

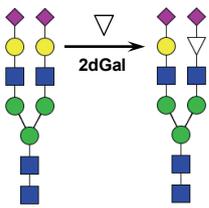
4. DISKUSSION

Nach den großen Fortschritten der Genom- und Proteom-Forschung, erweckt nun zunehmend die „3. molekulare Sprache von biologischen Systemen“ (Weiss & Iyer, 2007) - die Glykomik, das Interesse. Nicht nur die strukturelle, sondern auch die funktionelle Bedeutung von Kohlenhydraten (Rademacher *et al.*, 1988; Tuomanen, 1996; Varki *et al.*, 1998; Nagai, 2002; Harvey, 2005; Hitchen & Dell, 2006) stehen im Vordergrund vieler Forschungsprojekte der Glykobiologie. Die hohe Vielfalt an Monosacchariden bzw. ihrer Verknüpfungen erhöht sowohl die Funktionalität der Kohlenhydrate, als auch die Spezifität des Proteoms (Kobata, 1992; Dell, 2002). Dies ist an der Beteiligung an vielen biologischen Vorgängen wie z.B. Zell-/Gewebedifferenzierung (Schwarzkopf *et al.*, 2002; Haltiwanger & Lowe, 2004; Cipollo *et al.*, 2005), Prozessen des Immunsystems (Keiser, 1982; Rudd *et al.*, 2001; Ley, 2003), Erkrankungen (Ohyama *et al.*, 1999; Alper, 2001; Russell & Webster, 2005) und Zellinteraktionen (Mattu *et al.*, 1998; Gabius *et al.*, 2002; Vlassara, 2005; Vanhooren *et al.*, 2007) zu erkennen.

Die Isolierung und Charakterisierung von proteingebundenen Oligosacchariden und deren Anwendung für die Proben-Analyse ohne/mit Glykan-Modifikation waren Gegenstand dieser Arbeit. Im Hinblick auf eine pharmazeutische Relevanz stand die Beeinflussung der Halblebenszeit von Glykokonjugaten im Blutkreislauf (Morell *et al.*, 1971; Ashwell & Harford, 1982; Weiss & Ashwell, 1989; Stockert *et al.*, 1991) im Mittelpunkt des Interesses. Die Aktivität von Sialidasen führt zur Entstehung von desialylierten Glykanen, welche nach der Bindung an den Asialoglykoprotein- oder Ashwell-Rezeptor (ASGPR) abgebaut werden. Die Experimente beinhalteten Untersuchungen zu Veränderungen der Sialidase-Wirkung nach dem Einbau von nicht-physiologischen Monosacchariden. Hierbei wurden zwei Ansätze ausgewählt (s. S. 23), die Modifikation der terminalen Sialinsäure und der subterminalen Galactose. Der Nachweis einer erhöhten Resistenz gegenüber Sialidasen hätte, in Übertragung auf die Kenntnisse über den ASGPR, einer verlängerte Verweildauer eines Glykokonjugates im Blutkreislauf zur Folge (Horstkorte *et al.*, 2001; Raju *et al.*, 2001; Keck *et al.*, 2008). Das Resultat einer geeigneten Glykosylierungs-Modifikation rekombinanter Glykoproteine wäre von hohem Wert, da weniger eingesetztes Protein verwendet werden könnte. Das ermöglicht die Verringerung der Behandlungsdosen und somit die Anzahl bzw. die Intensität von Nebenwirkungen. Zusätzlich können gebundene Oligosaccharide einen positiven Einfluss auf die Stabilität der Proteinstruktur haben (Parodi, 2000; Arnold *et al.*, 2007; Shental-Bechor & Levy, 2008).

4.1. Supplementation mit 2-Desoxy-D-galactose

4.1.1. Nachweis und Wirkung der 2-Desoxy-D-galactose



In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass 2-Desoxy-D-galactose (2dGal) in die Glykoproteine aus Zellmembranen der Zelllinien CHO, HEK293 und K-562 eingebaut wird. Zu diesem Nachweis mussten bisher bestehende Methoden (2.10.1) grundlegend überarbeitet und adaptiert werden, wozu ein erheblicher Teil der Experimente notwendig war. Bereits 1964

konnte gezeigt werden, dass dieses Galactose-Analogon über die Enzyme des Leloir-Weges wie Galactose metabolisiert wird (Fischer & Weidemann, 1964; Fischer & Weidemann, 1964). Diese Befunde wurden später an der Ratte bestätigt und erweitert (Starling & Keppler, 1977). 1980 gelang der Nachweis des Einbaus von 2dGal in Glykoproteine der Plasmamembran (Büchsel *et al.*, 1980) und weiterhin konnte gezeigt werden, dass der partielle Ersatz der Galactose durch dieses unphysiologische Analogon zu einem verminderten Einbau von L-Fucose führte. Diese Befunde erwiesen sich als biologisch bedeutsam, da die intrathekale Injektion von 2dGal bei Hühnchen zum Verlust des Kurzzeitgedächtnisses führte und damit der L-Fucose eine Rolle bei diesem Vorgang zuwies (Bullock *et al.*, 1990).

Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten zum 2dGal-Einbau in Glykoproteine der drei Zelllinien CHO, HEK293 und K562 erweitern in wesentlichem Maße die biologische Bedeutung der 2dGal. Zunächst war die Analytik und quantitative Erfassung der säurehydrolytisch freigesetzten Monosaccharide zu optimieren, um die Rate der eingebauten 2dGal im Vergleich zu den anderen Monosacchariden der Glykan-Struktur erfassen zu können. Es zeigte sich, dass die verschiedenen Monosaccharid-Bausteine unterschiedlich schnell freigesetzt wurden (Hardy *et al.*, 1988; Hermentin *et al.*, 1992). Während L-Fucose bereits nach 20 min vollständig abgespalten war, dauerte dieser Vorgang für Glucosamin (bei der Hydrolyse aus GlcNAc entstanden) sehr viel länger (über 4 h). Galactose wurde nach ca. 180 min abhydrolysiert. Weitaus schwieriger gestalteten sich die Verhältnisse bei der Hydrolyse für 2dGal, da diese per se schon relativ instabil ist und daher sehr milde Bedingungen (0,25 N TFA, statt 2N TFA und nur 25 min, statt 180 min) gewählt werden mussten. Die genaue Quantifizierung mittels HPLC gestaltete sich schwierig und wurde bereits früher in Verbindung mit anderen Methoden, wie der optionalen Massenspektrometrie-gekoppelten Gaschromatographie diskutiert (Geilen *et al.*, 1992; Hwang *et al.*, 1993; Kannicht, 1995). Es handelt sich daher bei den hier gewonnenen Werten um Annäherungen, da ein Kompromiss zwischen Abspaltungsrate und chemischer Zerstörung des Moleküls zu finden war. Für die Arbeit entscheidend war jedoch, dass 2dGal in signifikanter Weise in die Glykoprotein-Fractionen eingebaut wurde. Damit war eine entscheidende Grundlage für die Beantwortung der Fragestellung geschaffen.

Der 2dGal-Einbau erwies sich als Konzentrations- und Zelltyp-abhängig. Nach Optimierung der Kulturbedingungen wurden die höchsten Inkorporationsraten in CHO-Zellen gemessen, K562- und HEK293-Zellen unterschieden sich nur wenig (Abbildung 85). Die höhere Kapazität der CHO-Zellen ist in der Affinität und Aktivität der verantwortlichen Enzyme des Leloir-Weges zu suchen. Im Wesentlichen wurde die physiologische Galactose durch 2dGal ersetzt. Im Vergleich zu den ermittelten Werten zeigten HepG2-Zellen, dass 10% der Galactose in Membranproteinen mit 2dGal aus dem Medium ersetzt (Geilen *et al.*, 1992).

Unter den hier optimierten Bedingungen war der Ersatz von Galactose durch 2dGal beträchtlich höher und zeigt, dass die Enzyme des Leloir-Weges sehr sensitiv gegenüber Veränderungen am C-2-Atom sind. Wurde 2dGal *in vivo* verabreicht (Ratten), so konnte in der Gangliosid-Fraktion ein Anteil von 56% 2dGal nachgewiesen werden. Offenbar sind die *in vivo*-Bedingungen für den 2dGal-Umsatz optimal.

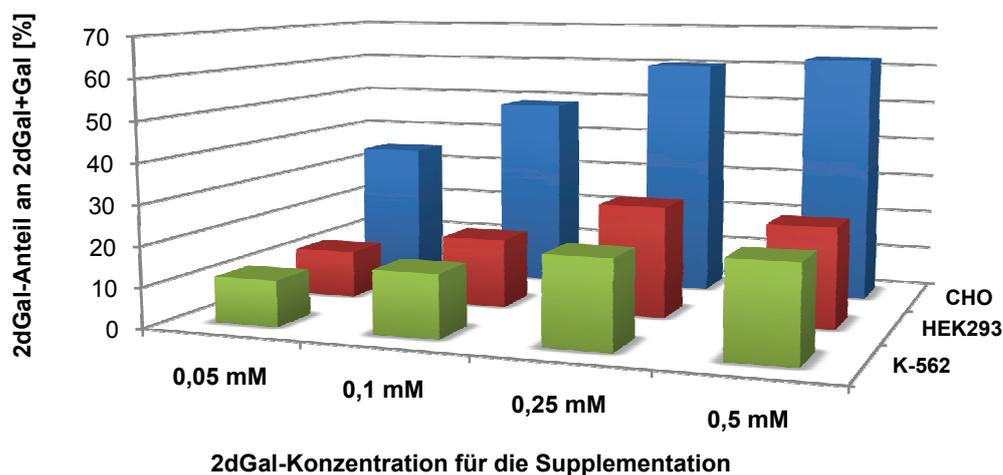


Abbildung 85: Prozentualer Einbau der 2dGal in den Zelllinien CHO, HEK293 und K-562

In der Abbildung 47 (S. 93) wird die prozentuale Veränderung der Monosaccharid-Zusammensetzung und -Menge durch die 2dGal-Supplementation gezeigt. Die Reduktion aller Glykanbestandteile, bezogen auf die gemessene Proteinmenge, zeigte eine verminderte Gesamt-Glykosylierung für jede der drei Zelllinien. Dabei weisen die Monosaccharide Konzentrationsänderungen auf, welche für ein verändertes Glykosylierungs-Muster sprechen. Für den Vergleich der Proben aus den 2dGal-Supplementationen war ein definierter Bezugswert notwendig. Die genauesten Resultate würde ein im Glykan vorhandenes Kohlenhydrat liefern. Jedoch fehlt hierfür die Konstanz eines Monosaccharides, so dass noch die beiden Messgrößen Zellzahl und Proteinmenge (im Isolat der Rohmembranpräparation) zur Verfügung standen. Die Anzahl der Zellen verringerte sich mit ansteigender 2dGal-Konzentration, die deutlichste Ausprägung zeigten die CHO-Kulturen (Abbildung 44, S. 91). Die Proteinmenge nahm in den Zellen von CHO und HEK293 zu bzw. in K-562 leicht ab (Abbildung 45, S. 92). Da die BCA-Bestimmung erst am

Ende der Probenaufarbeitung und somit unter Berücksichtigung methodischer Verluste erfolgte, wurde diese als Bezugsgröße für die weiteren Auswertungen genutzt. Die berechneten Werte ergaben sich aus pmol Monosaccharid zu μg Protein, bzw. deren prozentuale Änderung zur Kontrolle ohne Supplementation.

Während die K-562-Zellen eine Reduktion in der Proteinbiosynthese in den Versuchen dieser Arbeit zeigten, stieg diese in CHO- und HEK293-Zellen an. Somit ist dies keine generelle Wirkung des Analogon, sondern von der verwendeten Zelllinie bzw. den dort vorhandenen Kohlenhydrat-relevanten Enzymen/Transportern abhängig. Die hierfür verantwortliche Ursache kann bereits vor der Übertragung auf die Aminosäurekette oder erst später bei der weiteren Prozessierung des Glykans liegen. Eine geringere Glykosylierung ermöglicht eventuell eine schnellere Biosynthese des Proteins und dessen Transport vom ER bis zur Zellmembran. Andererseits könnte eine unzureichende Modifikation durch Oligosaccharide auch zu einem hohen Anteil an nicht korrekt gefalteten Peptiden zur Folge haben, so dass weniger Proteine an die eigentlichen Zielorte gelangen.

In den Konzentrationsänderungen der Monosaccharide in Abbildung 47 (S. 93) weisen die Zellen, im Vergleich zur Probe ohne 2dGal, eine verminderte Glykan-Biosynthese auf; CHO (-42%), HEK293 (-28%) und K-562 (-38%). Jedoch zeigt nur die Summe der Galactosen (Gal+2dGal) eine mögliche Korrelation zur Änderung der Proteinmenge. In den CHO-Zellen, mit einer deutlich erhöhten Protein-Biosynthese durch 2dGal, ist die Abnahme der Galactosen im Vergleich zur Kontrolle am geringsten. In den K562-Kulturen, mit einer absinkenden Proteinmenge, ist der höchste Verlust der Galactosen zu verzeichnen. Die durch BCA bestimmte Konzentration an Proteinen korreliert nach der 2dGal-Supplementation mit den vorhandenen Mengen an Gal+2dGal. Für die anderen Monosaccharide trifft dies nicht zu. Das GlcNAc und die Man zeigen in CHO-Zellen die stärkste Reduzierung, obwohl hier der Gehalt an Proteinen mit steigender 2dGal-Zugabe zunimmt. Die Auswertung der Daten wird durch die Änderung der gebildeten Glykan-Strukturen erschwert. Das Verhältnis von GlcNAc zu Man gibt das Vorhandensein von komplexen Oligosacchariden wieder ($\geq 4:3$ = komplex, $\leq 4:3$ = Mannose-reich). Die HEK293-Zellen zeigen eine geringe und K-562-Zellen eine deutliche Tendenz zur verringerten Bildung komplexer N-Glykane bzw. Mannose-reiche Strukturen, welches natürlich auch einen Einfluss auf die Anzahl an Sialylierungs-Positionen hat.

Von 2-Desoxyglucose und dessen aktivierter Form ist bekannt, dass sie das Wachstum hemmen (Schmidt *et al.*, 1974; Hughes *et al.*, 1977; Datema & Schwarz, 1979; Geilen *et al.*, 1992). Da 2dGal auf dem Leloir-Weg auch in 2dGlc-Derivate metabolisiert wird, kann die Hemmung sowohl durch 2dGal- wie auch durch 2dGlc-Derivate erfolgen. Die Zelle ist nicht in der Lage zwischen GDP-Mannose und GDP-2dGlc (da bei letzterem die Hydroxylgruppe am C-2 fehlt) zu unterscheiden. Daher kann GDP-2dGlc anstelle der natürlichen Mannose auf Dolichol-P-P-

(GlcNAc)₂ übertragen werden, führt aber in dieser Position zum Abbruch der Prozessierung des naszierenden Oligosaccharides und damit zur Hemmung der Glykosylierung. Die Hemmung der Proteinbiosynthese betraf nicht alle Zellen, sondern nur die K562-Zellen. Es ist nicht auszuschließen, dass bei diesen Zellen eine enge Korrelation zwischen intakter Oligosaccharid-Biosynthese, Proteinfaltung und Proteinbiosynthese besteht.

In der Abbildung 59 (S. 101) ist der Sialinsäure-Gehalt unter Supplementations-Bedingungen dargestellt. Mit zunehmender 2dGal-Konzentration nimmt die Sialylierung ab. Jedoch sind die Unterschiede geringer als für GlcNAc und Man. Beide Sachverhalte deuten auf eine 2dGal-bedingte Biosynthese von N-Glykanen mit geringerer Komplexität und nicht für eine spontane Änderung zu Mannose-reichen Strukturen. Außerdem werden die Glykane vermutlich auch ohne Supplementierung nicht vollständig sialyliert, so dass die Reduzierung der Glykan-Antennen nicht direkt mit den nachgewiesenen Sialinsäuren korreliert. Diese Vermutung wird durch die Spektren der massenspektrometrischen Untersuchungen bestätigt. Die Hauptsignale des Spektrums von Glykanen aus 2dGal-supplementierten Zellen waren, im Vergleich zur Kontrolle, in einem Bereich geringerer Molekülmassen zu finden. Der Anteil komplexerer Strukturen nahm mit höherer 2dGal-Zugabe ab.

Die Verwendung von 2dGal in früheren Experimenten führte zu weiteren Veränderungen. Der Grund für die Abnahme der α 1,2-Fucosylierung an den antennären Galactosen (Zerfaoui *et al.*, 2000) war der zunehmende Austausch gegen die 2dGal, während die α 1,3/ α 1,4-Fucosylierung einen Anstieg aufwies (Büchsel *et al.*, 1980; Geilen *et al.*, 1992; Kannicht, 1995). Eine Aussage über die differentielle Änderung der Fucosylierungs-Varianten durch die 2dGal konnte mit den in dieser Arbeit gewonnenen Daten nicht getroffen werden. In allen Zelllinien führte die Supplementierung zu einem geringeren Einbau der Fucose in die N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Einbau der 2dGal in den verwendeten Zelllinien CHO, HEK293 und K-562 nachweisbar war und zu einem Austausch der Galactose gegen das Analogon führte. Es konnte eine generelle Abnahme der Glykosylierung beobachtet werden, welche durch Zelllinien-spezifische Variationen der Monosaccharide gekennzeichnet war. Die Zellen wurden für die weiteren Versuche zur Sialidase-Resistenz mit 0,25 mM 2dGal kultiviert.

4.1.2. Beeinflussung der Sialidase-Resistenz

Mit den hier erhobenen Zellkulturergebnissen über den Einbau von 2dGal waren die notwendigen Voraussetzungen geschaffen, um der Frage nach der Beeinflussung der biologischen Stabilität von Glykoproteinen nachzugehen, deren natürliche Galactose durch 2dGal ersetzt wurde. Am Beispiel von N-Glykanen von Membranproteinen der Zelllinien CHO und K-562 konnte hier nach-

gewiesen werden, dass das erste für den Abbau von Sekretproteinen wichtige Enzym, die Sialidase, gegenüber dem 2dGal-modifizierten Glykoprotein weniger affin ist. Die 2dGal stellt somit eine wichtige Möglichkeit zur Modulation der Sialidase-Affinität dar. Wie die Ergebnisse zu den K-562-Zellen zeigten, ist die Wirkung der 2dGal von den Enzymen der Zelle abhängig und für nachfolgende Experimente mit anderen Systemen zu testen. Offenbar benötigt die Sialidase die Hydroxylgruppe am C-2-Atom der Galactose, um an das Substrat binden zu können. Mit diesem Befund wird ein neues Gebiet über die Substrat-Rezeptor-Affinität von Sialidase und Sialoglykoprotein aufgetan, das späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben muss.

Die Veränderung des Verhaltens von 2dGal-modifizierten N-Glykanen gegenüber Sialidasen wurde mittels Enzymbehandlung der Sialidase A durchgeführt. Diese besitzt eine niedrige Spezifität gegenüber der Verknüpfung der Sialinsäure zum Glykan, so dass der Versuch relativ unabhängig von den zelltypischen Transferasen stattfand. Die isolierten N-Glykane aus Zellen ohne und mit 2dGal-Supplementation wurden mit verschiedenen Sialidase A-Konzentrationen behandelt und anschließend nach ihrer Ladung mittels HPLC aufgetrennt. Aus dem Vergleich mit den nicht Enzym-behandelten Proben konnten die Resistenzen ermittelt werden.

Für die CHO-Zellen wurde eine fast vollständige Resistenz festgestellt (Abbildung 62, S. 104), die im Vergleich zur Probe ohne 2dGal-Anwesenheit um den Faktor 4,6 höher lag. Die Kontrolle zeigte eine konzentrationsabhängige Abspaltung der Sialinsäuren, die in CHO-Zellen nur α 2,3-verknüpft vorliegen. Auch bei den K-562-Zellen hatte die 2dGal den erhofften Effekt: der Einbau von 2dGal führte zu einer um das 1,3fache erhöhten Resistenz (Abbildung 64, S. 105). Im Gegensatz dazu wiesen die Oligosaccharide mit dem Einbau der 2dGal aus den HEK293-Zellen eine geringere Resistenz auf (Abbildung 66, S. 106). Der Gehalt an geladenen Strukturen nach dem Sialidase-Verdau war im Vergleich zur un-supplementierten Probe um das 1,6fache erniedrigt. Die Ursache dieser Unterschiede kann nur durch weitere Analysen festgestellt werden. Die höchste Einbaurate der 2dGal mit 62% in CHO-Zellen gegenüber 23-25% in HEK293 bzw. K-562 kann nicht der einzige Grund für die fast vollständige Resistenz sein. Auch die zelltypspezifischen Enzyme der Glykosylierung könnten Unterschiede in den Verknüpfungen von GlcNAc zu 2dGal und von 2dGal zur Neu5Ac hervorrufen. Weiterhin sind Untersuchungen zur zusätzlichen Galactosylierungen des antennären GlcNAc notwendig, da diese weitere Gal eventuell einen Einfluss auf die Spaltbarkeit der terminalen Sialinsäure-Bindung hat. Ein Einfluss der in CHO-Zellen vorkommenden Neu5Gc ist auszuschließen, da diese in den DMB-Quantifizierungen kaum nachzuweisen war.

Eine erhöhte Sialidase-Resistenz sollte theoretisch durch eine hohe Sialylierung eines Glykans oder/und die reduzierte Bindung bzw. Aktivität des abspaltenden Enzyms erreicht werden. Letzteres war das Ziel der 2dGal-Supplementationen. Die 2-Desoxy-D-Galactose könnte z. B. direkt durch die Interaktion mit einer Aminosäure die Bindungsaffinitäten von Sialidasen

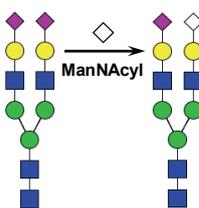
beeinflussen. Weiterhin wäre durch die fehlende Hydroxylgruppe eine Änderung der 3-dimensionalen Struktur des Glykan-Terminus denkbar, so dass das aktive Zentrum des Enzyms sich nicht optimal positionieren kann. Für dieses Experiment mit der Modifikation der subterminalen Galactose stehen keine vergleichbaren Daten zur Verfügung, so dass die Hypothesen nicht mit Daten unterlegt werden können. Die in der Literatur beschriebenen Modifikationen von Monosacchariden betreffen immer direkt die Sialinsäuren (s. 4.2.2).

Für verschiedene prokaryotische Sialidasen wurde zuerst eine katalytische, sowie eine inhibitorische Domäne identifiziert (Taylor *et al.*, 1992). Weitere Untersuchungen zeigten eine Kohlenhydrat-Binde-Domäne, welche starke Sequenz-Ähnlichkeiten zu eukaryotischen Galactose-Bindemotiven aufwies (Gaskell *et al.*, 1995). Die Lectin-ähnliche Domäne der Sialidase aus *Vibrio cholerae* (Crennell *et al.*, 1994) postulierte eine räumliche Trennung von katalytischem- und Substrat-bindendem Zentrum im inaktiven Enzym für weitere Sialidasen. Die Galactose-Bindestellen der Trans-Sialidase von *Trypanosoma cruzi* wurden im N-Terminus des Enzyms gefunden (Chuenkova *et al.*, 1999; Todeschini *et al.*, 2000). In NMR-Studien zur Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* konnte dann ebenfalls die Position der Sialinsäure-Bindung in der Lectin-Domäne ermittelt werden (Moustafa *et al.*, 2004). Mit dem Nachweis der Bindung von Galactose und Lactose wurden *carbohydrate binding module* (CBM) formuliert (Newstead *et al.*, 2005; Boraston *et al.*, 2007). Diese dienen der Substraterkennung und somit der richtigen Lokalisation des katalytischen Zentrums. Die räumlich nahe Interaktion zwischen den beiden Regionen wird durch Immunglobulin-ähnliche Domäne ermöglicht. Diese Ergebnisse verdeutlichen eine Bindung von Kohlenhydraten an eine spezifische Region der Sialidasen. Dabei ist nicht nur die abzuspaltende Sialinsäure relevant, sondern auch die nachfolgende Galactose. Die in den Versuchen dieser Arbeit verwendete 2dGal könnte somit direkt die Affinität und Aktivität der Sialidase beeinflussen. Dieses wäre jedoch abhängig vom jeweiligen Enzym und möglicherweise auch von der Art der Verknüpfung zur Sialinsäure.

Das Ziel der Resistenzerhöhung gegenüber Sialidasen durch die Modifikation von N-Glykanen mittels 2dGal-Einbau war für zwei der drei verwendeten Zelllinien nachweisbar. Für die genaue Darstellung der Wirkung des Analogons müssen weitere Experimente durchgeführt werden.

4.2. Supplementation mit Analoga von Sialinsäure-Vorläufern

4.2.1. Metabolisierung und Einbau nicht-physiologischer Sialinsäuren



Durch den Zusatz von N-Propanoylmannosamin (anstelle des natürlichen N-Acetylmannosamin) konnte der Einbau der daraus resultierenden N-Propanoylneuraminsäure in die Glykanfraktion der Membranfraktionen der Zellen nachgewiesen werden. Damit wurden Ergebnisse von Keppler *et al.*, (1995, 1998) und Herrmann *et al.*, (1997), die an anderen Zellen erhoben

wurden, bestätigt. Daraus darf geschlossen werden, dass dieses „Biochemical Engineering“ der N-Acyl-seitenkette der Neuraminsäure für eine Vielzahl von Zellen, die in Kultur gehalten werden, gilt. Die Affinität der Enzyme zur Biosynthese der Neuraminsäuren war abhängig von der Länge der Seitenkette (Jacobs *et al.*, 2001; Keppler *et al.*, 2001). Durch Untersuchungen von R. Schnaar ist bekannt, dass peracetylierte Mannosamine sehr viel besser in die Zellen gelangen (Collins *et al.*, 2000). Die Ursache dafür ist in der Hydrophilie dieser Substanzen zu suchen, die keinen Transporter benötigen, sondern die lipophile Membran unkontrolliert passieren können. Durch die Umgehung dieser hochspezifischen Kontrollstelle gelangt mehr Zucker ins Zellinnere. In der Zelle wird die Acetatgruppe durch die ubiquitäre und relativ unspezifische Deacetylase abhydrolysiert. Bis zu einer Konzentration von 0,6 mM peracetylierter Zucker wird das Wachstum der Zellen nicht beeinflusst. Bei höheren Konzentrationen ist die Kapazität des intrazellulären Puffersystems überschritten. Daher wurden alle Versuche mit peracetylierten Mannosaminen bei 0,5 mM durchgeführt. Die Größe des Acyl-Restes der derivatisierten Seitenkette sollte die Anzahl von fünf C-Atomen nicht überschreiten, da dies dann einen negativen Einfluss auf die Biosynthese der Sialinsäure hat (Jacobs *et al.*, 2001). Aus den möglichen Analoga wurden die in Abbildung 28 (S.75) dargestellten Moleküle ausgewählt.

Der Nachweis des Einbaus wurde am Beispiel von ManNCProp in der Abbildung 67 (S. 107) gezeigt. Ab einer Konzentration von 0,6 mM wiesen die Zellen für alle Analoga eine Abnahme der unnatürlichen Sialinsäuren auf. Die danach folgenden Experimente wurden mit jeweils 0,5 mM durchgeführt. Die Einbauraten der Mannosamin-Derivate sind in der Abbildung 68 (S. 108) dargestellt und zeigen eine Abhängigkeit vom Analogon. Die Differenzen zwischen den Zellen sind relativ gering. Die nachgewiesenen neuen Sialinsäuren in der Abbildung 86 hatten einen Anteil von ca. 45% (NeuNPent) bis zu 92% (ManNCProp). In anderen Experimenten zu Bindungen zwischen einem Glykan und dem Rezeptor waren, in Abhängigkeit von den verwendeten Zellen und Analoga, Einbauraten von 20-60% zu verzeichnen (Keppler *et al.*, 1995; Herrmann *et al.*, 1997; Keppler *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2000; Mantey *et al.*, 2001).

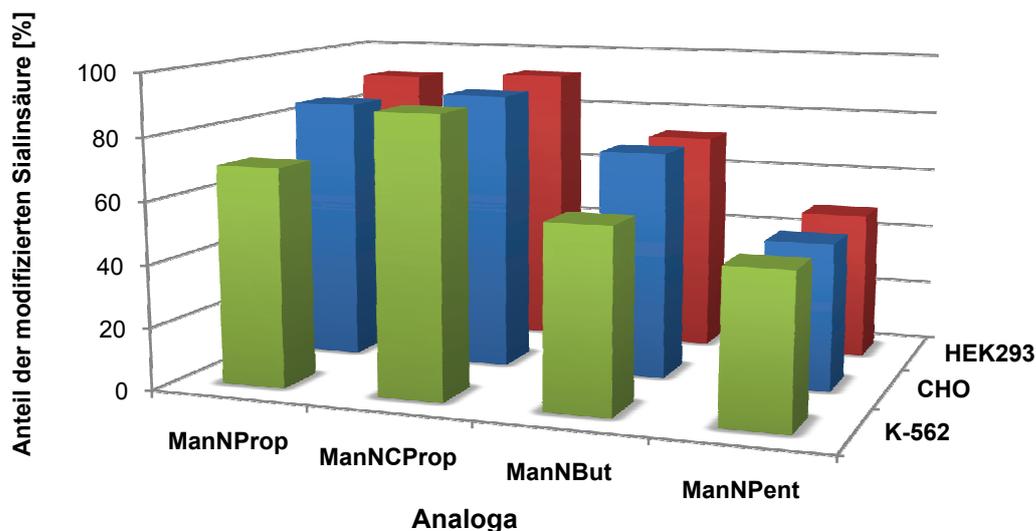


Abbildung 86: Prozentualer Einbau der ManNAcyI-Derivate in den Zelllinien CHO, HEK293 und K-562

Die Vergleiche ohne/mit Supplementation innerhalb einer Zelllinie zeigte keine auffälligen Unterschiede in den gebildeten N-Glykanen oder deren Anteile am Gesamtprofil (Daten nicht gezeigt). Somit waren mittels der analytischen Methoden keine deutlichen Auswirkungen der Analoga auf die Biosynthese der isolierten Glykane nachweisbar. Das ähnliche Verhalten von verschiedenen Zelllinien spricht ebenfalls für eine geringe Beeinflussung. Aufgrund der Diversität von Sialinsäuren (Varki, 1992; Reuter & Gabius, 1996; Angata & Varki, 2002) war für die Sialyltransferasen eine variable Substrat-Affinität zu erwarten, da die Zellen die Translation von vielen sehr spezifischen Enzymen vermeiden.

Die ManNAcyI-Derivate eignen sich aufgrund ihrer Variabilität und geringer Auswirkung auf das System der Glykan-Biosynthese für die Modulation von Sialinsäure-beteiligten Kohlenhydrat-Interaktionen.

4.2.2. Untersuchungen zur Sialidase-Resistenz von Glykanen

Die Versuche zur Sialidase-Resistenz von Glykanen mit nicht physiologischen Sialinsäuren erfolgten analog zu denen mit der 2dGal. Die Kontrolle und auch die supplementierten Proben werden einer Sialidase C-Behandlung unterzogen und die verbleibenden geladenen Glykane quantitativ verglichen. Die Abbildung 70 (S. 110) zeigt das Ergebnis für die CHO-Zellen. Die Analoga ManNBut und ManNPent vermitteln die höchste Resistenz, welche sich um das ca. 2,5fache zur unsupplementierten Probe unterscheidet. In HEK293-Zellen (Abbildung 71, S. 110) ist das Ergebnis ähnlich, jedoch mit einer maximalen Erhöhung um das 1,6fache. Das ManNCProp weist im Vergleich zu den CHO-Versuchen eine höhere Resistenz auf. Dabei ist zu beachten, dass die Anteile der sialylierten Strukturen in CHO-Zellen nach 16 Stunden Sialidase-

Behandlung nur noch 20% der Ausgangsmenge betragen, hingegen in HEK-Zellen noch über 50% vorhanden sind.

Der Einfluss auf die Halblebenszeit wurde z. B. für das CEACAM1 untersucht (Horstkorte *et al.*, 2001). Der Einbau von ca. 25% Neu5NProp in PC12-Zellen (5 mM ManNProp in der Zellkultur) veränderte diesen Wert von 26 auf 40 Stunden. Dieses Ergebnis resultierte aus zeitabhängigen Zellisolierungen und wurde nicht mit spezifischen Enzymen durchgeführt. Aufgrund von mangelnden Vergleichsdaten sind hier nur Hypothesen möglich.

Die in dieser Arbeit verwendeten N-Acetylmannosamin-Analoga mit den niedrigsten Einbauraten der resultierenden Sialinsäuren zeigten die höchste Resistenz gegenüber der Sialidase C. Eventuell führt die längere Seitenkette von ManNBut und ManNPent zu einem geringeren Einbau in die N-Glykane, jedoch ist die N-Acylseitenkette der wirksame Faktor zur Verminderung der Sialidase-Affinität bzw. -Aktivität. Ob der geringere Einbau dieser beiden Analoga bereits auf eine verminderte Synthese der entsprechenden Sialinsäuren oder auf die Sialyltransferasen zurückzuführen ist, wäre ein Thema weiterführender Experimente.

Die Beeinflussung der Affinität und/oder Aktivität der Sialidasen wurde bereits im Abschnitt zur 2dGal-Supplementation geschildert. Das Enzym besitzt verschiedene Domänen: a) die katalytische, b) eine inhibitorische und c) eine Lectin-ähnliche Domäne zur Bindung von Kohlenhydraten. Ein Immunglobulin-ähnlicher Bereich d) vermittelt vermutlich die Interaktionen zwischen a) und c) (Crennell *et al.*, 1994; Gaskell *et al.*, 1995; Newstead *et al.*, 2005). Von großem Interesse wäre, ob bzw. wie sich diese Domänen aufgrund von d) gegenseitig beeinflussen (Newstead *et al.*, 2005; Boraston *et al.*, 2007). Die schwache Bindung an eine terminale Glykan-Struktur führt eventuell nicht zur korrekten Ausbildung des aktiven Zentrums oder vermindert die Aktivität. Andererseits könnte eine Derivatisierung der Sialinsäure zu einer nicht optimalen Bindung an das katalytische Zentrum führen, die die Affinität der Kohlenhydrat-Domäne herabsetzt.

Die Ergebnisse der Glykan-Modifikationen mittels Mannosamin-Derivaten und 2-Desoxy-Galactose wurden aus *in vitro*-Versuchen gewonnen und können somit, im Hinblick auf medizinische Anwendungen, nicht direkt auf das Verhalten im humanen System übertragen werden. Jedoch stellt diese Methodik eine gute Möglichkeit der Modulation von Glykan-bindenden Prozessen dar.

4.3. Auswertung von Daten aus der Massenspektrometrie

Die Komplexität von Glykan-Strukturen, sowie die erhaltene Datenmenge aus der Massenspektrometrie führen zu einer relativ zeitaufwendigen Auswertung der Spektren. Für die Protein-Analyse stehen bereits Anwendungen, für z. B. Massenberechnungen, Sequenzierungen, erweiterte Fragmentierungen und automatische Datenbanksuchen in der Geräte-Software zur Verfügung. Zum Thema der Glykomik sind leider kaum Hilfestellungen vorhanden.

Zu Beginn dieser Arbeit erfolgte die Berechnung von Molekülmassen und die Datenspeicherung mit einer Standard-Tabellenkalkulations-Software. Dies erwies sich mit zunehmender Probenanzahl als zu ineffektiv und nicht ausreichend systematisch. Aus diesem Grund wurde die unspezifische Datenbank-Software *Filemaker* zum Aufbau der themenbezogenen Anwendung *GlycoProtMass* genutzt (s. 3.5.1). Mit dieser konnten nach mehreren Entwicklungsschritten die molekularen Massen von Glykanen, Peptiden und Glykoproteinen kalkuliert und gleichzeitig mit Zusatzinformationen in einer internen Datenbank abgespeichert werden. Für die Kalkulationen wurde die Auswahl von Polaritäten der MS, vorhandenen Ionen, Ladungszuständen und Modifikationen implementiert. Die separat erstellten Archive für Glykane und Peptide können direkt miteinander zur Berechnung von Glykokonjugaten verwendet werden. Innerhalb der aufgebauten Datenbank ist die Suche und Sortierung nach jedem Feld (Masse, Probe, Ionen, Anzahl eines Monosaccharides in der Struktur, u.a.) möglich. Dieses setzt natürlich die ausreichende und korrekte Eingabe der Daten voraus. Weiterhin ist die Form und der Inhalt der Datenausgabe frei definierbar, so dass Listen oder Datenblätter in Abhängigkeit vom Verwendungszweck erstellt werden können. Eine wichtige Funktion ist die Archivierung der Strukturen von mehreren Anwendern in einer Datenbank. Hierfür sollte jeder Nutzer der MS-Geräte die gefundenen Glykane mit den Informationen zu Projekt-Nummer, Zelllinien, Probe, Protein, Messmodus, Referenz, usw. in eine eigene Datei eintragen. Diese werden in einer einzelnen Datenbank vereint, so dass jeder Nutzer auf bereits gewonnene Daten Zugriff hat. Dies ermöglicht eine effektivere Arbeitsweise, da Proben-abhängige Spezifikationen bereits ein- oder ausgeschlossen werden können. Mit der letzten Version 3.0 von *GlycoProtMass* sind neue Massen-relevante Modifikationen für Glykane und Proteine ohne Veränderung der Berechnungsformeln möglich. Hierfür muss in den jeweiligen „Basics“-Dateien (3.5.1) ein Name und die entsprechende Änderung der Masse nach Derivatisierung des Oligosaccharides bzw. Peptides angegeben werden. Dieses steht dann in der Modifikationsauswahl zur Glykan- und Protein-Berechnung zur Verfügung und wird bei den Kalkulationen berücksichtigt. Der Export/Import von Daten in/aus anderen Datei-Formaten (txt, cvs, xls, u.a.) erlaubt die temporäre Nutzung von Daten ohne das Vorhandensein der Software und den Informationsaustausch zwischen den Nutzern dieser Anwendung.

Die für die weitere Spektren-Analyse verwendeten Hilfsmittel waren aus dem Internet beziehbare Programme bzw. direkt online nutzbare Datenbanken (s. 2.12). Eine systematische Interpretation von Daten aus ESI-IonTrap- und MALDI-TOF(/TOF)-Spektrometrien war mit den seit dem Jahr 2007 genutzten Anwendungen GlycoWorkbench (Ceroni *et al.*, 2008) und GlycoPeakfinder (Maass *et al.*, 2007) möglich. Deren Nutzung zeigte einige Probleme, die auch in Gesprächen mit den Entwicklern diskutiert wurden. Die fehlende oder unzureichende Abspeicherung von gewonnenen Daten, die fehlende Möglichkeit der Angabe von eigenen Informationen und die nur separate Nutzung beider Programme waren die Hauptkritikpunkte. Aktuelle Versionen sowohl von GlycoWorkbench, als auch GlycoPeakfinder (Stand Juni 2008) weisen hierzu positive Veränderungen auf, die jedoch im Kapitel Methoden dieser Arbeit noch nicht berücksichtigt werden konnten.

Für die Auswertungen von MS-Daten diente die GlycoWorkbench bei der Fragmentierungs-Analyse von bekannten Strukturen, während der GlycoPeakfinder aus gewonnenen MS oder MSⁿ-Daten korrelierende Glykan-Strukturen in den verschiedenen externen Datenbank sucht. Die Archivierung der Ergebnisse und die Kalkulation von molekularen Massen erfolgten mit GlycoProtMass, so dass die Kombination dieser 3 Anwendungen die bisher effektivste Methode zur Glykan-Identifizierung aus MS-Daten darstellt.

4.4. Aussichten

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit folgen neue Fragestellungen und weitere Experimente. Für die genaue Darstellung der Wirkung des Analogons 2dGal müssten die Bindungen der Galactose und der 2-Desoxy-Galactose zum GlcNAc bzw. zur Sialinsäure charakterisiert werden. Zusätzliche Bindungsstudien zwischen den terminalen Glykan-Strukturen und verschiedenen Sialidasen könnten eine weitere Optimierung des Analogon ermöglichen. Diese Versuche sollten von der in dieser Arbeit erläuterten Untersuchung von Gesamt-Glykanen aus Zellen auf die Modifikation von Oligosacchariden einzelner exprimierter Glykoproteine übertragen werden.

Weiterhin wären weitere strukturelle Änderungen für die Seitenkette am C-5-Atom von Sialinsäuren zu untersuchen. Im Mittelpunkt der internationalen Forschung stehen die Sialidasen von Influenza-Viren (Oxford, 2000; Byrne *et al.*, 2007; von Itzstein, 2008). Die Suche nach geeigneten Inhibitoren der viralen Sialidase (Ikeda *et al.*, 1998; Keppler *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2002; Matrosovich & Klenk, 2003; Russell *et al.*, 2006; Chokhawala *et al.*, 2007; von Itzstein, 2007) könnte auch Informationen für weitere Analoga von Sialinsäure-Vorläufern bieten. In Hinblick auf die pharmazeutische Anwendung muss das Potential der verwendeten Analoga als Antigen in in vivo-Versuchen geklärt und die Resistenzen von modifizierten Glykanen mittels humaner Sialidasen untersucht werden.

Die Veränderung der Sialidase-Aktivität unter gleichzeitiger Anwesenheit von 2dGal und nicht natürlicher Sialinsäuren wäre ein weiteres interessantes Experiment. Vielleicht führt diese Kombination zu einer zusätzlichen Resistenz-Steigerung.

Die zusätzliche Erhöhung des Sialylierungsgrades von Glykoproteinen mit Analoga-Einbau könnte durch die Verwendung von GNE-Mutanten erreicht werden (Bork *et al.*, 2007). Die resultierenden Oligosaccharide sollten nach dem bisherigen Wissensstand eine deutlich geringere zeitabhängige Desialylierung vorweisen, als die nativen Glykane.

Im Rahmen der Verwendung von GlycoProtMass ist das direkte Importieren von Daten aus der GlycoWorkbench anzustreben, um eine manuelle Eingabe der Struktur-Daten zu umgehen. Aufgrund der notwendigen Software *Filemaker* ist die Anwendung von GlycoProtMass nur eingeschränkt möglich. Die Umsetzung des Prinzips in eine frei nutzbare Programmiersprache würde eine höhere Mobilität und eine Plattform-unabhängige Nutzung ermöglichen.