE sind daher UDP-GlcNAc-2-Epimerase-defiziente Zellen besonders gut geeignet.
3. Der CMP-Sialinsäure-Gehalt ließ sich durch *N*-Acylmannosamin-Behandlung steigern. Bei den HL60-II-Zellen blieb ein Anstieg nach ManNProp-Behandlung jedoch aus bzw. war bei den BJA-B K88-Zellen geringer als nach ManNAc-Gabe, was offenbar Ausdruck einer geringeren Akzeptanz von ManNProp durch die Enzyme der Sialinsäurebiosynthese ist. Bei den HL60-Zellen entsprach der Anteil modifizierter CMP-Sialinsäuren dem Anteil membrangebundener Sialinsäuren, bei den BJA-B-Zellen lag er über diesem.
4. Nach ManNAc- und ManNProp-Behandlung wurde bei den HL60-I-Zellen ein deutlicher Anstieg von Sialyl-Lewis X-Epitopen mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen.
5. Die veränderte Sialyl-Lewis X-Expression sowie das Lektinbindungsmuster in der Durchflusszytometrie *N*-Acylmannosamin-behandelter HL60-Zellen deuten darauf hin, dass modifizierte CMP-Sialinsäuren von einigen Sialyltransferasen bevorzugt umgesetzt werden.
6. Freie Sialinsäureanaloga mit Modifizierungen an C-5 und C-9 werden von UDP-GlcNAc-2-Epimerase-defizienten Zellen unverändert und effizient aufgenommen und in Membranglycokonjugate eingebaut. Für einzelne Sialinsäureanaloga wurde ein Anteil von 95 % in den Membranglycoproteinen bestimmt. Durch freie Sialinsäureanaloga lässt sich somit das Spektrum an Modifikationen für Sialoglycane deutlich erweitern.

6 Literaturverzeichnis

1. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 1972;175(4023):720-31.
2. Stryer L. Struktur und Dynamik von Membranen. In: Stryer L, Ed. *Biochemie*. 4 ed. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akad Verl; 1996:277-307.
3. Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*. 1993;3(2):97-130.
4. Angata T, Varki A. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev*. 2002;102(2):439-69.
5. Inoue S, Kitajima K. KDN (deaminated neuraminic acid): dreamful past and exciting future of the newest member of the sialic acid family. *Glycoconj J*. 2006;23(5-6):277-90.
6. Klenk E. Über die Natur der Phosphatide und anderer Lipide in Niemann-Pickscher Krankheit. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*. 1935;235:24-36.
7. Blix G. Über die Kohlenhydratgruppen des Submaxillarismucins. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*. 1936;240:43-54.
8. Faillard H. The early history of sialic acids. *Trends Biochem Sci*. 1989;14(6):237-41.
9. Blix FG, Gottschalk A, Klenk E. Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids. *Nature*. 1957;179(4569):1088.
10. Klenk E. Neuraminsäure, das Spaltprodukt eines neuen Gehirnlipoids. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*. 1941;268:50-8.
11. Tanner ME. The enzymes of sialic acid biosynthesis. *Bioorg Chem*. 2005;33(3):216-28.
12. Traving C, Schauer R. Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell Mol Life Sci*. 1998;54(12):1330-49.
13. Haverkamp JS, Spoomaker T, Dorland, L, Vliegthart, JF, Schauer, R. Determination of the β -anomeric configuration of cytidine 5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid by ^{13}C NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc* 1979;101:4851-3.
14. Schauer R. Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconj J*. 2000;17(7-9):485-99.

15. Baumann AM, Bakkers MJ, Buettner FF, Hartmann M, Grove M, Langereis MA, de Groot RJ, Muhlenhoff M. 9-O-Acetylation of sialic acids is catalysed by CASD1 via a covalent acetyl-enzyme intermediate. *Nat Commun.* 2015;6:7673.
16. Varki A. Loss of N-glycolylneuraminic acid in humans: Mechanisms, consequences, and implications for hominid evolution. *Am J Phys Anthropol.* 2001;Suppl 33:54-69.
17. Hinderlich S. Biosynthese von Sialinsäuren und anderen Aminozuckern in Säugetieren. Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi für das Fach Biochemie, Freie Universität Berlin; 2003.
18. Varki A. Diversity in the sialic acids. *Glycobiology.* 1992;2(1):25-40.
19. Münster-Kühnel AK, Hinderlich S. Sialic acid biosynthesis in vertebrates. In: Tiralongo J, Martinez-Duncker I, eds. *Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function.* 1 ed: Bentham Science Publishers; 2013:76-114.
20. Hinderlich S, Stasche R, Zeitler R, Reutter W. A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *J Biol Chem.* 1997;272(39):24313-8.
21. Stasche R, Hinderlich S, Weise C, Effertz K, Lucka L, Moormann P, Reutter W. A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Molecular cloning and functional expression of UDP-N-acetyl-glucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *J Biol Chem.* 1997;272(39):24319-24.
22. Kornfeld S, Kornfeld R, Neufeld EF, O'Brien PJ. The Feedback Control of Sugar Nucleotide Biosynthesis in Liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1964;52:371-9.
23. Seppala R, Tietze F, Krasnewich D, Weiss P, Ashwell G, Barsh G, Thomas GH, Packman S, Gahl WA. Sialic acid metabolism in sialuria fibroblasts. *J Biol Chem.* 1991;266(12):7456-61.
24. Keppler OT, Hinderlich S, Langner J, Schwartz-Albiez R, Reutter W, Pawlita M. UDP-GlcNAc 2-epimerase: a regulator of cell surface sialylation. *Science.* 1999;284(5418):1372-6.
25. Horstkorte R, Nohring S, Danker K, Effertz K, Reutter W, Lucka L. Protein kinase C phosphorylates and regulates UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *FEBS Lett.* 2000;470(3):315-8.
26. Oetke C, Hinderlich S, Reutter W, Pawlita M. Epigenetically mediated loss of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase expression in hyposialylated cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;308(4):892-8.

27. Broccolini A, Mirabella M. Hereditary inclusion-body myopathies. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(4):644-50.
28. Watson DR, Jourdian GW, Roseman S. The sialic acids. 8. Sialic acid 9-phosphate synthetase. *J Biol Chem*. 1966;241(23):5627-36.
29. Maliekal P, Vertommen D, Delpierre G, Van Schaftingen E. Identification of the sequence encoding N-acetylneuraminase-9-phosphate phosphatase. *Glycobiology*. 2006;16(2):165-72.
30. Kean EL. Nuclear cytidine 5'-monophosphosialic acid synthetase. *J Biol Chem*. 1970;245(9):2301-8.
31. Roseman S. Enzymatic synthesis of cytidine 5'-mono-phospho-sialic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1962;48:437-41.
32. Kontou M, Weidemann W, Bork K, Horstkorte R. Beyond glycosylation: sialic acid precursors act as signaling molecules and are involved in cellular control of differentiation of PC12 cells. *Biol Chem*. 2009;390(7):575-9.
33. Lepers A, Shaw L, Cacan R, Schauer R, Montreuil J, Verbert A. Transport of CMP-N-glycoloylneuraminic acid into mouse liver Golgi vesicles. *FEBS Lett*. 1989;250(2):245-50.
34. Pshezhetsky AV, Hinek A. Where catabolism meets signalling: neuraminidase 1 as a modulator of cell receptors. *Glycoconj J*. 2011;28(7):441-52.
35. Verheijen FW, Verbeek E, Aula N, Beerens CE, Havelaar AC, Joesse M, Peltonen L, Aula P, Galjaard H, van der Spek PJ, Mancini GM. A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases. *Nat Genet*. 1999;23(4):462-5.
36. Takematsu H, Diaz S, Stoddart A, Zhang Y, Varki A. Lysosomal and cytosolic sialic acid 9-O-acetyltransferase activities can be encoded by one gene via differential usage of a signal peptide-encoding exon at the N terminus. *J Biol Chem*. 1999;274(36):25623-31.
37. Reuter G, Gabius HJ. Sialic acids structure-analysis-metabolism-occurrence-recognition. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1996;377(6):325-42.
38. Harduin-Lepers A. Vertebrate Sialyltransferases. In: Tiralongo J, Martinez-Duncker I, eds. *Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function*. 1 ed: Bentham Science Publishers; 2013:139-87.
39. Schauer R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol*. 2009;19(5):507-14.

40. Stanley P, Schachter H, Taniguchi N. N-Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, eds. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009:101-14.
41. Wopereis S, Lefeber DJ, Morava E, Wevers RA. Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review. *Clin Chem*. 2006;52(4):574-600.
42. Brockhausen I, Schachter H, Stanley P. O-GalNAc Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, eds. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009:115-27.
43. Schnaar RL, Suzuki A, Stanley P. Glycosphingolipids. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, eds. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009:129-41.
44. Chou HH, Hayakawa T, Diaz S, Krings M, Indriati E, Leakey M, Paabo S, Satta Y, Takahata N, Varki A. Inactivation of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase occurred prior to brain expansion during human evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(18):11736-41.
45. Hirabayashi Y, Kasakura H, Matsumoto M, Higashi H, Kato S, Kasai N, Naiki M. Specific expression of unusual GM2 ganglioside with Hanganutziu-Deicher antigen activity on human colon cancers. *Jpn J Cancer Res*. 1987;78(3):251-60.
46. Tangvoranuntakul P, Gagneux P, Diaz S, Bardor M, Varki N, Varki A, Muchmore E. Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(21):12045-50.
47. Padler-Karavani V, Yu H, Cao H, Chokhawala H, Karp F, Varki N, Chen X, Varki A. Diversity in specificity, abundance, and composition of anti-Neu5Gc antibodies in normal humans: potential implications for disease. *Glycobiology*. 2008;18(10):818-30.
48. Tiralongo J. Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function. In: Tiralongo J, Martinez-Duncker I, eds. *Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function*. Bentham Science Publishers; 2013:3-32.
49. Schauer R. Sialic acids and their role as biological masks. *Trends Biochem Sci*. 1985; 10(9):357-60.
50. Pang PC, Chiu PC, Lee CL, Chang LY, Panico M, Morris HR, Haslam SM, Khoo KH, Clark GF, Yeung WS, Dell A. Human sperm binding is mediated by the sialyl-Lewis(x) oligosaccharide on the zona pellucida. *Science*. 2011;333(6050):1761-4.

51. Kircheis R, Kircheis L, Oshima H, Kohchi C, Soma G, Mizuno D. Selective lysis of early embryonic cells by the alternative pathway of complement--a possible mechanism for programmed cell death in embryogenesis. *In Vivo*. 1996;10(4):389-403.
52. Schwarzkopf M, Knobloch KP, Rohde E, Hinderlich S, Wiechens N, Lucka L, Horak I, Reutter W, Horstkorte R. Sialylation is essential for early development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(8):5267-70.
53. Gagiannis D, Orthmann A, Danssmann I, Schwarzkopf M, Weidemann W, Horstkorte R. Reduced sialylation status in UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE)-deficient mice. *Glycoconj J*. 2007;24(2-3):125-30.
54. Muhlenhoff M, Oltmann-Norden I, Weinhold B, Hildebrandt H, Gerardy-Schahn R. Brain development needs sugar: the role of polysialic acid in controlling NCAM functions. *Biol Chem*. 2009;390(7):567-74.
55. Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(4):255-66.
56. Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends in Molecular Medicine*. 2003;9(6):263-8.
57. Inagaki Y, Gao J, Song P, Kokudo N, Nakata M, Tang W. Clinicopathological utility of sialoglycoconjugates in diagnosing and treating colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(20):6123-32.
58. Kannagi R, Izawa M, Koike T, Miyazaki K, Kimura N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci*. 2004;95(5):377-84.
59. Mahdavi J, Sonden B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, Angstrom J, Larsson T, Teneberg S, Karlsson KA, Altraja S, Wadstrom T, Kersulyte D, Berg DE, Dubois A, Petersson C, Magnusson KE, Norberg T, Lindh F, Lundskog BB, Arnqvist A, Hammarstrom L, Boren T. Helicobacter pylori SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*. 2002;297(5581):573-8.
60. Fuster MM, Brown JR, Wang L, Esko JD. A disaccharide precursor of sialyl Lewis X inhibits metastatic potential of tumor cells. *Cancer Res*. 2003;63(11):2775-81.
61. Kuznetsova NR, Stepanova EV, Peretolchina NM, Khochenkov DA, Boldyrev IA, Bovin NV, Vodovozova EL. Targeting liposomes loaded with melphalan prodrug to tumour vasculature via the Sialyl Lewis X selectin ligand. *J Drug Target*. 2013.
62. Hakomori S. Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res*. 1985;45(6):2405-14.
63. Hauselmann I, Borsig L. Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis. *Front Oncol*. 2014;4:28.

64. Cheresh DA, Reisfeld RA, Varki AP. O-acetylation of disialoganglioside GD3 by human melanoma cells creates a unique antigenic determinant. *Science*. 1984;225(4664):844-6.
65. Fukuda M. Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens. *Cancer Res*. 1996;56(10):2237-44.
66. Schultz MJ, Swindall AF, Bellis SL. Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glyicans. *Cancer Metastasis Rev*. 2012;31(3-4):501-18.
67. Jeschke U, Mylonas I, Shabani N, Kunert-Keil C, Schindlbeck C, Gerber B, Friese K. Expression of sialyl lewis X, sialyl Lewis A, E-cadherin and cathepsin-D in human breast cancer: immunohistochemical analysis in mammary carcinoma in situ, invasive carcinomas and their lymph node metastasis. *Anticancer Res*. 2005;25(3A):1615-22.
68. Lehmann F, Tiralongo E, Tiralongo J. Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(12):1331-54.
69. Beigel J, Bray M. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. *Antiviral Res*. 2008;78(1):91-102.
70. Varki A, Gagneux P. Human-specific evolution of sialic acid targets: explaining the malignant malaria mystery? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(35):14739-40.
71. Emsley P, Fotinou C, Black I, Fairweather NF, Charles IG, Watts C, Hewitt E, Isaacs NW. The structures of the H(C) fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding. *J Biol Chem*. 2000;275(12):8889-94.
72. Nizet V, Esko JD. Bacterial and Viral Infections. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, eds. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009:537-51.
73. Colli W. Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J*. 1993;7(13):1257-64.
74. Morell AG, Irvine RA, Sternlieb I, Scheinberg IH, Ashwell G. Physical and chemical studies on ceruloplasmin. V. Metabolic studies on sialic acid-free ceruloplasmin in vivo. *J Biol Chem*. 1968;243(1):155-9.
75. Steirer LM, Park EI, Townsend RR, Baenziger JU. The asialoglycoprotein receptor regulates levels of plasma glycoproteins terminating with sialic acid alpha2,6-galactose. *J Biol Chem*. 2009;284(6):3777-83.
76. Rens-Domiano S, Reisine T. Structural analysis and functional role of the carbohydrate component of somatostatin receptors. *J Biol Chem*. 1991;266(30):20094-102.

77. Ozaslan D, Wang S, Ahmed BA, Kocabas AM, McCastlain JC, Bene A, Kilic F. Glycosyl modification facilitates homo- and hetero-oligomerization of the serotonin transporter. A specific role for sialic acid residues. *J Biol Chem.* 2003;278(45):43991-4000.
78. Egrie JC, Dwyer E, Browne JK, Hitz A, Lykos MA. Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin. *Experimental Hematology.* 2003;31(4):290-9.
79. Reutter W, Bauer C. Inhibitors of glycoprotein biosynthesis. *Adv Enzyme Regul.* 1985;24:405-16.
80. Elbein AD. Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharide chains. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:497-534.
81. Wang Z, Du J, Che PL, Meledeo MA, Yarema KJ. Hexosamine analogs: from metabolic glycoengineering to drug discovery. *Curr Opin Chem Biol.* 2009;13(5-6):565-72.
82. Okeley NM, Toki BE, Zhang X, Jeffrey SC, Burke PJ, Alley SC, Senter PD. Metabolic engineering of monoclonal antibody carbohydrates for antibody-drug conjugation. *Bioconj Chem.* 2013;24(10):1650-5.
83. Campbell CT, Sampathkumar SG, Yarema KJ. Metabolic oligosaccharide engineering: perspectives, applications, and future directions. *Mol Biosyst.* 2007;3(3):187-94.
84. Du J, Meledeo MA, Wang Z, Khanna HS, Paruchuri VD, Yarema KJ. Metabolic glycoengineering: sialic acid and beyond. *Glycobiology.* 2009;19(12):1382-401.
85. Gnanapragassam VS, Bork K, Galuska CE, Galuska SP, Glanz D, Nagasundaram M, Bache M, Vordermark D, Kohla G, Kannicht C, Schauer R, Horstkorte R. Sialic acid metabolic engineering: a potential strategy for the neuroblastoma therapy. *PLoS One.* 2014;9(8):e105403.
86. Klohs WD, Bernacki RJ, Korytnyk W. Effects of nucleotides and nucleotide:analogs on human serum sialyltransferase. *Cancer Res.* 1979;39(4):1231-8.
87. Grunholz HJ, Harms E, Opetz M, Reutter W, Cerny M. Inhibition of in vitro biosynthesis of N-acetylneuraminic acid by N-acyl- and N-alkyl-2-amino-2-deoxyhexoses. *Carbohydr Res.* 1981;96(2):259-70.
88. Schwartz EL, Hadfield AF, Brown AE, Sartorelli AC. Modification of sialic acid metabolism of murine erythroleukemia cells by analogs of N-acetylmannosamine. *Biochim Biophys Acta.* 1983;762(4):489-97.
89. Hadfield AF, Mella SL, Sartorelli AC. N-acetyl-D-mannosamine analogues as potential inhibitors of sialic acid biosynthesis. *J Pharm Sci.* 1983;72(7):748-51.

90. Kayser H, Zeitler R, Kannicht C, Grunow D, Nuck R, Reutter W. Biosynthesis of a nonphysiological sialic acid in different rat organs, using N-propanoyl-D-hexosamines as precursors. *J Biol Chem.* 1992;267(24):16934-8.
91. Mahal LK, Yarema KJ, Bertozzi CR. Engineering chemical reactivity on cell surfaces through oligosaccharide biosynthesis. *Science.* 1997;276(5315):1125-8.
92. Saxon E, Bertozzi CR. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science.* 2000;287(5460):2007-10.
93. Moller H, Bohrsch V, Bentrop J, Bender J, Hinderlich S, Hackenberger CP. Glycan-specific metabolic oligosaccharide engineering of C7-substituted sialic acids. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2012;51(24):5986-90.
94. Oetke C, Hinderlich S, Brossmer R, Reutter W, Pawlita M, Keppler OT. Evidence for efficient uptake and incorporation of sialic acid by eukaryotic cells. *Eur J Biochem.* 2001;268(16):4553-61.
95. Oetke C, Brossmer R, Mantey LR, Hinderlich S, Isecke R, Reutter W, Keppler OT, Pawlita M. Versatile biosynthetic engineering of sialic acid in living cells using synthetic sialic acid analogues. *J Biol Chem.* 2002;277(8):6688-95.
96. Bardor M, Nguyen DH, Diaz S, Varki A. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. *J Biol Chem.* 2005;280(6):4228-37.
97. Dafik L, d'Alarcao M, Kumar K. Fluorination of mammalian cell surfaces via the sialic acid biosynthetic pathway. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;18(22):5945-7.
98. Jacobs CL, Goon S, Yarema KJ, Hinderlich S, Hang HC, Chai DH, Bertozzi CR. Substrate specificity of the sialic acid biosynthetic pathway. *Biochemistry.* 2001;40(43):12864-74.
99. Gross HJ, Bunsch A, Paulson JC, Brossmer R. Activation and transfer of novel synthetic 9-substituted sialic acids. *Eur J Biochem.* 1987;168(3):595-602.
100. Kelm S, Schauer R, Manuguerra JC, Gross HJ, Crocker PR. Modifications of cell surface sialic acids modulate cell adhesion mediated by sialoadhesin and CD22. *Glycoconj J.* 1994;11(6):576-85.
101. Brossmer R, Isecke R, Herrler G. A sialic acid analogue acting as a receptor determinant for binding but not for infection by influenza C virus. *FEBS Lett.* 1993;323(1-2):96-8.
102. Keppler OT, Horstkorte R, Pawlita M, Schmidt C, Reutter W. Biochemical engineering of the N-acyl side chain of sialic acid: biological implications. *Glycobiology.* 2001;11(2):11R-8R.

103. Collins BE, Fralich TJ, Itonori S, Ichikawa Y, Schnaar RL. Conversion of cellular sialic acid expression from N-acetyl- to N-glycolylneuraminic acid using a synthetic precursor, N-glycolylmannosamine pentaacetate: inhibition of myelin-associated glycoprotein binding to neural cells. *Glycobiology*. 2000;10(1):11-20.
104. Jones MB, Teng H, Rhee JK, Lahar N, Baskaran G, Yarema KJ. Characterization of the cellular uptake and metabolic conversion of acetylated N-acetylmannosamine (ManNAc) analogues to sialic acids. *Biotechnol Bioeng*. 2004;85(4):394-405.
105. Kim EJ, Sampathkumar SG, Jones MB, Rhee JK, Baskaran G, Goon S, Yarema KJ. Characterization of the metabolic flux and apoptotic effects of O-hydroxyl- and N-acyl-modified N-acetylmannosamine analogs in Jurkat cells. *J Biol Chem*. 2004;279(18):18342-52.
106. Charter NW, Mahal LK, Koshland DE, Jr., Bertozzi CR. Biosynthetic incorporation of unnatural sialic acids into polysialic acid on neural cells. *Glycobiology*. 2000;10(10):1049-56.
107. Charter NW, Mahal LK, Koshland DE, Jr., Bertozzi CR. Differential effects of unnatural sialic acids on the polysialylation of the neural cell adhesion molecule and neuronal behavior. *J Biol Chem*. 2002;277(11):9255-61.
108. Yarema KJ, Mahal LK, Bruehl RE, Rodriguez EC, Bertozzi CR. Metabolic delivery of ketone groups to sialic acid residues. Application To cell surface glycoform engineering. *J Biol Chem*. 1998;273(47):31168-79.
109. Keppler OT, Stehling P, Herrmann M, Kayser H, Grunow D, Reutter W, Pawlita M. Biosynthetic modulation of sialic acid-dependent virus-receptor interactions of two primate polyoma viruses. *J Biol Chem*. 1995;270(3):1308-14.
110. Keppler OT, Herrmann M, von der Lieth CW, Stehling P, Reutter W, Pawlita M. Elongation of the N-acyl side chain of sialic acids in MDCK II cells inhibits influenza A virus infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;253(2):437-42.
111. Villavicencio-Lorini P, Laabs S, Danker K, Reutter W, Horstkorte R. Biochemical engineering of the acyl side chain of sialic acids stimulates integrin-dependent adhesion of HL60 cells to fibronectin. *J Mol Med (Berl)*. 2002;80(10):671-7.
112. Schmidt C, Stehling P, Schnitzer J, Reutter W, Horstkorte R. Biochemical engineering of neural cell surfaces by the synthetic N-propanoyl-substituted neuraminic acid precursor. *J Biol Chem*. 1998;273(30):19146-52.
113. Buttner B, Kannicht C, Schmidt C, Loster K, Reutter W, Lee HY, Nohring S, Horstkorte R. Biochemical engineering of cell surface sialic acids stimulates axonal growth. *J Neurosci*. 2002;22(20):8869-75.

114. Witzel C, Reutter W, Stark GB, Koulaxouzidis G. N-Propionylmannosamine stimulates axonal elongation in a murine model of sciatic nerve injury. *Neural Regen Res.* 2015;10(6):976-81.
115. Nauman DA, Bertozzi CR. Kinetic parameters for small-molecule drug delivery by covalent cell surface targeting. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1568(2):147-54.
116. Lemieux GA, Yarema KJ, Jacobs CL, Bertozzi CR. Exploiting differences in sialoside expression for selective targeting of MRI contrast reagents. *J Am Chem Soc.* 1999;121:4278-9.
117. Lee JH, Baker TJ, Mahal LK, Zabner J, Bertozzi CR, Wiemer DF, Welsh MJ. Engineering novel cell surface receptors for virus-mediated gene transfer. *J Biol Chem.* 1999;274(31):21878-84.
118. Sawa M, Hsu TL, Itoh T, Sugiyama M, Hanson SR, Vogt PK, Wong CH. Glycoproteomic probes for fluorescent imaging of fucosylated glycans in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(33):12371-6.
119. Agard NJ, Prescher JA, Bertozzi CR. A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J Am Chem Soc.* 2004;126(46):15046-7.
120. Daubeuf S, Aucher A, Sampathkumar SG, Preville X, Yarema KJ, Hudrisier D. Chemical labels metabolically installed into the glycoconjugates of the target cell surface can be used to track lymphocyte/target cell interplay via trogocytosis: comparisons with lipophilic dyes and biotin. *Immunol Invest.* 2007;36(5-6):687-712.
121. Laughlin ST, Baskin JM, Amacher SL, Bertozzi CR. In vivo imaging of membrane-associated glycans in developing zebrafish. *Science.* 2008;320(5876):664-7.
122. Liu T, Guo Z, Yang Q, Sad S, Jennings HJ. Biochemical engineering of surface alpha 2-8 polysialic acid for immunotargeting tumor cells. *J Biol Chem.* 2000;275(42):32832-6.
123. Lemieux GA, Bertozzi CR. Modulating cell surface immunoreactivity by metabolic induction of unnatural carbohydrate antigens. *Chem Biol.* 2001;8(3):265-75.
124. Wu J, Guo Z. Improving the antigenicity of sTn antigen by modification of its sialic acid residue for development of glycoconjugate cancer vaccines. *Bioconjug Chem.* 2006;17(6):1537-44.
125. Chefalo P, Pan Y, Nagy N, Guo Z, Harding CV. Efficient metabolic engineering of GM3 on tumor cells by N-phenylacetyl-D-mannosamine. *Biochemistry.* 2006;45(11):3733-9.
126. Roehlecke C, Horstkorte R, Reutter W. Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells by the sialic acid precursor N-propanoylmannosamine. *Glycoconj J.* 2013;30(8):813-8.

127. Gagiannis D, Gossrau R, Reutter W, Zimmermann-Kordmann M, Horstkorte R. Engineering the sialic acid in organs of mice using N-propanoylmannosamine. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1770(2):297-306.
128. Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1979;54(3):713-33.
129. Drexler HG, Quentmeier H, MacLeod RA, Uphoff CC, Hu ZB. Leukemia cell lines: in vitro models for the study of acute promyelocytic leukemia. *Leuk Res*. 1995;19(10):681-91.
130. Menezes J, Leibold W, Klein G, Clements G. Establishment and characterization of an Epstein-Barr virus (EBV)-negative lymphoblastoid B cell line (BJA-B) from an exceptional, EBV-genome-negative African Burkitt's lymphoma. *Biomedicine*. 1975;22(4):276-84.
131. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
132. Hara S, Takemori Y, Yamaguchi M, Nakamura M, Ohkura Y. Fluorometric high-performance liquid chromatography of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acids and its application to their microdetermination in human and animal sera, glycoproteins, and glycolipids. *Anal Biochem*. 1987;164(1):138-45.
133. Stehling P. *In vivo*-Modulation der Glycosylierung von Membranproteinen durch N-Propanoyl-D-mannosamin. Dissertation, Fachbereich Chemie, Freie Universität Berlin; 1998.
134. Fritsch M, Geilen CC, Reutter W. Determination of cytidine 5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid pool size in cell culture scale using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J Chromatogr A*. 1996;727(2):223-30.
135. Lomax JA, Conchie J. Separation of methylated alditol acetates by glass capillary gas chromatography and their identification by computer. *J Chromatogr*. 1982;236:385-94.
136. Hirschberg CB, Goodman SR, Green C. Sialic acid uptake by fibroblasts. *Biochemistry*. 1976;15(16):3591-9.
137. Herrmann M, von der Lieth CW, Stehling P, Reutter W, Pawlita M. Consequences of a subtle sialic acid modification on the murine polyomavirus receptor. *J Virol*. 1997;71(8):5922-31.

138. Tauber R, Park CS, Becker A, Geyer R, Reutter W. Rapid intramolecular turnover of N-linked glycans in plasma membrane glycoproteins. Extension of intramolecular turnover to the core sugars in plasma membrane glycoproteins of hepatoma. *Eur J Biochem.* 1989;186(1-2):55-62.
139. Pham ND, Fermaintt CS, Rodriguez AC, McCombs JE, Nischan N, Kohler JJ. Cellular metabolism of unnatural sialic acid precursors. *Glycoconj J.* 2015;32(7):515-29.
140. Hinderlich S, Berger M, Keppler OT, Pawlita M, Reutter W. Biosynthesis of N-acetylneuraminic acid in cells lacking UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *Biol Chem.* 2001;382(2):291-7.
141. Galuska SP, Geyer H, Weinhold B, Kontou M, Rohrich RC, Bernard U, Gerardy-Schahn R, Reutter W, Munster-Kuhnel A, Geyer R. Quantification of nucleotide-activated sialic acids by a combination of reduction and fluorescent labeling. *Anal Chem.* 2010;82(11):4591-8.
142. Yarema KJ, Goon S, Bertozzi CR. Metabolic selection of glycosylation defects in human cells. *Nat Biotechnol.* 2001;19(6):553-8.
143. Moller H, Bohrsch V, Lucka L, Hackenberger CP, Hinderlich S. Efficient metabolic oligosaccharide engineering of glycoproteins by UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) knock-down. *Mol Biosyst.* 2011;7(7):2245-51.
144. PAN Biotech. Produktübersicht serumfreie Systeme. (Abgerufen am 19. November 2015 unter <http://www.pan-biotech.de/de/serumfreie-systeme/produktuebersicht.html>).
145. Horstkorte R, Rau K, Reutter W, Nohring S, Lucka L. Increased expression of the selectin ligand sialyl-Lewis(x) by biochemical engineering of sialic acids. *Exp Cell Res.* 2004;295(2):549-54.
146. Horstkorte R, Muhlenhoff M, Reutter W, Nohring S, Zimmermann-Kordmann M, Gerardy-Schahn R. Selective inhibition of polysialyltransferase ST8SiaII by unnatural sialic acids. *Exp Cell Res.* 2004;298(1):268-74.
147. Higa HH, Paulson JC. Sialylation of glycoprotein oligosaccharides with N-acetyl-, N-glycolyl-, and N-O-diacetylneuraminic acids. *J Biol Chem.* 1985;260(15):8838-49.
148. Altheide TK, Hayakawa T, Mikkelsen TS, Diaz S, Varki N, Varki A. System-wide genomic and biochemical comparisons of sialic acid biology among primates and rodents: Evidence for two modes of rapid evolution. *J Biol Chem.* 2006;281(35):25689-702.
149. Reinke SO, Bayer M, Berger M, Hinderlich S, Blanchard V. The analysis of N-glycans of cell membrane proteins from human hematopoietic cell lines reveals distinctions in their pattern. *Biol Chem.* 2012;393(8):731-47.

150. Knibbs RN, Osborne SE, Glick GD, Goldstein IJ. Binding determinants of the sialic acid-specific lectin from the slug *Limax flavus*. *J Biol Chem*. 1993;268(25):18524-31.
151. Mantey LR, Keppler OT, Pawlita M, Reutter W, Hinderlich S. Efficient biochemical engineering of cellular sialic acids using an unphysiological sialic acid precursor in cells lacking UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase. *FEBS Lett*. 2001;503(1):80-4.
152. Keppler OT, Herrmann M, Oppenlander M, Meschede W, Pawlita M. Regulation of susceptibility and cell surface receptor for the B-lymphotropic papovavirus by N glycosylation. *J Virol*. 1994;68(11):6933-9.
153. Almaraz RT, Mathew MP, Tan E, Yarema KJ. Metabolic oligosaccharide engineering: implications for selectin-mediated adhesion and leukocyte extravasation. *Ann Biomed Eng*. 2012;40(4):806-15.
154. Kontou M, Bauer C, Reutter W, Horstkorte R. Sialic acid metabolism is involved in the regulation of gene expression during neuronal differentiation of PC12 cells. *Glycoconj J*. 2008;25(3):237-44.
155. Gross HJ. Fluorescent CMP-sialic acids as a tool to study the specificity of the CMP-sialic acid carrier and the glycoconjugate sialylation in permeabilized cells. *Eur J Biochem*. 1992;203(1-2):269-75.
156. Bork K, Horstkorte R, Weidemann W. Increasing the sialylation of therapeutic glycoproteins: the potential of the sialic acid biosynthetic pathway. *J Pharm Sci*. 2009;98(10):3499-508.
157. Zhou Q, Stefano JE, Manning C, Kyazike J, Chen B, Gianolio DA, Park A, Busch M, Bird J, Zheng X, Simonds-Mannes H, Kim J, Gregory RC, Miller RJ, Brondyk WH, Dhal PK, Pan CQ. Site-specific antibody-drug conjugation through glycoengineering. *Bioconj Chem*. 2014;25(3):510-20.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CMP-Neu5Ac	Cytidinmonophosphat- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure
Con A	Concanavalin A
CTP	Cytidintriphosphat
9-Desoxy-9-Iodo-Neu5Ac	5- <i>N</i> -Acetyl-9-desoxy-9-iodo-neuraminsäure
9-Desoxy-Neu5Ac	5- <i>N</i> -Acetyl-9-desoxy-neuraminsäure
DMB	1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzol
DMSO	Dimethylsulfoxid
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
5- <i>N</i> -Fluoroac-Neu	5- <i>N</i> -Fluoroacetylneuraminsäure
Fuc	Fucose
Gal	D-Galactose
Glc	D-Glucose
GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin
GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin
GlcNProp	<i>N</i> -Propanoyl-D-glucosamin
GNE	UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HPAEC	high performance anion exchange chromatography
HPLC	high performance liquid chromatography
KDN	2-Keto-3-desoxy-D-glycero-D-galacto-nononsäure
LFA	<i>Limax flavus</i> -Agglutinin
Man	D-Mannose
ManNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-mannosamin
ManNAz	<i>N</i> -Azidoacetyl-D-mannosamin
ManNBut	<i>N</i> -Butanoyl-D-mannosamin
ManNGc	<i>N</i> -Glycolyl-D-mannosamin
ManNLev	<i>N</i> -Levulinoyl-D-mannosamin
ManNPent	<i>N</i> -Pentanoyl-D-mannosamin
ManNProp	<i>N</i> -Propanoyl-D-mannosamin
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität

MOE	Metabolisches Oligosaccharid-Engineering
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	<i>N</i> -Glycolylneuraminsäure
Neu5Prop	<i>N</i> -Propanoylneuraminsäure
PAD	pulsed amperometric detection
PBS	phosphate buffered saline
PEP	Phosphoenolpyruvat
P _i	Orthophosphat
PNA	Peanut-Agglutinin
PP _i	Pyrophosphat
RP	reversed phase
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RRK	Relativer Retentionskoeffizient
RRT	Relative Retentionszeit
SBA	Soybean-Agglutinin
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TML	<i>Tritrichomonas mobilensis</i> -Agglutinin
5- <i>N</i> -Trifluoroac-Neu	5- <i>N</i> -Trifluoroacetylneuraminsäure
UDP	Uridindiphosphat
UDP-GlcNAc	UDP- <i>N</i> -Acetylglucosamin
VVA	<i>Vicia villosa</i> -Agglutinin

7.2 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lars Mantey, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „**Metabolisches Oligosaccharid-Engineering membrangebundener Sialinsäuren in hämatopoetischen Zellen**“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

7.3 Anteilserklärung Publikationen

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Lars Mantey hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Mantey LR, Keppler OT, Pawlita M, Reutter W, Hinderlich S.

Efficient biochemical engineering of cellular sialic acids using an unphysiological sialic acid precursor in cells lacking UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase.

FEBS Lett. 2001;503(1):80-4.

Beitrag im Einzelnen:

Etwa 85% der experimentellen Durchführung und Datenanalyse, Abbildungen, Mitwirkung am Manuskript.

Publikation 2:

Oetke C, Brossmer R, **Mantey LR**, Hinderlich S, Isecke R, Reutter W, Keppler OT, Pawlita M.

Versatile biosynthetic engineering of sialic acid in living cells using synthetic sialic acid analogues.

J Biol Chem. 2002;277(8):6688-95.

Beitrag im Einzelnen:

Experimentelle Durchführung der chromatographischen Analysen, Datenanalyse.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

7.4 Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

7.5 Publikationsliste

Originalartikel:

1. Penner J, **Mantey LR**, Elgavish S, Ghaderi D, Cirak S, Berger M, Krause S, Lucka L, Voit T, Mitrani-Rosenbaum S, Hinderlich S. Influence of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase mutant proteins on hereditary inclusion body myopathy. *Biochemistry*. 2006;45(9):2968-77.
2. Hinderlich S, Salama I, Eisenberg I, Potikha T, **Mantey LR**, Yarema KJ, Horstkorte R, Argov Z, Sadeh M, Reutter W, Mitrani-Rosenbaum S. The homozygous M712T mutation of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase results in reduced enzyme activities but not in altered overall cellular sialylation in hereditary inclusion body myopathy. *FEBS Lett*. 2004;566(1-3):105-9.
3. Oetke C, Brossmer R, **Mantey LR**, Hinderlich S, Isecke R, Reutter W, Keppler OT, Pawlita M. Versatile biosynthetic engineering of sialic acid in living cells using synthetic sialic acid analogues. *J Biol Chem*. 2002;277(8):6688-95.
4. **Mantey LR**, Keppler OT, Pawlita M, Reutter W, Hinderlich S. Efficient biochemical engineering of cellular sialic acids using an unphysiological sialic acid precursor in cells lacking UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase. *FEBS Lett*. 2001;503(1):80-4.
5. Horstkorte R, Lee HY, Lucka L, Danker K, **Mantey L**, Reutter W. Biochemical engineering of the side chain of sialic acids increases the biological stability of the highly sialylated cell adhesion molecule CEACAM1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;283(1):31-5.

Abstracts/Poster:

1. **Mantey LR**, Reutter W, Hinderlich S. Biochemical engineering of sialyl-Lewis X (CD15s) epitopes on hematopoietic cells by the unphysiological metabolic precursor *N*-propanoylmannosamine. Cellular Interactions in the Immune System, 2nd Joint UK/German Adhesion Meeting, 10. Jahrestagung des Arbeitskreises Adhäsion in der Dt. Ges. f. Immunologie, 2002, Berlin, Germany.
2. Oetke C, Brossmer R, **Mantey LR**, Hinderlich S, Reutter W, Keppler OT, Pawlita M. Uptake and metabolic incorporation of unnatural sialic acids by eukaryotic cells. XVIth International Symposium on Glycoconjugates. 2001, Den Haag, Netherlands.
3. **Mantey LR**, Hinderlich S, Reutter W. Biochemical engineering of cell surface sialic acids by the unnatural metabolic precursor *N*-propanoylmannosamine. *Jahrbuch des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität Berlin*, 2000, 314.

4. Hinderlich S, Keppler OT, Berger M, **Mantey LR**, Pawlita M, Reutter W. Consequences of the loss of UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase, the key enzyme of sialic acid biosynthesis, in cells. Abstracts of the 20th International Carbohydrate Symposium, 2000, Hamburg, Germany.
5. Hinderlich S, Keppler OT, Berger M, **Mantey LR**, Pawlita M, Reutter W. Metabolisation of *N*-acetylmannosamine and *N*-propanoylmannosamine to sialic acids in cells lacking UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase. *Glycobiology*. 2000,10:1080.
6. **Mantey L**, Hinderlich S, Reutter W. Biochemical engineering of cell surface sialic acids on hematopoietic cells by the unphysiological metabolic precursor *N*-propanoylmannosamine. Fall Meeting of German Society of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology and Sixth International Colloquium on Cellular Signal Recognition and Transduction, 2000, Berlin, Germany.
7. Bermpohl F, Baum O, Löster K, **Mantey L**, Reutter W. Rat kidney dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) exhibits endopeptidase activity digesting collagen. Third International Colloquium on Cellular Signal Recognition and Transduction, 1997, Berlin, Germany.

7.6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Werner Reutter für die Möglichkeit, diese Dissertation unter seiner wissenschaftlichen Leitung anfertigen zu dürfen, seiner jahrelangen wohlwollenden Unterstützung und seinem Interesse am Fortgang des Projektes. Seinem Verständnis und seinem freundlichen aber beharrlichen Drängen ist es zu verdanken, dass diese Arbeit doch noch zum Abschluss gekommen ist.

Meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Stephan Hinderlich danke ich für seine Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und für die mir überlassenen Freiräume, eigene Ideen umzusetzen, sowie seine stete Bereitschaft zur Diskussion der Ergebnisse. Vor allem für seine großartige Unterstützung beim Abschluss dieser Arbeit möchte ich mich bei ihm bedanken.

Herrn Dr. Peer Stehling danke ich für die Einführung in die HPLC-Technik und für seine Hilfe bei der Fehlersuche auch aus großer Ferne.

Herrn Dr. Martin Zimmermann-Kordmann danke ich für viele anregende und erhellende Diskussionen über Sialinsäuren und darüber hinaus. Bei Herrn Detlef Grunow möchte ich mich für seine Unterstützung bei technischen Problemen rund um die HPLC und anderer Geräte bedanken. Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Reutter bedanke ich mich für das gute Arbeitsklima, für ihre Hilfsbereitschaft bei allen kleineren und größeren Problemen im Laboralltag sowie für viele gemeinsame fröhliche Stunden außerhalb des Labors.

Ich danke Frau Dr. Cornelia Oetke und Herrn Dr. Michael Pawlita vom DKFZ für die interessante und fruchtbare Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt PD Dr. Oli Baum für seine freundschaftliche Unterstützung und vielen guten Ratschläge bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Guido Wollmann danke ich für unsere langjährige Freundschaft, die ihren Ursprung in der Frage nach dem Warum hat, sowie für seine technische Hilfe und seine humorvolle Anteilnahme in den letzten Monaten.

Meiner Frau Piroshka danke ich für ihre jahrelange, liebevolle Unterstützung vor allem jenseits dieser Arbeit. Meinen Kindern Lasse und Julina danke ich für ihre tägliche Erinnerung, die Welt mit offenen Augen zu betrachten.