

### 3.3. Supplementation mit 2-Desoxy-D-galactose

Die Modifikation von proteingebundenen Glykanen war das wesentliche Ziel dieser Arbeit. Hierfür wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Die Veränderung sollten innerhalb des Oligosaccharides an der

1. subterminalen Galactose oder der
2. terminalen Sialinsäure erfolgen.

Mit der Verwendung der 2-Desoxy-D-galactose (2dGal) wurde *in vitro* ein mindestens partieller Austausch gegen die Galactose in den Glykanen angestrebt. Die isolierten Oligosaccharide sollten auf veränderte Eigenschaften gegenüber der Behandlung mit Sialidasen untersucht werden. Eine geringere Aktivität des Enzyms würde eine verlängerte Phase des Glykans im sialylierten Zustand und *in vivo* eine Verhinderung einer Bindung an den Asialo-Glykoprotein-Rezeptor (ASGPR) bedeuten. Das Resultat wäre eine längere Halbwertszeit des Glykoproteins im Organismus.

#### 3.3.1. Zellkultur

Die CHO-, HEK293- und K-562-Zellen wurden in den ersten Versuchen mit unterschiedlichen Konzentrationen der 2dGal behandelt, um die Vitalität und einen nachweisbaren Einbau zu testen. Die Dosis-abhängige Inkorporation von 2dGal in die Glykane wurde mittels HPLC analysiert und führte zu der Festlegung der minimalen Inkubationskonzentration von 0,05 mM. Ab einer Konzentration von 0,5 mM war jedoch ein deutlicher Rückgang der Zellzahl messbar (Daten nicht gezeigt), so dass dies als Obergrenze festgelegt wurde. Als Kontrollen wurden un-supplementierte Zellen und Kulturen unter Zugabe von 0,5 mM Galactose verwendet.

Mit zunehmender 2dGal-Konzentration war die Verringerung von Zellaggregaten, eine erhöhte Zelladhäsion an der Kulturgefäßmatrix, sowie eine konvexe Morphologie zu beobachten. Zusätzlich zeigte das Medium ein schnelleres Absinken des pH-Wertes.

#### 3.3.2. Nachweis des Einbaus der 2-Desoxy-D-galactose

Die Voraussetzung für die weiteren Untersuchungen mittels Sialidase und für die Optimierung der Zellkulturbedingungen ist der erfolgreiche Einbau in Glykane. Die primäre Methode zur Quantifizierung der Glykanbestandteile war die HPAED-PAD, eine Anionenaustauscher-HPLC. Als Ausgangsproben dienten Rohmembranpräparationen der behandelten Zellen, welche mit Trypsin und PNGase F behandelt wurden. Die Überstände der so gewonnenen Glykane wurden hydrolysiert und die freigesetzten Monosaccharide auf einer Säule aufgetrennt. Die Glykan-

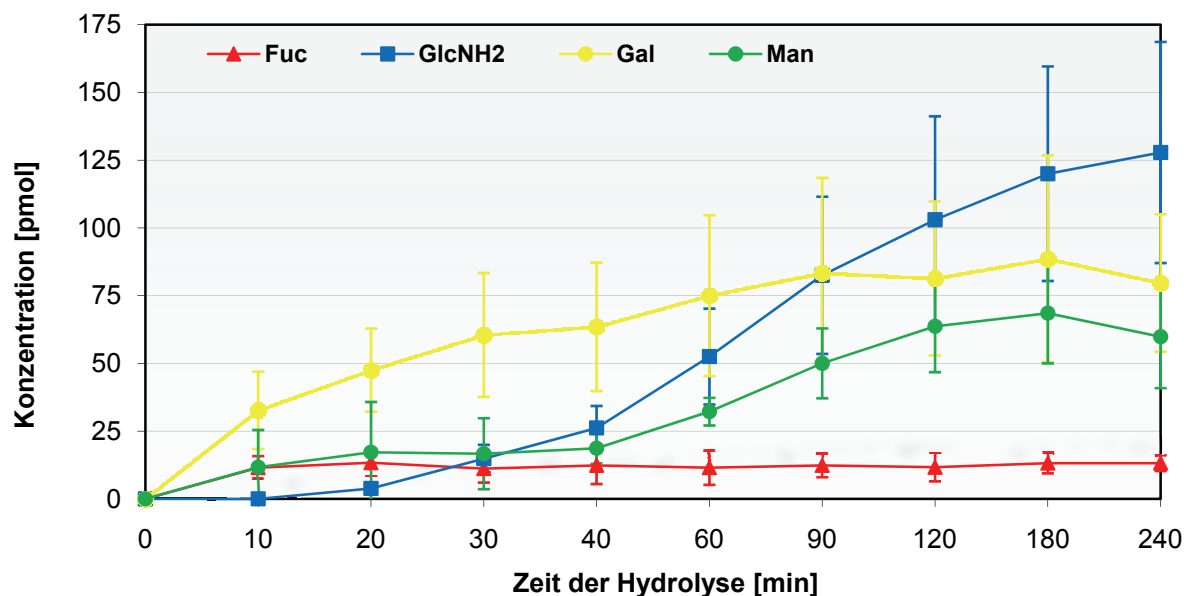
Komponenten GlcNAc und GalNAc verlieren bei der Hydrolyse die Acetylierung und sind deshalb nur als deren Amine (GlcNH<sub>2</sub>, GalNH<sub>2</sub>) nachweisbar.

Die ersten Supplementationen wiesen in den HPLC-Messungen kein Vorkommen von 2dGal auf, was durch die gewählten Bedingungen begründet sein könnte. Jedoch zeigten spätere massenspektrometrische Analysen dieser Proben einen Einbau. Bereits veröffentlichte Daten anderer Arbeiten (Schmidt *et al.*, 1974; Schmidt *et al.*, 1974; Büchsel *et al.*, 1980) verwiesen auf eine höhere Instabilität der 2dGal im Vergleich zu den natürlich vorkommenden Monosacchariden. Da die 2dGal nicht unter den Standardbedingungen nachgewiesen werden konnte, war eine andere Methode oder die Modifikation der bestehenden notwendig.

Für die Quantifizierung von Monosacchariden ist die HPAEC-PAD der internationale Standard (Hardy *et al.*, 1988; Andersen & Sorensen, 2000) und die Referenzmethode zu anderen Versuchen dieser Arbeit. Geräte für die Monosaccharid-Charakterisierung mittels der in anderen Arbeiten verwendeten GC-Methode (Geilen *et al.*, 1992; Kannicht, 1995) waren in der Arbeitsgruppe nicht vorhanden.

Somit musste die bisherige Methode für den 2dGal-Nachweis optimiert werden. Hierzu wurden verschiedene Hydrolyse-Bedingungen mit variierender TFA-Konzentration und Zeitabhängigkeiten getestet (Daten nicht gezeigt). Das Resultat für den Nachweis der 2dGal war die Hydrolyse mit 0,25 N TFA für 25 min bei 100°C. Der gemessene Wert bei einer Ausgangsmenge von 250 pmol 2dGal lag nach dieser Hydrolyse bei 169,2 pmol (Trendlinienfunktion  $y=250*0.98450277^x$ ) und entsprach somit einem Verlust von 32,4 %. Diese Differenz musste bei anschließenden Messungen in die Quantifizierung einbezogen werden. Für die vollständige Beurteilung der Monosaccharid-Zusammensetzung von Glykanen aus 2dGal-behandelten Zellen wurde sowohl die Standardmethode (2 N TFA, 4 h, 100°C), als auch die modifizierte Variante angewandt, da die anderen Glykan-Komponenten unter den neuen milderen Bedingungen nicht ausreichend freigesetzt werden. Das bedeutet, dass bei der Durchführung von Doppelbestimmungen 4 HPLC-Läufe je Probe notwendig sind.

Diese Methode stellte keine absolute Quantifizierung, sondern einen Vergleich der Monosaccharid-Zusammensetzung zwischen Proben dar. In der Abbildung 43 ist ersichtlich, dass die hydrolytische Freisetzung der Galactose nach 25 min unter Standardbedingungen nicht abgeschlossen ist, d.h. bei einem Austausch gegen 2dGal wird diese vermutlich nicht vollständig freigesetzt. Aufgrund der Instabilität wurden Bedingungen gewählt, die einen Nachweis ermöglichen und, durch den Vergleich mit den Galactose-Daten aus der Standard-Hydrolyse, die Verhältnisse beider Moleküle aufzeigen.



**Abbildung 43: Zeitabhängige Hydrolyse von AGP zum Nachweis der Monosaccharid-Abspaltung**  
Die Freisetzung unterscheidet sich zwischen den Komponenten und ist abhängig von der Position innerhalb der Glykan-Struktur. Analyse mittels HPAEC-PAD-HPLC

Der Nachweis der 2dGal war mit modifizierten Bedingungen möglich und musste für eine vollständige Analyse der anderen Monosaccharide durch eine zusätzliche Hydrolyse unter Standardbedingungen ergänzt werden.

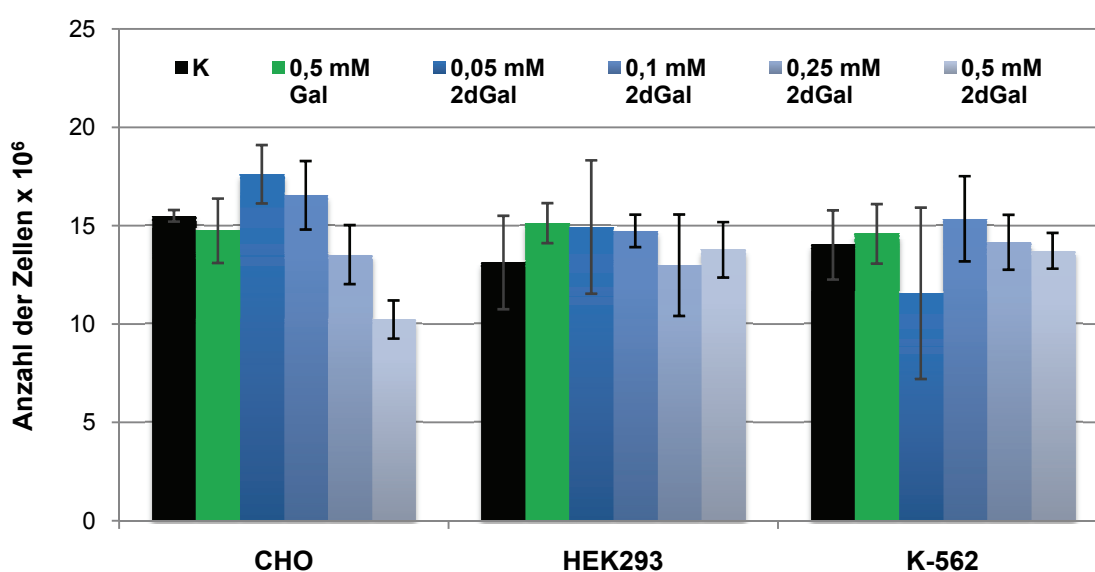
### 3.3.3. 2-Desoxy-D-galactose in Glykanen verschiedener Zelllinien

Die Versuche zum 2dGal-Einbau wurden in verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Die etablierten CHO-Zellen stellten die Referenz für die Zellkultur dar. Im Hinblick auf pharmazeutische Anwendungen wurden auch humane Zelllinien verwendet. Hierfür dienen HEK293- und K-562. Diese drei Zelllinien wurden entsprechend den Vorgaben (s. 2.4.2) und mit 2dGal (0,05; 0,1; 0,25 und 0,5 mM) verwendet. Die Zellen ohne Supplementation und mit 0,5 mM Gal stellten Kontrollen dar. Das Ausgangsmaterial wurde nach vier Tagen (Daten zu Zellkultur-Optimierung nicht gezeigt) aus 40 ml Kulturvolumen gewonnen (entspricht ca.  $1-2 \times 10^7$  Zellen) und diente Membranprotein-Isolierung der Bestimmung der Monosaccharid-Zusammensetzung (neutral und geladen), der Proteinbestimmung und der Zellzahl. In Abhängigkeit von der Probe waren ca. 1/8 für die TFA-Hydrolyse, 1/40 für die BCA-Bestimmung, 1/80 für die Sialinsäure-Quantifizierung und mindestens 50% der Probe zur MS-Analyse zu verwenden. Für die aufgeführten Auswertungen wurden mindestens drei, maximal sechs unabhängige Supplementationen durchgeführt und jede Probe doppelt bestimmt.

### 3.3.3.1. Nachweis der 2-Desoxy-D-galactose mittels HPLC

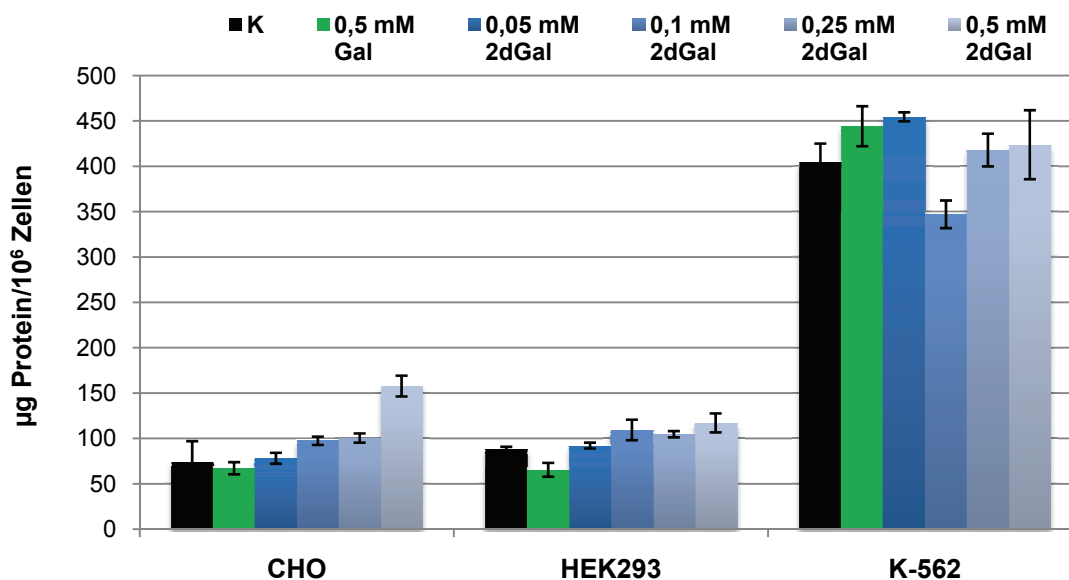
Für den Vergleich zwischen den verschiedenen Zelllinien, bzw. auch innerhalb der Versuchsreihen, musste die vorhandene 2dGal detektiert und quantifiziert werden. Die möglichen Veränderungen der anderen Glykan-Komponenten waren ebenfalls von Interesse und wurden in der Auswertung einbezogen. Die Resultate der HPAED-PAD-HPLC führten, unter den bereits geschilderten Bedingungen (S. 88), innerhalb einer Supplementationsreihe zu einer methodischen Standardabweichung der Quantifizierung von maximal 4% für jede der drei Zelllinien (Daten nicht gezeigt). Unter Einbezug verschiedener Zellkultur-Ansätze stiegen diese Werte deutlich an, d.h. es kam zu Veränderungen in der Glykosylierung. Diese verhält sich in Zellen sehr sensitiv gegenüber vielen externen und internen Faktoren, so dass hier der größte Einfluss auf Abweichungen innerhalb der Versuche zu beobachten war.

Für den absoluten Vergleich von Proben mussten diese anhand einer Bezugsgröße ausgewertet werden. Hierfür wurden die Zellzahl und die Proteinmenge (nach Trypsin-Verdau) bestimmt. Die genaueste Aussage wäre über die Relationen von 2dGal bzw. Gal zu einem der anderen Monosaccharide in Glykanen möglich. Jedoch zeigen die HPAEC-PAD-Ergebnisse Veränderungen bei allen Komponenten. So kann beispielweise Mannose nicht als interner Standard verwendet werden, da deren Konzentration und das Verhältnis zum GlcNAc (bestimmt den Anteil an Mannose-reichen Strukturen) in den einzelnen Proben unterschiedlich ist. In der Abbildung 44 sind die Zellzahlen der verschiedenen Supplementationen mit der 2dGal dargestellt. Generell nimmt die Zellzahl mit höherer 2dGal-Konzentration ab. Dies ist am stärksten bei den CHO-Zellen ausgeprägt.



**Abbildung 44: Veränderung der Zellzahl bei den 2dGal-Supplementationen der Zelllinien CHO, HEK293 und K-562** K=un-supplementierte Kontrolle, Gal=Galactose, 2dGal=2-Desoxygalactose

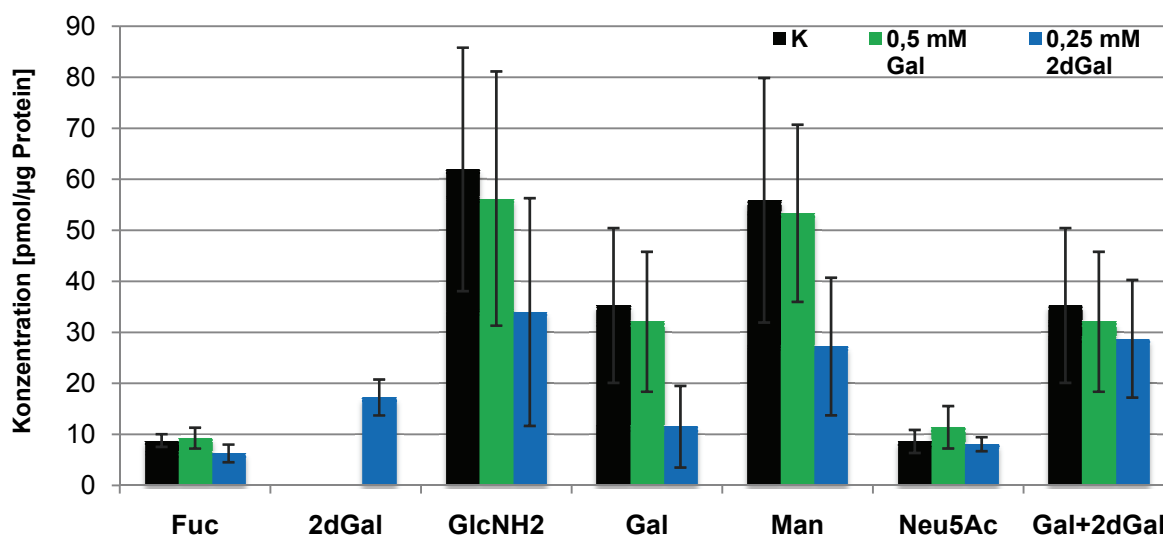
Im Gegensatz dazu steigt die Proteinmenge des Rohmembranisolates. Die beiden möglichen Bezugsparameter für die Quantifizierung der 2dGal zeigen somit ein unterschiedliches Verhalten.



**Abbildung 45: Proteinmenge in Rohmembranisolaten der Zelllinien CHO, HEK293 und K-562 bezogen auf  $10^6$  Zellen** K=unsupplementierte Kontrolle, Gal=Galactose, 2dGal=2-Desoxygalactose; BCA-Bestimmung

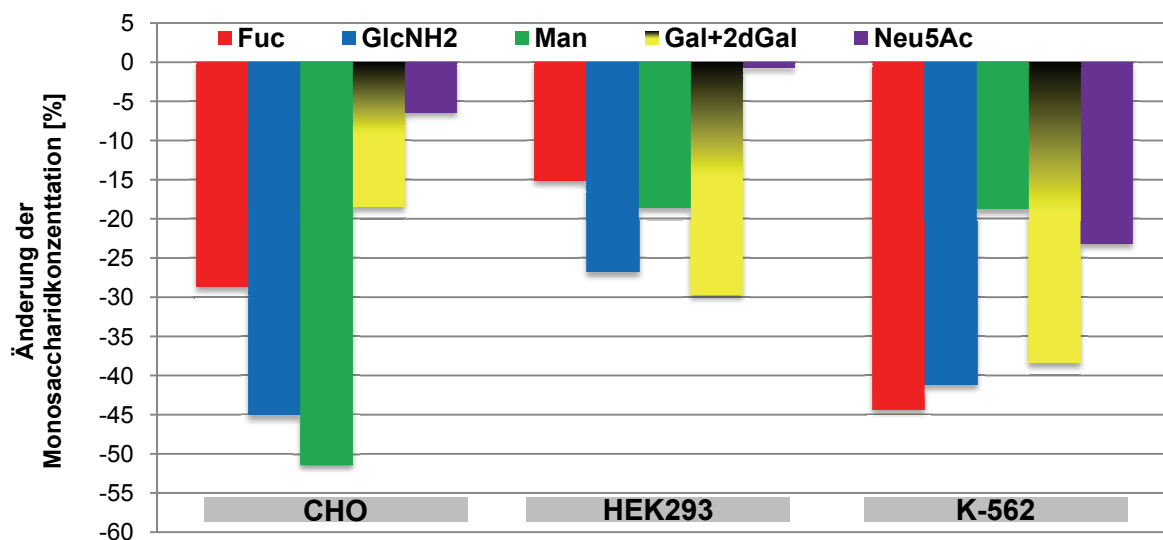
Diese Befunde weisen auf einen erhöhten Anteil an Membranproteinen hin, so dass theoretisch auch ein Anstieg der Glykanmenge möglich wäre. Die Bestimmung der Monosaccharid-Anteile und der Bezug auf den Proteingehalt sollte dieses klären. Als Vergleichsgrundlage für die weiteren dargestellten Ergebnisse wurde die mit der BCA-Methode nachgewiesene Proteinmenge nach Rohmembranpräparation verwendet. In dem Versuchsablauf wurden diese Werte als späteste der Bezugsgrößen gewonnen und sollten somit die geringsten Abweichungen verursachen. Da jede Proben-Präparation, Glykan-Isolierung und Aufreinigung eigene Fehlerquellen beinhaltet, musste deren Anzahl für Probenvergleiche gering gehalten werden. Nach den Vorversuchen des 2dGal-Einbaus ergab sich 0,25 mM als optimale Konzentration. Aus diesem Grund wurden zur erleichterten Übersicht in den nachfolgenden Darstellungen keine weiteren der verwendeten Konzentrationen mit aufgeführt.

Die Abbildung 46 zeigt den Nachweis von 2dGal in isolierten N-Glykanen aus CHO-Zellen. Jedes neutrale Monosaccharid nahm bei Supplementierung mit 2dGal ab, war jedoch für Neu5Ac nur schwach ausgeprägt. Dieses Resultat und die gleichzeitige Tendenz zur Erhöhung der Proteinmenge weist auf eine verringerte Glykosylierung in den Zellen hin.



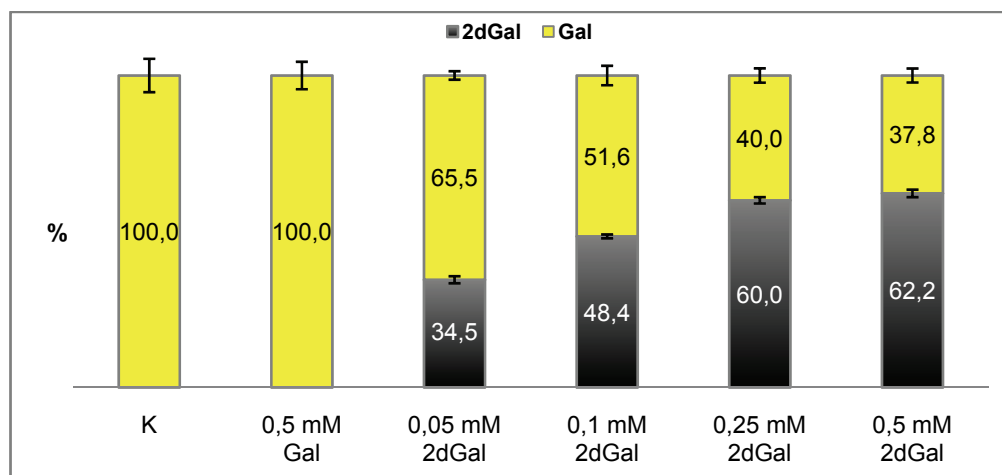
**Abbildung 46: Monosaccharid-Konzentrationen ohne/mit Supplementation (K/2dGal bzw. Gal) in den Glykanen aus CHO-Zellen** Die Daten ergeben sich aus den Quantifizierungen der Monosaccharide im Verhältnis zur Proteinmenge im Isolat der Rohmembranpräparation, K= un-supplementierte Kontrolle, Gal=Galactose, 2dGal=2-Desoxygalactose, GlcNH<sub>2</sub>=GlcNAc nach der Hydrolyse, Bestimmung mittels HPLC

Die Abnahme scheint für jedes der Monosaccharide ähnlich zu sein, so dass diese HPLC-Ergebnisse keinen Hinweis auf qualitative Veränderungen der Strukturen geben. Für einen besseren Vergleich der Zelllinien sind die prozentualen Veränderungen in der Abbildung 48 dargestellt.



**Abbildung 47: Prozentuale Veränderungen der Monosaccharid-Konzentrationen in den Glykanen der Zelllinien CHO, HEK293 und K562-Zellen mit 0,25 mM 2dGal im Medium im Vergleich zur un-supplementierten Kontrolle** Die Änderungen ergeben sich aus Daten der Quantifizierungen der Monosaccharide im Verhältnis zur Proteinmenge im Isolat der Rohmembranpräparation, K= un-supplementierte Kontrolle, Gal=Galactose, 2dGal=2-Desoxygalactose, GlcNH<sub>2</sub>=GlcNAc nach der Hydrolyse, Bestimmung mittels HPLC

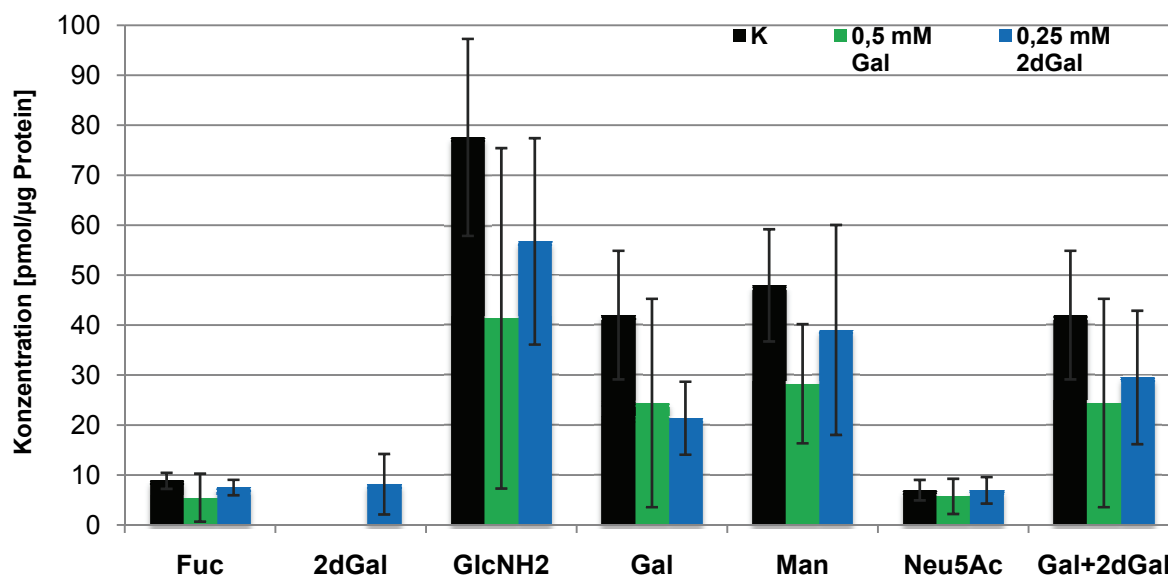
Der prozentuale Einbau der 2dGal in CHO-Zellen ist in der Abbildung 48 zu erkennen und steigt mit der Analogon-Konzentration.



**Abbildung 48: Prozentuale Anteile von 2dGal und Gal an Gesamt-Galactosen nach Supplementation von CHO-Zellen** Die Daten ergeben sich nach Quantifizierung der Monosaccharide im Verhältnis zur Proteinmenge im Isolat der Rohmembranpräparation. Die daraus resultierenden Anteile von 2dGal und Gal an deren Summe sind prozentual wiedergegeben, K= un-supplementierte Kontrolle, Gal=Galactose, 2dGal=2-Desoxygalactose

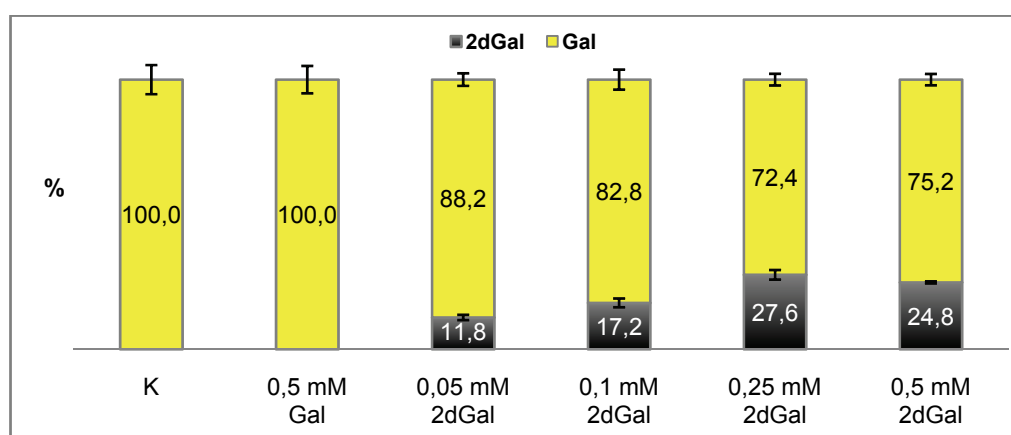
Gleichzeitig kommt es zu einem geringeren Gal-Anteil, welches für einen Austausch und nicht nur für einen zusätzlichen Einbau spricht. Die Abnahme der Summe aus den absoluten Mengen aus 2dGal+Gal ist im Vergleich zu GlcNAc, Man, und Gal geringer. Somit fand in den CHO-Zellen nicht nur ein partieller Austausch der Hexose gegen die Desoxyhexose (über 60%), sondern, trotz geringerer Gesamt-Glykosylierung, auch eine erhöhte Galactosylierung statt (Abbildung 47). Diese Feststellung ist innerhalb der 2dGal-Probe, jedoch nicht auf den Vergleich mit den Monosaccharid-Konzentrationen der un-supplementierten Probe anwendbar. Die isolierten Glykane enthielten somit die erwünschte Modifikation durch den 2dGal-Einbau und konnten für Sialidase-Experimente eingesetzt werden.

Dieses war auch bei den HEK293-Zellen zu beobachten. Die Quantifizierung mittels HPLC zeigte die Anwesenheit der 2-Desoxy-D-galactose in den Oligosacchariden und Veränderungen der anderen Glykan-Bausteine (Abbildung 49). Die Supplementation bewirkt auch bei den HEK293-Zellen eine Tendenz zur Verringerung der Glykosylierung. Im Vergleich zu den CHO-Zellen ist die Galactosylierung in Bezug auf die Kontrolle nicht erhöht. Außerdem fällt die Differenz der Reduktion der Mannose zum GlcNAc geringer aus, die einen Hinweis auf eine verstärkte Bildung von Mannose-reichen Strukturen darstellen könnte.



**Abbildung 49: Monosaccharid-Konzentrationen ohne/mit Supplementation (K/2dGal bzw. Gal) in den Glykanen aus HEK293-Zellen** Die Daten ergeben sich aus den Quantifizierungen der Monosaccharide im Verhältnis zur Proteinmenge im Isolat der Rohmembranpräparation, K= unsupplementierte Kontrolle, Gal=Galactose, 2dGal=2-Desoxygalactose, GlcNH<sub>2</sub>=GlcNAc nach der Hydrolyse, Bestimmung mittels HPLC

Die reduzierte Bildung von komplexen Glykan-Strukturen führt zu einer verminderten Zahl an möglichen Sialylierungsstellen, so dass die Untersuchungen mit Sialidasen eine größere Menge an Probe benötigen könnten. In der Abbildung 50 sind die Einbauraten der 2dGal als prozentualer Anteil in der Aufsummierung der Konzentrationen von 2dGal und Gal gegenüber der bestimmten Proteinmenge dargestellt.

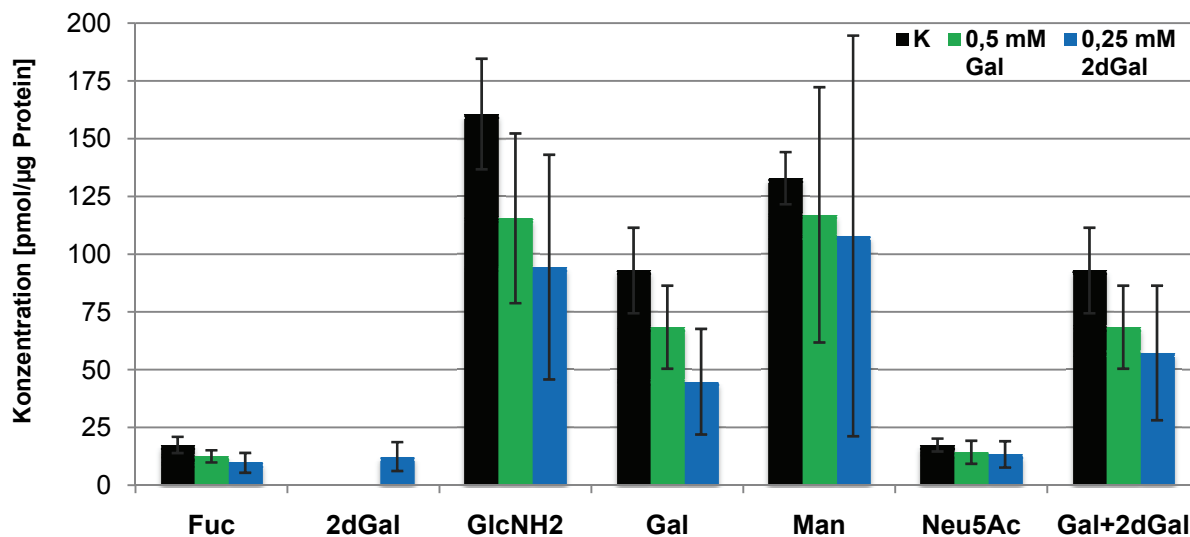


**Abbildung 50: Prozentuale Anteile von 2dGal und Gal an Gesamt-Galactosen nach Supplementation von HEK293-Zellen** Die Daten ergeben sich nach Quantifizierung der Monosaccharide im Verhältnis zur Proteinmenge im Isolat der Rohmembranpräparation. Die daraus resultierenden Anteile von 2dGal und Gal an deren Summe sind prozentual wiedergegeben, K= unsupplementierte Kontrolle, Gal=Galactose, 2dGal=2-Desoxygalactose

Mit einem Anteil von max. 28 % beträgt der Einbau der 2dGal nur 50% der in den CHO-Zellen ermittelten Resultate.

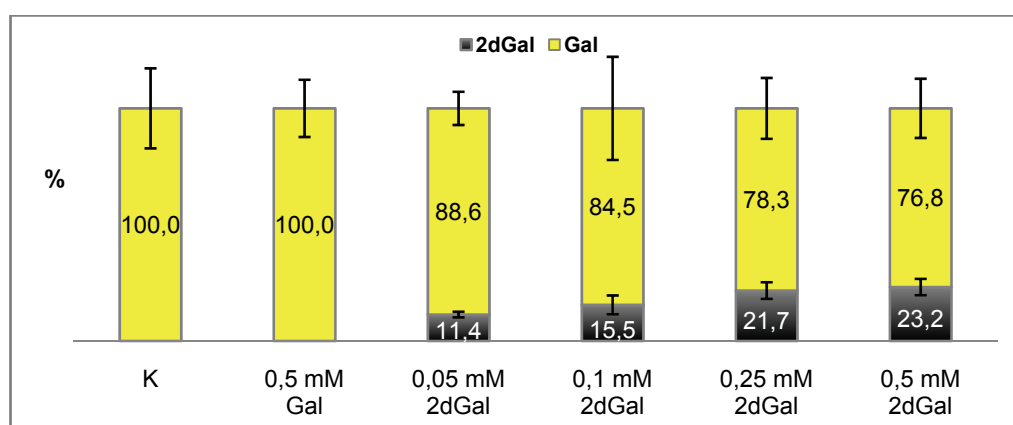


Die humane semi-adhärenzte Zelllinie K-562 war Grundlage für die Versuche zur Optimierung der Hydrolyse-Bedingungen und der Rohmembranpräparationen. Die ermittelten Daten aus der Monosaccharidanalyse sind in der Abbildung 51 dargestellt und zeigen den Einbau der 2dGal.



**Abbildung 51: Monosaccharid-Konzentrationen ohne/mit Supplementation (K/2dGal bzw. Gal) in den Glykanen aus K562-Zellen** Die Daten ergeben sich aus den Quantifizierungen der Monosaccharide im Verhältnis zur Proteinmenge im Isolat der Rohmembranpräparation, K= un-supplementierte Kontrolle, Gal=Galactose, 2dGal=2-Desoxygalactose, GlcNH2=GlcNAc nach der Hydrolyse, Bestimmung mittels HPLC

Die 2dGal-Supplementation führt wie bei CHO und K-562 zu einer geringeren Glykosylierung. Die Erhöhung des Mannose-Gehaltes lässt auf einen gesteigerten Anteil an Mannose-reichen Strukturen schließen. 2-Desoxy-D-galactose weist eine maximale Einbaurrate von 23 % auf (Abbildung 52) und liegt somit im Bereich der HEK293-Zellen.

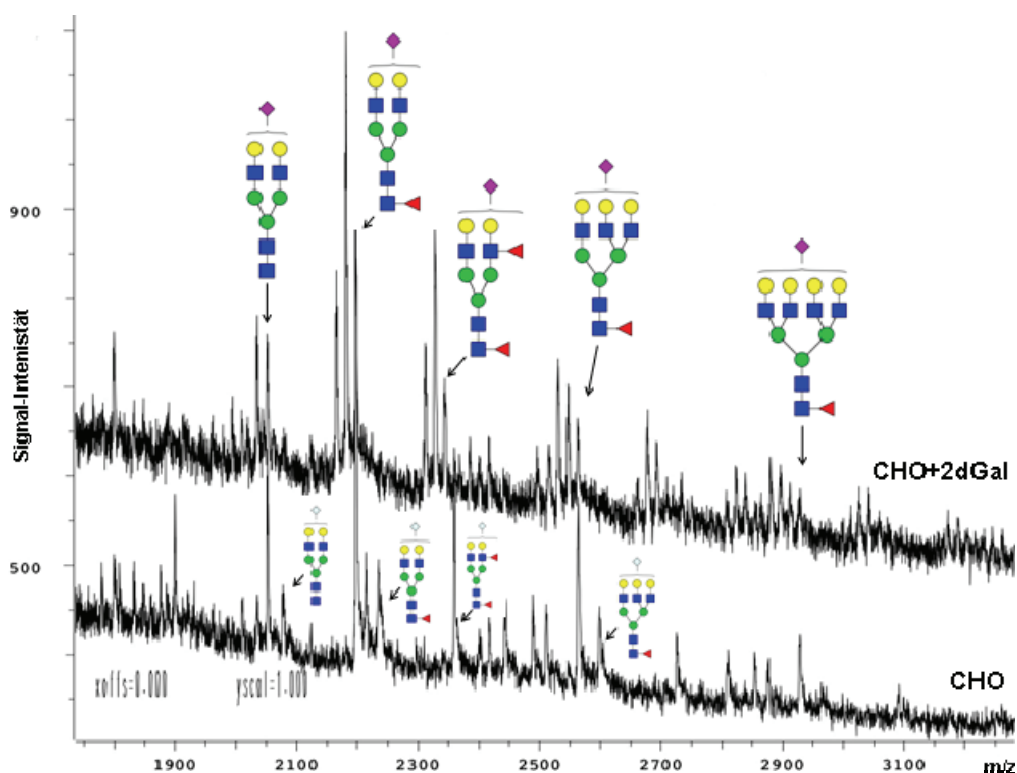


**Abbildung 52: Prozentuale Anteile von 2dGal und Gal an Gesamt-Galactosen nach Supplementation von K-562-Zellen** Die Daten ergeben sich nach Quantifizierung der Monosaccharide im Verhältnis zur Proteinmenge im Isolat der Rohmembranpräparation. Die daraus resultierenden Anteile von 2dGal und Gal an deren Summe sind prozentual wiedergegeben, K= un-supplementierte Kontrolle, Gal=Galactose, 2dGal=2-Desoxygalactose

Die Quantifizierungen der Monosaccharide in den Glykanen von CHO, HEK293 und K-562 ergaben deren generelle Abnahme mit zunehmender 2dGal-Supplementation. Ihr Einbau erreichte bis zu 62 % in CHO, 28 % in HEK293 und 23 % in K-562 des Gesamtgehaltes an Galactosen. Die optimale Einbaurrate für die Zellen wurde für nachfolgende Sialidase-Experimente mit 0,25 mM festgelegt und die Kulturen nach vier Tagen geerntet. Weiterhin stiegen mit der 2dGal-Konzentration auch die bestimmten Proteinmengen in den Rohmembran-Isolaten und es konnten Zelllinien-spezifische Veränderungen gemessen werden (erhöhte Galactosylierung im Vergleich zur Reduzierung der anderen Monosaccharide in CHO, Anstieg des Mannose-Gehaltes in HEK293 und K562). Nach der quantitativen Analyse sollten die Proben auch im Hinblick auf die vollständige Glykan-Struktur mittels Massenspektrometrie untersucht werden.

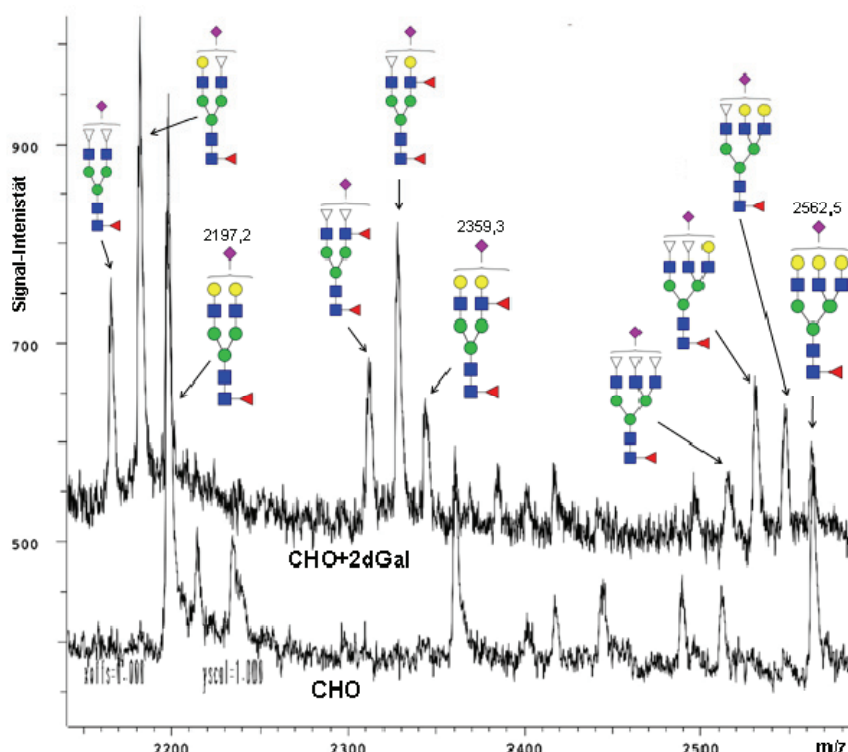
### 3.3.3.2. Massenspektrometrische Analyse

Ein wichtiger qualitativer Nachweis von Glykanen war die Massenspektrometrie. Mit dieser sollte wiederum der Einbau der 2-Desoxy-galactose im Glykan nachgewiesen werden. Weiterhin war die Charakterisierung der Oligosaccharide durchzuführen, um Kenntnisse über die Strukturen zu erlangen, die für die Sialidase-Behandlungen verwendet wurden. Nach Isolierung und Entsalzung der Glykane können diese, direkt oder nach Modifikationen, im Gerät analysiert werden. In der Abbildung 53 ist ein Spektrum zum Vergleich von CHO-Proben ohne und mit Supplementation dargestellt.



**Abbildung 53:** MALDI-TOF-MS-Spektrum (Biflex) zum Vergleich von 2AB-markierten CHO-Glykanen ohne/mit 2dGal aus der A1-Fraktion der Asahipak-HPLC Messung im negativen Modus mit Matrix ATT; die Positionen von Neu5Ac, Fuc und Neu5Gc innerhalb der Strukturen sind nicht nachgewiesen

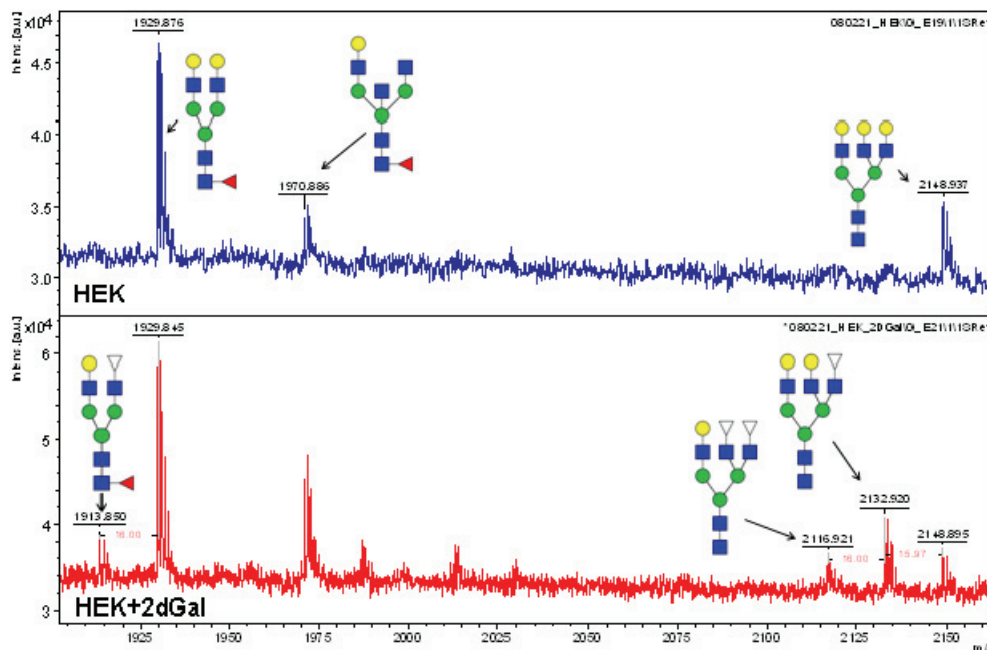
Die Glykane wurden vor der Messung mittels HPLC nach Anzahl ihrer geladenen Monosaccharide (Neu5Ac, Neu5Gc) aufgetrennt und der monosialylierte Anteil (A1) mit dem MALDI-TOF-Massenspektrometer vermessen. Da der Unterschied von 2dGal zu Gal in einer fehlenden Hydroxyl-Gruppe beruht, war bei einem Austausch eines Moleküls in der Glykan-Struktur ein Unterschied eines Sauerstoff-Atoms zu erwarten (Ordnungszahl O = 16). Unter Anwesenheit der 2dGal treten deshalb zusätzliche Signale auf mit einer Massendifferenz von 16 u auf. Im Spektrum ist dies für verschiedene Glykane und auch mit mehrfachem Austausch erkennbar. Einen vergrößerten Ausschnitt des Spektrums zeigt die Abbildung 54.



**Abbildung 54:** MALDI-TOF-MS-Spektrum (Biflex) zum Vergleich von 2AB-markierten CHO-Glykanen ohne/mit 2dGal aus der A1-Fraktion der Asahipak-HPLC Messung im negativen Modus mit Matrix ATT; die Positionen von Neu5Ac und Fuc innerhalb der Strukturen sind nicht nachgewiesen

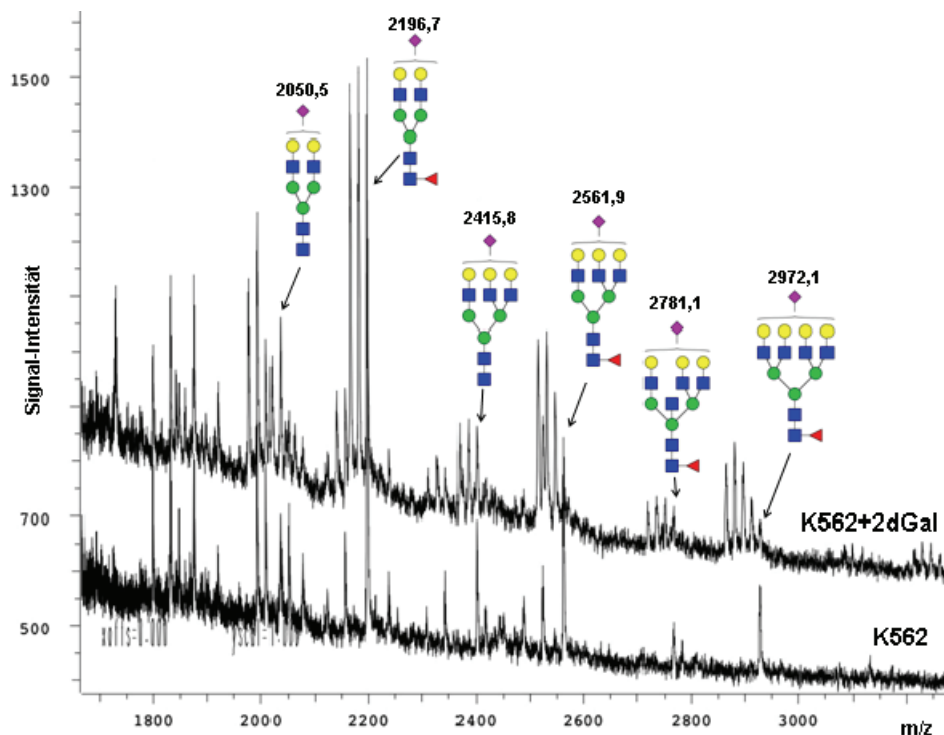
In den Glykanen der supplementierten CHO-Zellen fällt das Fehlen bzw. die starke Reduktion der Strukturen mit Neu5Gc auf. Diese Sialinsäure ist bei gesunden humanen Zellen nicht zu finden und spielt eine wichtige Rolle für die Verträglichkeit von glykosylierten Pharmazeutika.

In den HEK293-Zellen war der Einbau der 2dGal ebenfalls nachweisbar. In Abbildung 55 ist ein Spektren-Vergleich der desialylierten A1- und A2-Fractionen einer HPLC-Analyse von 2AB-markierten N-Glykanen ohne bzw. mit 2dGal-Supplementation dargestellt. Sowohl die biantennäre, als auch die triantennäre Struktur liegt in modifizierter Form vor. Die Differenzen von 16 u bei der Probe in 2dGal-Anwesenheit in der Zellkultur weisen auf einen Austausch von Gal gegen 2dGal innerhalb der Struktur hin.



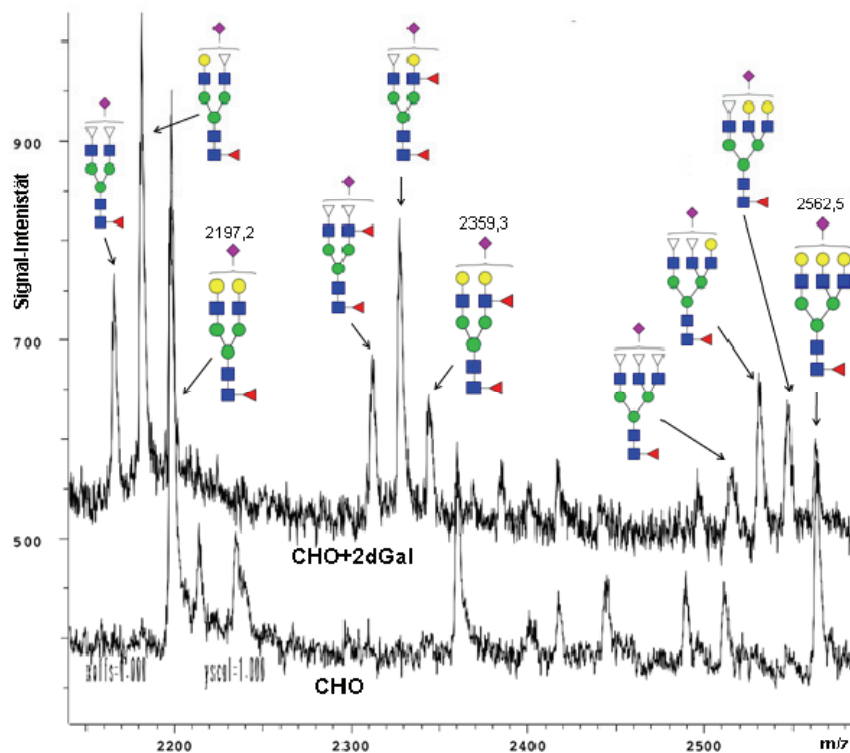
**Abbildung 55:** MALDI-TOF-MS-Spektrum (Ultraflex III) zum Vergleich von 2AB-markierten HEK293-Glykanen ohne/mit 2dGal der Asahipak-HPLC A1+A2-Fractionen nach Sialidase-Behandlung; Messung im positiven Modus mit Matrix Ara; die Position der Fuc innerhalb der Strukturen ist nicht nachgewiesen

Diese Massendifferenz führt auch in den 2dGal-behandelten K-562-Zellen zu einer höheren Anzahl an Signalen je Glykan, da verschiedene Einbaustadien vorhanden sind. Die Abbildung 56 zeigt das Spektrum von 2AB-markierten sialylierten K-562-Glykanen ohne/mit 2dGal aus der A1-Fraktion nach der Asahipak-HPLC.



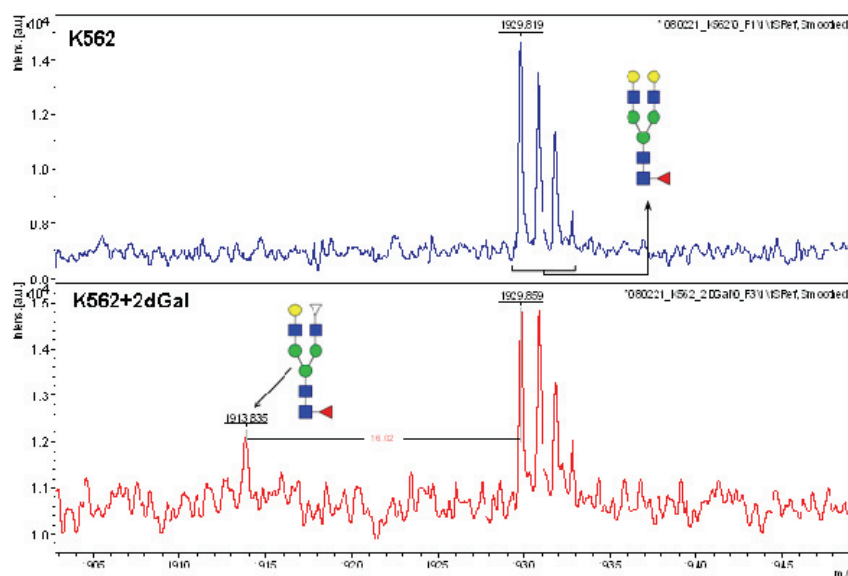
**Abbildung 56:** MALDI-TOF-MS-Spektrum (Biflex) im Vergleich mit 2AB-markierten K-562-Glykanen ohne/mit 2dGal aus der A1-Fraktion der Asahipak-HPLC Messung im negativen Modus mit Matrix ATT; die Positionen von Neu5Ac und Fuc innerhalb der Strukturen sind nicht nachgewiesen

Da die zusätzlichen Signale bei jeder der aufgezeigten Strukturen vorhanden sind, scheint der Einbau der 2dGal unabhängig von der Antennarität oder Fucosylierung zu sein. Ein vergrößerter Ausschnitt ist in der Abbildung 57 dargestellt.



**Abbildung 57:** MALDI-TOF-MS-Spektrum (Biflex) zum Vergleich von 2AB-markierten K-562-Glykanen ohne/mit 2dGal aus der A1-Fraktion der Asahipak-HPLC Messung im negativen Modus mit Matrix ATT; die Positionen von Neu5Ac und Fuc innerhalb der Strukturen sind nicht nachgewiesen

Nach Sialidase-Behandlung dieser Probe ist, wie an einem Beispiel in Abbildung 58 gezeigt, ebenfalls der Einbau der Desoxyhexose ersichtlich. In der Probe ist die biantennäre Struktur im

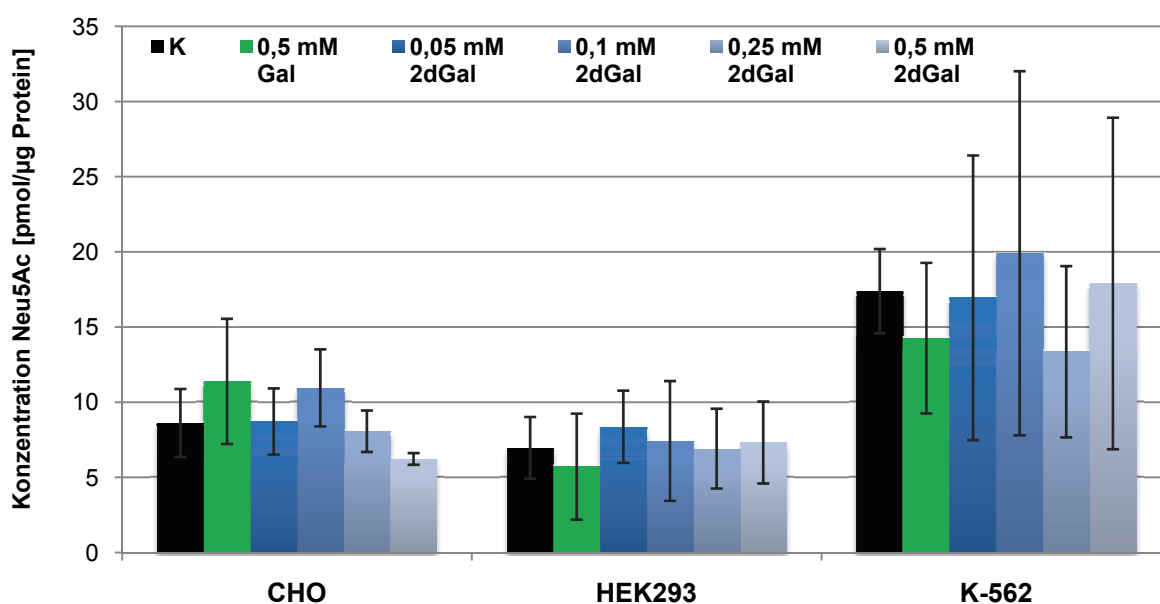


**Abbildung 58:** MALDI-TOF-MS-Spektrum (Ultraflex III) zum Vergleich von 2AB-markierten K-562-Glykanen ohne/mit 2dGal der Asahipak-HPLC A1+A2-Fraktionen nach Sialidase-Behandlung; Messung im positiven Modus mit Matrix Ara; die Position der Fuc innerhalb der Struktur ist nicht nachgewiesen

unmodifizierten Zustand und mit dem Austausch einer Galactose zu finden. Die nativen und auch die durch Supplementation hervorgerufenen modifizierten Strukturen wurden nachgewiesen und zeigten eine funktionelle Glykosylierung von Proteinen in Anwesenheit von 2dGal. Diese erhaltenen Ergebnisse waren die Voraussetzung für das Durchführen der Experimente zur Sialidase-Resistenz von Glykanen.

### 3.3.3.3. Einfluss der 2dGal-Supplementation auf die Sialylierung

Eine wichtige Zielsetzung dieser Arbeit war die Veränderung des Verhaltens von Glykanen gegenüber Sialidasen aufgrund von Modifikationen in der Oligosaccharid-Struktur. Als erster Schritt waren der Nachweis und die Quantifizierung der Sialinsäuren wichtig. Unter Berücksichtigung der auch für die ungeladenen Monosaccharide verwendeten Proteinmengen ergaben sich nach spezifischer Hydrolyse, DMB-Markierung und RP-HPLC die Resultate der Abbildung 59. Mit zunehmender Konzentration von 2dGal im Medium verringert sich die Anzahl an nachweisbaren Sialinsäuren (prozentuale Angaben in der Übersicht auf S. 93). Dies ist bei den CHO-Zellen am deutlichsten zu erkennen.



**Abbildung 59: Durch HPLC bestimmter Gehalt an Neu5Ac in den Glykanen aus den Zelllinien CHO, HEK293 und K-562 ohne bzw. mit 2dGal-Supplementation** Die Daten ergeben sich aus der Quantifizierung der DMB-markierten Neu5Ac im Verhältnis zur Proteinmenge im Isolat der Rohmembranpräparation, K= unsupplementierte Kontrolle

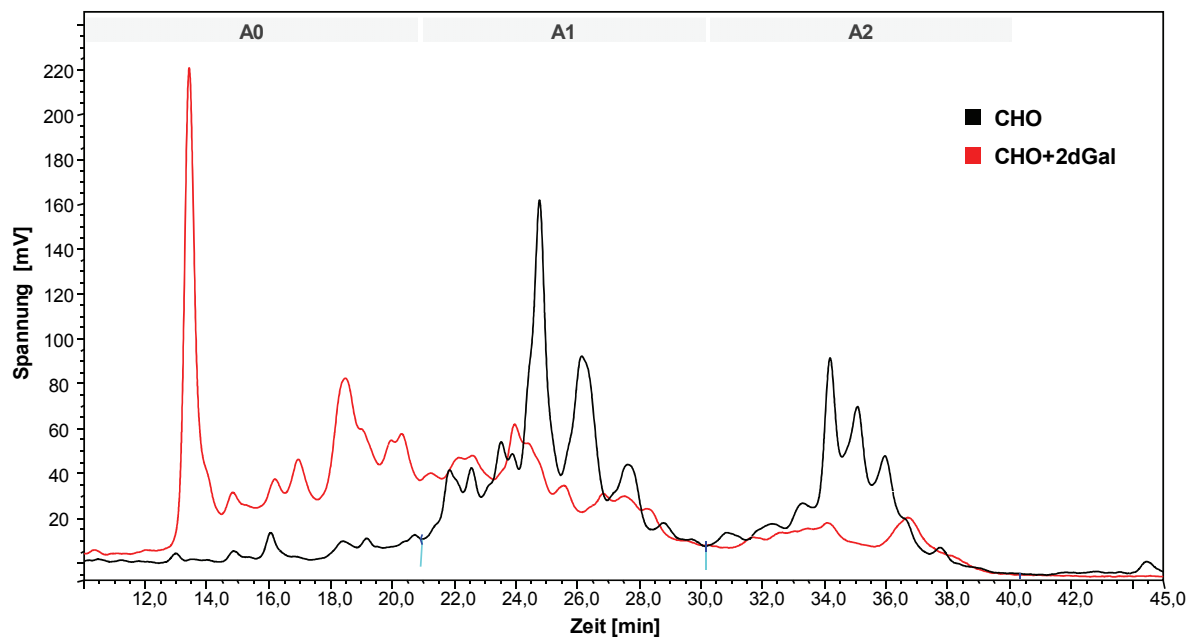
Somit konnte das Vorhandensein der Neu5Ac in jeder Zelllinie nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Proben wurden nun für verschiedene Sialidase-Experimente verwendet, um mögliche Änderungen gegenüber diesem Enzym zu detektieren.

### 3.3.4. Untersuchungen zur Sialidase-Resistenz von Glykanen

Der Einbau der 2-Desoxy-galactose sollte mit dem Ziel einer erhöhten Sialidase-Resistenz verfolgt werden. Die notwendigen Proben wurden analog zu denen im vorherigen Abschnitt gewonnen. Jedoch wurden größere Kulturvolumina eingesetzt und 0,25 mM 2dGal verwendet. Die Ausgangszellzahl lag für die folgenden Versuche bei mindestens  $5 \times 10^7$  bzw.  $10^8$  (+2dGal) Zellen. Nach der Rohmembranpräparation wurden die Proteine mit Trypsin- und PNGase F verdaut und die Glykane anschließend durch einen KIA angereichert. Für die Detektion in der HPLC wurden die Oligosaccharide mit 2AB markiert. Mit Hilfe einer Asahipak-Säule konnten die Glykane entsprechend ihrem Sialylierungsgrad analytisch aufgetrennt werden. Zur Vereinfachung weiterer Messungen wurden die Läufe präparativ wiederholt und die Fraktionen der mono- und disialylierten Strukturen vereint. Ca. 1/10 der Oligosaccharide dienten einem einzelnen Sialidase-Verdau. Die Resultate der verschiedenen Sialidase-Konzentrationen und eine unbehandelte Probe waren Grundlage für den Vergleich nach wiederholter Auftrennung auf einer Asahipak-Säule. Eine Änderung in der Resistenz müsste in Verschiebungen innerhalb verschiedener Sialylierungsstadien oder der Entstehung von neutralen Strukturen zu erkennen sein. D.h. die Sialidase-Behandlung erzeugt aus disialylierten Glykanen mit zwei Sialinsäuren Oligosaccharide mit einer oder keiner Sialinsäure. Der Anteil an mehrfach geladenen Strukturen sinkt, während gering geladene zunehmen bzw. vollständig neutrale entstehen. Eine Erhöhung der Resistenz aufgrund der 2dGal müsste durch einen höheren Anteil an sialylierten Glykanen gegenüber der nicht supplementierten Probe zu erkennen sein. Diese Auswertung erfolgt über die Vergleiche der Integrationen zu den chromatographischen Ergebnissen der von 2AB-markierten Glykanen durch die Asahi-Pak-HPLC (s. Abbildung 61).

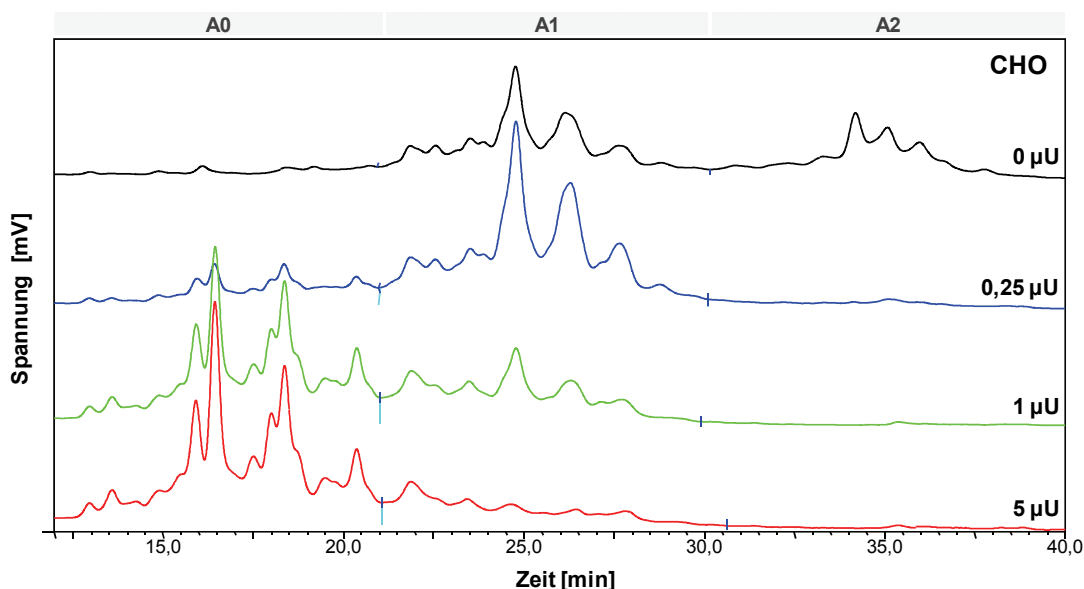
#### 3.3.4.1. CHO-Zellen

Die Abbildung 60 zeigt den Vergleich der HPLC-Läufe von 2AB-markierten Glykanen aus CHO-Zellen ohne und mit 2dGal-Supplementation. Die in der Sialinsäure-Quantifizierung gemessene Abnahme an sialylierten Strukturen (S. 101) ist auch hier ersichtlich. In Anwesenheit von 2dGal im Medium ist ein erhöhter Anteil an neutralen Strukturen zu verzeichnen und die mono- und disialylierten Strukturen sind schwächer ausgeprägt.



**Abbildung 60:** Vergleich der 2AB-markierten N-Glykane aus CHO-Zellen ohne/mit 2dGal mittels Asahipak-HPLC A0, A1, A2 = 0, 1, 2 Sialinsäure(n)

Die in der Abbildung 61 dargestellten CHO-Proben nach Sialidase A-Behandlung (S. 46) zeigen eine Abnahme an geladenen Strukturen. Bei  $0,25 \mu\text{U}$  Sialidase A sind disialylierte Strukturen nicht mehr vorhanden und aus den monosialylierten entstehen neutrale Oligosaccharide.

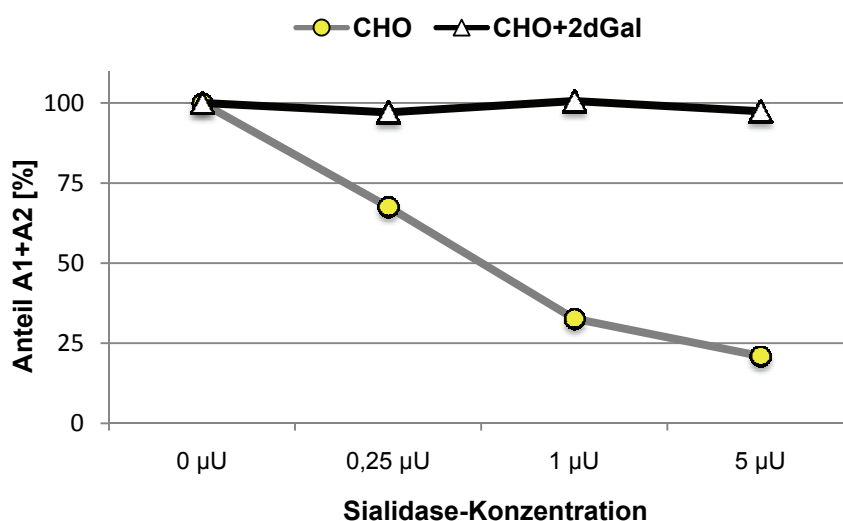


**Abbildung 61:** Vergleich der 2AB-markierten Glykane von nicht supplementierten CHO-Zellen nach Sialidase A-Behandlungen Die Sialidase A wurde in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt und die Reaktion nach 16 Stunden gestoppt. Die verbliebenen Glykane wurden in der der HPLC nach ihrer Sialylierung detektiert und mit der nicht behandelten Probe verglichen.

Im Gegensatz dazu zeigt die Probe der 2dGal-Supplementierung keine Änderung im Chromatogramm nach der Sialidase-Behandlung (Abb. nicht gezeigt). Die Integration der Signale



ergab das Diagramm der Abbildung 62.

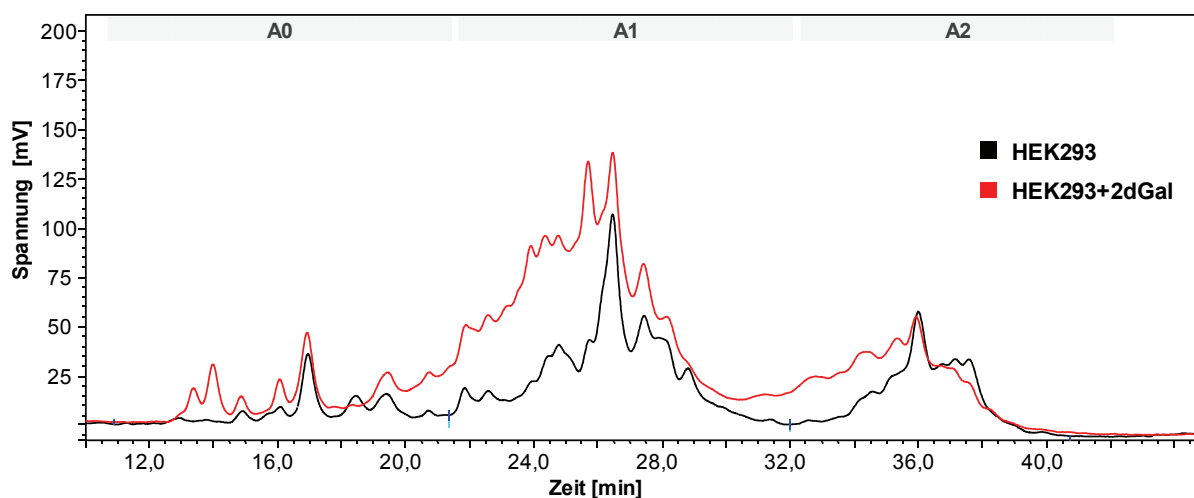


**Abbildung 62: Prozentualer Anteil von A1- und A2-Strukturen aus CHO-Zellen nach Sialidase-A Behandlung** Es sind die Anteile der Summe A1+A2 an den Gesamt-Strukturen dargestellt. Die Werte der Probe ohne Sialidase A wurden 100% gesetzt.

Die Glykane aus CHO-Zellen weisen somit in 2dGal-Anwesenheit eine fast vollständige Resistenz gegenüber der Behandlung mit der Sialidase A auf.

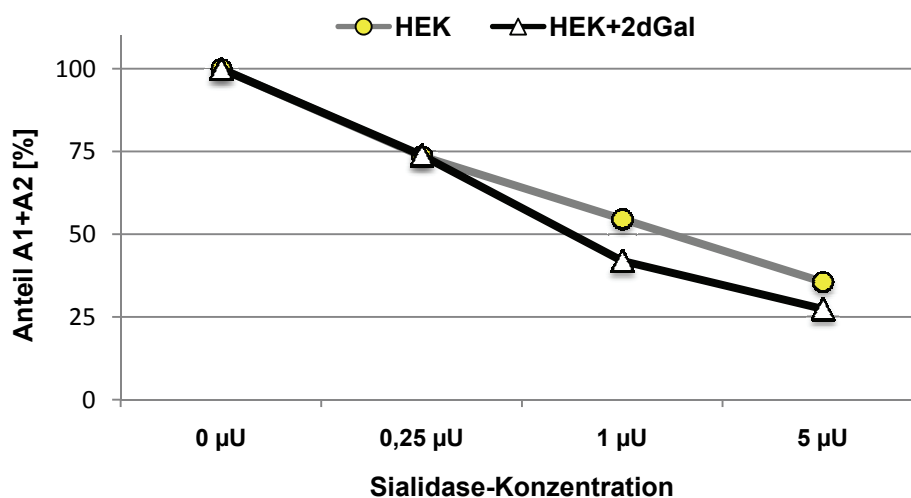
### 3.3.4.2. HEK293-Zellen

Im Vergleich zu den CHO- zeigen HEK293-Zellen geringe Veränderungen im Glykan-Profil nach der Supplementation mit 2dGal. Die Auftrennung entsprechend dem Sialylierungsgrad ist in der Abbildung 63 dargestellt.



**Abbildung 63: Vergleich der 2AB-markierten N-Glykane aus HEK293-Zellen ohne/mit 2dGal mittels Asahipak-HPLC** A0, A1, A2 = 0, 1, 2 Sialinsäure(n)

Die Inkubation mit Sialidase A der nicht-supplementierten Zellen zeigt die Abbildung 64.

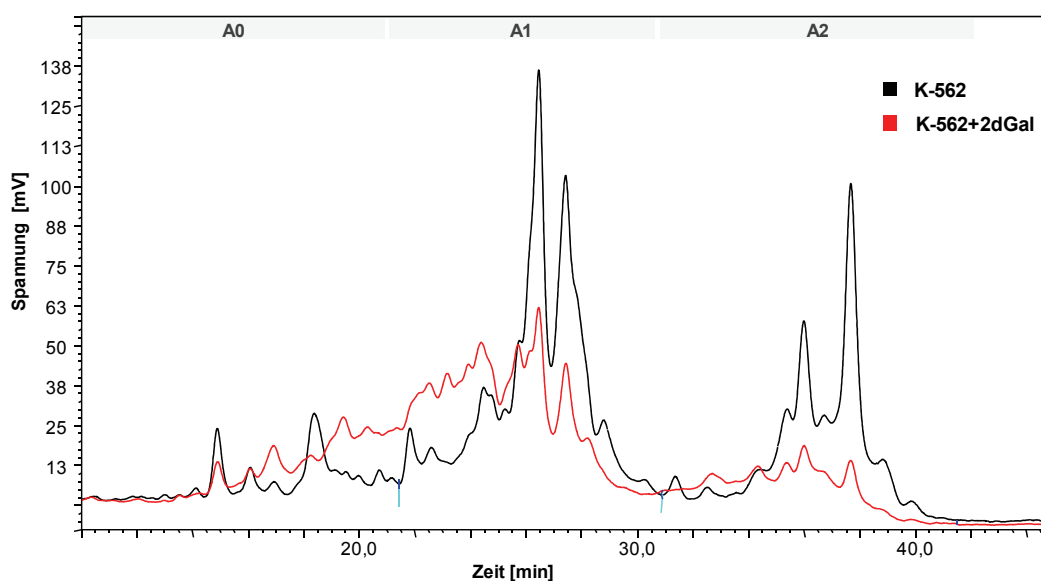


**Abbildung 64: Prozentualer Anteil von A1- und A2-Strukturen aus HEK293-Zellen nach Sialidase-A Behandlung** Es sind die Anteile der Summe A1+A2 an den Gesamt-Strukturen dargestellt. Die Werte der Probe ohne Sialidase A wurden 100% gesetzt.

Mit zunehmender Enzymkonzentration wird der Anteil an sialylierten Strukturen geringer. In der Probe mit der Supplementation ist dies, trotz der 2dGal, stärker ausgeprägt, so dass die Resistenz in den HEK293-Zellen vermindert ist.

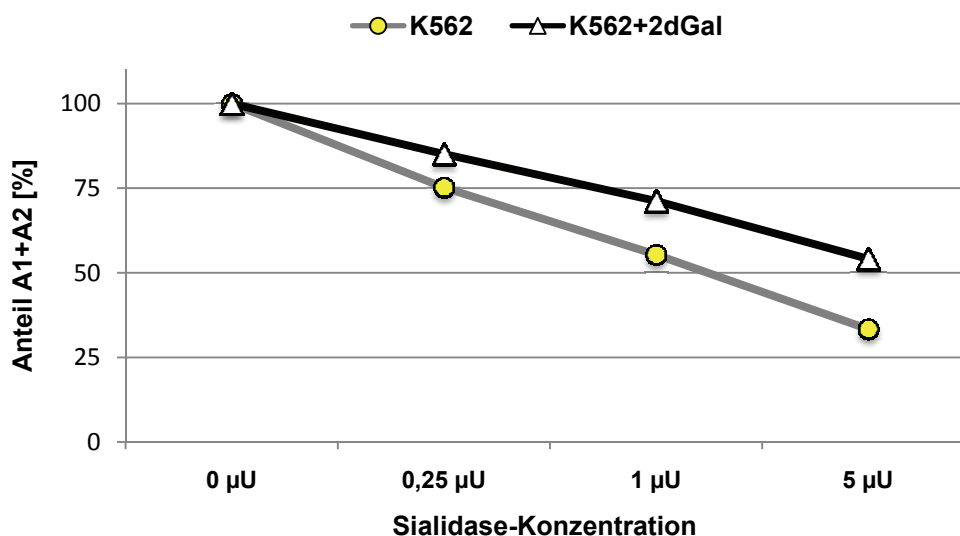
### 3.3.4.3. K-562-Zellen

Der Vergleich der Glykan-Proben ohne bzw. mit 2dGal-Supplementation der K-562-Zellen zeigt in der Abbildung 65 eine starke Abnahme der sialylierten Strukturen und eine primäres Vorhandensein von monosialylierten Oligosacchariden.



**Abbildung 65: Vergleich der 2AB-markierten N-Glykane aus K-562-Zellen ohne/mit 2dGal mittels Asahipak-HPLC** A0, A1, A2 = 0, 1, 2 Sialinsäure(n)

Durch die Behandlung mit der Sialidase A (Abbildung 66) zeigen sowohl die Glykane ohne, als auch die mit der Modifikation durch 2dGal eine Abspaltung der Sialinsäuren. Dabei vermittelt die Anwesenheit der 2dGal eine erhöhte Resistenz.



**Abbildung 66: Prozentualer Anteil von A1- und A2-Strukturen aus K-562-Zellen nach Sialidase-A Behandlung** Es sind die Anteile der Summe A1+A2 an den Gesamt-Strukturen dargestellt. Die Werte der Probe ohne Sialidase A wurden 100% gesetzt.

Der Einbau der 2dGal zeigte für Glykane aus CHO- und K-562-Zellen eine erhöhte Resistenz gegenüber den Sialidase A-Behandlungen. Die HEK293-Isolate mit Analogon-Einbau wiesen eine verstärkte Abspaltung der Sialinsäuren auf, so dass der erwünschte Effekt der Resistenz-Erhöhung von der gewählten Zelllinie abhängig ist. Der generelle Einfluss der 2dGal auf die Affinität der Sialidase konnte mit diesen Versuchen nachgewiesen werden.

### 3.4. Supplementation mit Analoga von Sialinsäure-Vorläufern

Die erste Möglichkeit der Modifikation von proteingebundenen Glykanen war der Einbau der 2dGal im Austausch gegen die subterminale Galactose (s. 3.3). Im Folgenden werden die Ergebnisse zu Experimenten, in denen der terminale Zucker von Glykanen, die Sialinsäure, biochemisch modifiziert wird.

Grundlage für die Durchführung waren bereits vorher in der Arbeitsgruppe verwendete N-Acyl-D-Mannosamine (Kayser *et al.*, 1992; Keppler *et al.*, 2001). Die Moleküle weisen im Vergleich zum natürlichen N-Acetyl-Mannosamin eine Veränderung in der Acyl-Seitenkette auf (z.B. Propanoyl- statt Acetyl-). Diese können durch die UDP-N-acetylglucosamin-2-epimerase/N-acetylmannosamin-kinase in den Biosyntheseweg der Sialinsäuren (Reuter & Gabius, 1996) als Analogon des N-Acetyl-Mannosamins eingeschleust werden und führen zur Bildung von nicht physiologischen Sialinsäuren. Eine dadurch bedingte biologische Stabilitätserhöhung war

nachweisbar (Horstkorte *et al.*, 2001). Dieser Versuchs-Ansatz sollte auf verschiedene Zelllinien übertragen werden, um eine Modifizierung innerhalb des gesamten Glykoms zu erreichen.

Die aus den Supplementationen mit den N-Acetyl-Mannosamin-Analoga gewonnenen Oligosaccharide sollten, analog zu den 2dGal-Experimenten, auf veränderte Eigenschaften gegenüber der Behandlung mit Sialidasen untersucht werden. Eine geringere Sensitivität gegenüber dem Enzym könnte eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit, z. B. auch bei medizinischen Anwendungen, bedeuten.

### 3.4.1. Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen wurden bereits unter 2.4 beschrieben. Zu Beginn mussten verschieden Parameter, wie z.B die Konzentration der folgenden Analoga optimiert werden.

ManNAc	N-Acetylmannosamin	natürlicher Sialinsäure-Vorläufer
ManNProp	N-Propanoylmannosamin	ManNAc-Analoga
ManNCProp	N-Cyclopropylacetylmannosamin	
ManNBut	N-Butanoylmannosamin	
ManNPent	N-Pentanoylmannosamin	

Die später verwendeten peracetylierten Varianten wiesen im Vergleich zu den nicht peracetylierten Analoga die höheren Einbauraten auf (Daten nicht gezeigt) und wurden in den folgenden Ergebnissen verwendet. Die Abbildung 67 zeigt die nach DMB-Markierung nachweisbaren Sialinsäuren in ManNCProp-supplementierten Zellen.

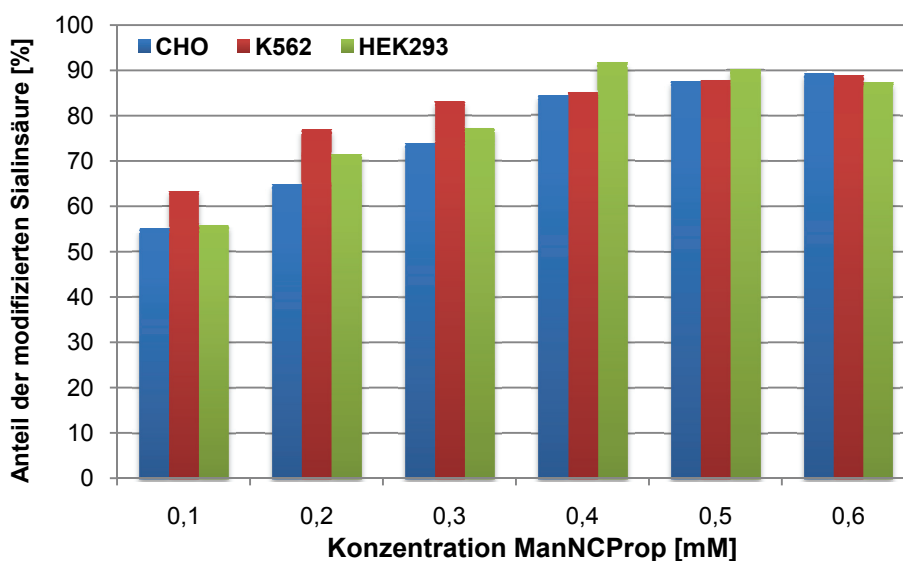


Abbildung 67: Konzentrations-abhängiger Einbau von ManNCProp in die Glykane der Zelllinien CHO, HEK293 und K-562

Die optimale Konzentration für jedes Analogon wurde auf 0,5 mM festgelegt und bei den Proben für die Sialidase-Behandlungen angewandt. Ab 0,7 mM Analogon war eine deutliche Reduktion der Sialinsäure-Konzentration zu verzeichnen.

### 3.4.2. Modifizierte Sialinsäuren in Zellglykanen

Die zugegebenen ManNAc-Analoga sollten in die Glykane eingebaut werden. Der Nachweis und die damit verbundene Quantifizierung erfolgte durch die Markierung mit DMB (S. 43) und der anschließenden Detektion mittels HPLC (S. 52).

Die Analoga weisen unterschiedliche Einbauraten auf (Abbildung 68), die sich jedoch zwischen den Zellen für einen Vorläufers ähneln. ManNCProp erreichte einen Sialinsäure-Anteil von bis zu 90%, während ManNPent zu höchstens 50% in die Glykane eingebaut wurde. Jedoch muss ein hoher Einbau nicht unbedingt mit einer optimalen Wirkung korrelieren, was erst durch die Ergebnisse der Resistenz-Messungen (S. 109) zu beurteilen war.

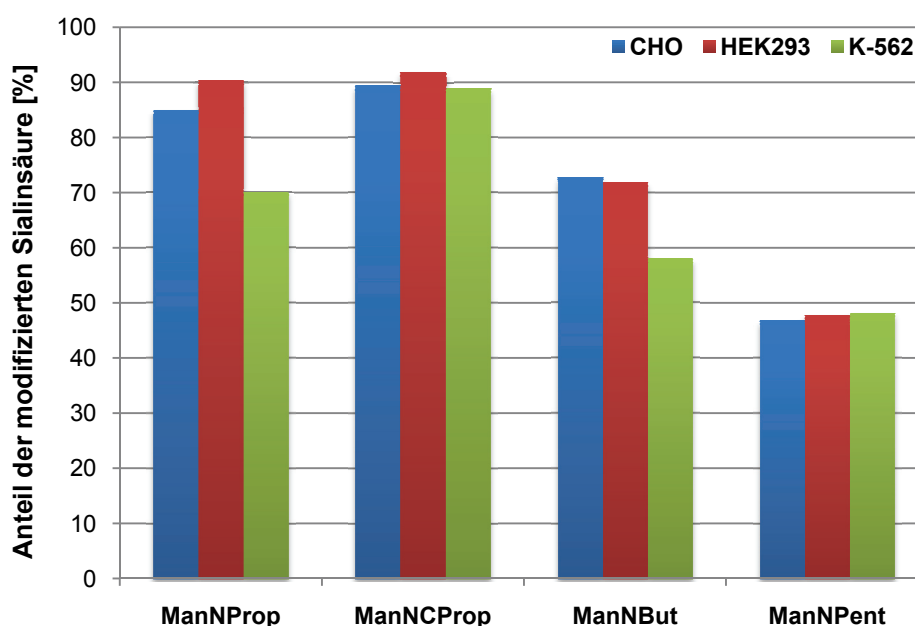
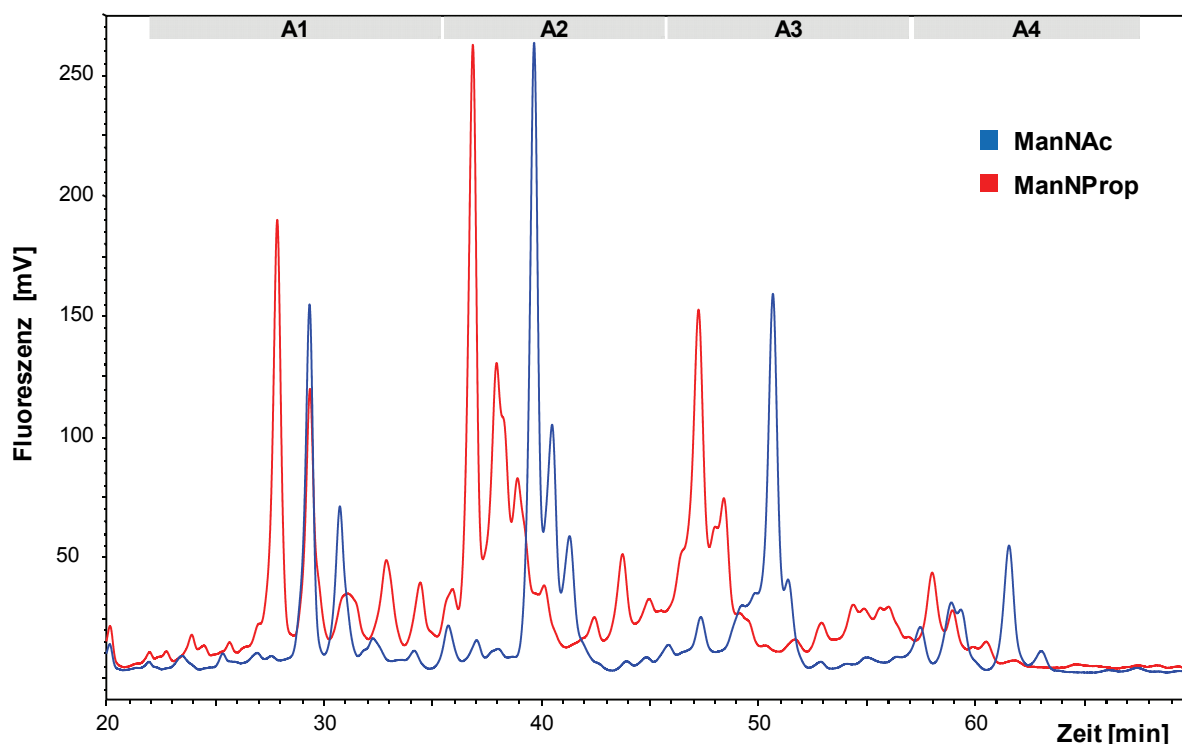


Abbildung 68: Einbauraten der N-Acetyl-Mannosamin-Analoga in die Glykane der Zelllinien CHO, HEK293 und K-562 Quantifizierung der resultierenden Sialinsäuren nach DMB-Markierung mittels HPLC

Die in den Glykanen vorhandenen modifizierten Sialinsäuren führen in Auftrennungen der Asahipak-HPLC, im Vergleich zur Probe mit physiologischen Glykanen, zu Retentionsänderungen (Abbildung 69). Somit konnte auch hier das Vorhandensein der neuen Neuraminsäure-Analoga nachgewiesen werden.



**Abbildung 69:** Vergleich der Asahi-Pak-HPLC-Läufe zur ladungsabhängigen Auftrennung der Glykane aus CHO-Zellen ohne bzw. mit ManNProp. Die in den Oligosacchariden vorhandenen N-Cyclopropylacetylneuraminsäure beeinflusst die Retentionszeiten der Oligosaccharide.

Die neuen nicht-natürlichen Sialinsäuren wurden durch die Supplementation mit den verschiedenen ManNAc-Analoga in den Zellen synthetisiert und konnten in den resultierenden Protein-Isolaten mit einem maximalen Anteil von 90 % detektiert werden.

### 3.4.3. Untersuchungen zur Sialidase-Resistenz von Glykanen

Der Einfluss der neuen Sialinsäuren auf die Aktivität und/oder Affinität der Sialidase wurde an den CHO- und den HEK293-Zellen untersucht. Die isolierten und 2AB-markierten Glykane der verschiedenen Supplementationen waren nach Zugabe der Sialidase C (2-3,6-spezifisch) zeitabhängig zu inkubieren. Die verbliebenen sialylierten Strukturen konnten mittels HPLC aufgetrennt und in ihren quantitativen Änderungen charakterisiert werden.

Die Abbildung 70 zeigt die enzymatische Wirkung der Glykosidase an Glykanen aus CHO-Zellen. In Abhängigkeit vom Analogon unterscheiden sich die Desialylierungen und zeigen eine deutlich erhöhte Resistenz in Anwesenheit von N-Butanoylneuraminsäure und N-Pentanoylneuraminsäure.

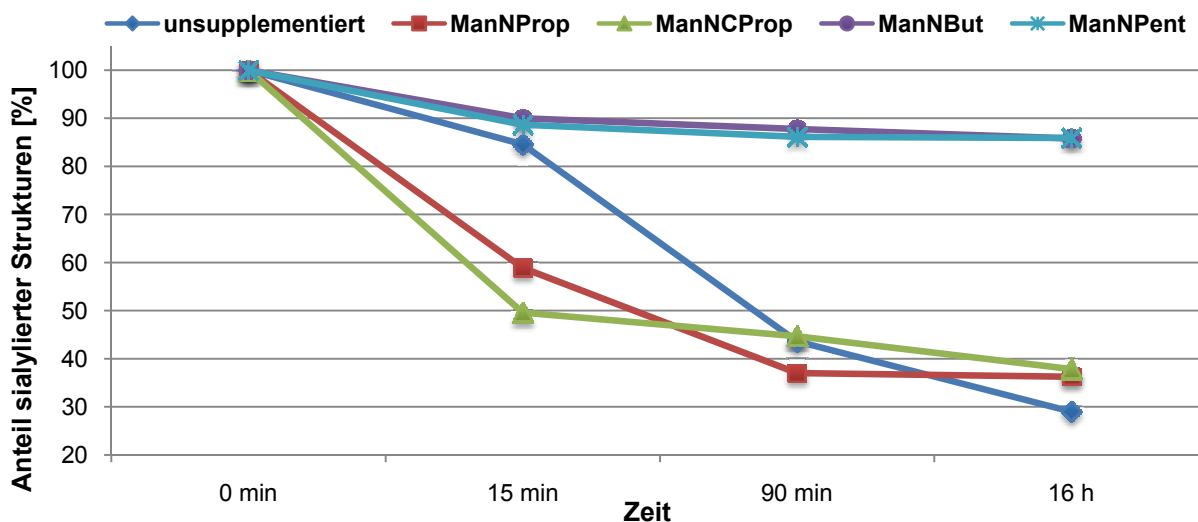


Abbildung 70: Anteil sialylierter Strukturen nach einem zeitabhängigen Sialidase C-Verdau von Glykanen aus CHO-Zellen ohne/mit ManNAc-Analoga

In den HEK293-Zellen (Abbildung 71) zeigten ebenfalls die Proben mit N-Butanoyl- bzw. N-Pentanoylneuraminsäure die geringste Sialinsäure-Abspaltung.

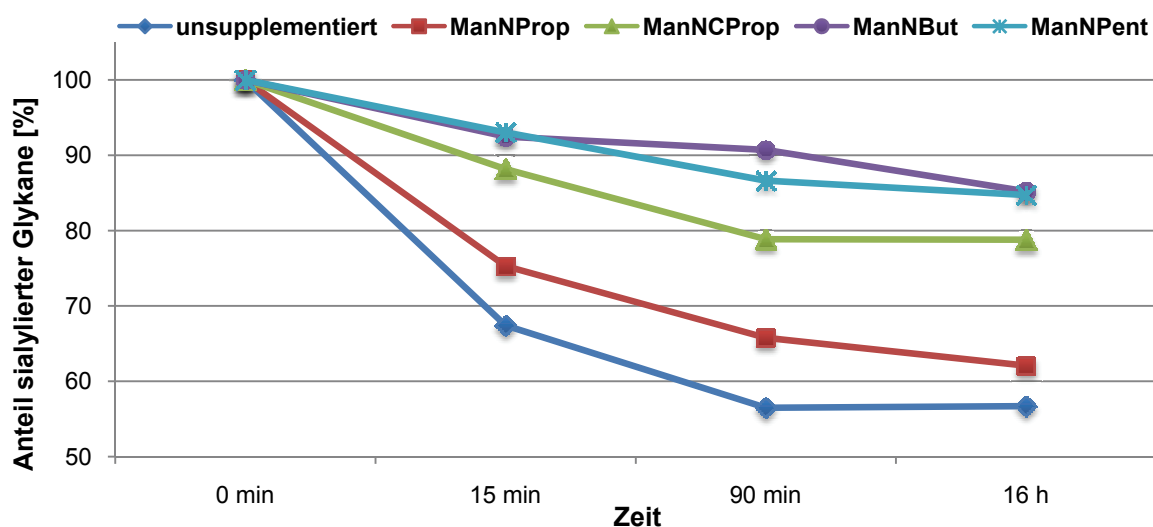


Abbildung 71: Anteil sialylierter Strukturen nach einem zeitabhängigen Sialidase C-Verdau von Glykanen aus HEK293-Zellen ohne/mit ManNAc-Analoga

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ersichtlich, dass die maximalen Einbauraten für ManNCProp nicht automatisch die höchste Resistenz gegenüber der Sialidase bewirken. Die Ergebnisse der Sialinsäuren-Einbauraten und der enzymatischen Behandlungen bevorzugen die Verwendung des ManNBut als Analogon in den genutzten Zelllinien.

Die Modifikation der untersuchten N-Glykane gelang sowohl an der Position der terminalen Sialinsäuren, als auch an den subterminalen Galactosen. Beide Methoden führten zu Änderungen im Verhalten gegenüber Sialidasen und waren vom Analogon und der Zelllinie abhängig.