

## **5. ZUSAMMENFASSUNG**

Die Sialylierung von Glykokonjugaten ist essentiell für eine Vielzahl von Prozessen in und zwischen Zellen. Neben Zelldifferenzierungen, Entzündungsreaktionen, Zell-Adhäsionen und Pathogenesen ist die Beeinflussung der Stabilität von Glykoproteinen im Serum von Bedeutung. Die Abspaltung der terminalen Sialinsäuren durch Sialidasen ermöglicht die Bindung an den Asialoglykoprotein-Rezeptor und der Abbau des Glykoproteins wird eingeleitet. Durch die gezielte Modifikation einzelner Monosaccharide sollte die Aktivität der Sialidasen beeinflusst und im Vergleich zu nativen Oligosacchariden bestimmt werden.

Nach der Supplementation der Zelllinien CHO (murin), sowie HEK293 und K-562 (human) mit 2-Desoxy-Galactose konnte ein konzentrationsabhängiger Austausch gegen die subterminale Galactose durch HPLC- und MS-Methoden nachgewiesen werden. Der Anteil von 62 % 2-Desoxy-D-Galactose in CHO-Zellen führte zu einer fast vollständigen Resistenz gegenüber der unspezifischen Sialidase A. In den humanen Zelllinien wurden Einbauraten zwischen 23 und 25% festgestellt. Während die K-562-Zellen im Vergleich zu nicht-modifizierten Glykanen eine 1,6fach erhöhte Sialidase-Resistenz aufwiesen, war diese in den HEK293-Zellen erniedrigt. Generell erfolgte in Anwesenheit der 2-Desoxy-D-Galactose eine reduzierte Glykosylierung.

Die terminale Präsenz nicht-natürlicher Sialinsäuren in Glykanen hatte keine Änderung des Glykan-Profiles zur Folge. Die an der Acetyl-Gruppe modifizierten N-Acetylmannosamine wurden entsprechend dem nativen Vorläufer zu neuen Neuraminsäuren umgesetzt und erreichten in den Glykoproteinen der Zellen einen Anteil von 45-92%. Die höchsten Sialidase C-Resistenzen in der murinen (CHO) und humanen Zelllinie (HEK293) konnten für die Analoga N-Butanoyl- und N-Pentanoylmannosamin festgestellt werden, die gleichzeitig die geringsten Einbauraten vorwiesen. Die Menge an messbaren sialylierten Strukturen nach der Enzymbehandlung erhöhte sich um das maximal 2,5fache (CHO) bzw. 1,6fache (HEK293) in Anwesenheit artifizieller Neuraminsäuren. Somit stellen beide Modifikationen, 2dGal und N-Acylmannosamine, eine Möglichkeit zur Verlängerung der Halblebenszeit von Glykoproteinen dar.

Die Optimierung der Massenspektrometrie-Methodik und die Etablierung der Fragmentierung mittels Ionenfallen-Technik ermöglichte die Glykan-Charakterisierung ohne Fluoreszenz-Markierung mit HPLC-Auftrennungen. Die Auswertung der erhaltenen MS-Daten wurde mit Hilfe von online verfügbaren Programmen standardisiert. Für die Kalkulation der molekularen Massen von Glykanen, Peptiden und Glykoproteinen war der Aufbau einer Datenbank-basierenden Anwendung erforderlich. Das resultierende GlycoProtMass ermöglichte sowohl die Berechnungen von Molekülmassen, als auch deren Archivierung mit zusätzlichen Informationen.