

2 Ergebnisse

2.1 The intracellular concentration of sialic acid regulates the polysialylation of the neural cell adhesion molecule

2.1.1 Zusammenfassung

Die Polysialylierung von NCAM spielt eine wichtige Rolle während der embryonalen Gehirnentwicklung und der neuronalen Regeneration. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, welchen Einfluss die intrazelluläre Sialinsäurekonzentration auf die beiden Polysialyltransferasen ST8SiaIV und ST8SiaII hat. Ausgehend von PSA-negativen CHO-Zellen (2A10) wurden zwei neue CHO-Zelllinien (2A10-ST8SiaIV und 2A10-ST8SiaII) generiert, die jeweils nur eine der beiden Polysialyltransferasen exprimierten. Die verschiedenen Zelllinien (2A10, 2A10-ST8SiaIV und 2A10-ST8SiaII) wurden mit ManNAc supplementiert. ManNAc ist ein Sialinsäurevorläufer, der von den Zellen aufgenommen und so der Sialinsäurebiosynthese zugeführt werden kann. Nach Supplementation mit ManNAc kam es in allen Zelllinien zu einem bis zu dreifachen Anstieg der intrazellulären Sialinsäurekonzentration. Dieser war abhängig von der Dauer der ManNAc-Supplementation und der eingesetzten ManNAc-Konzentration. Bis zu einer Inkubationszeit von 48 Stunden stieg die Sialinsäurekonzentration stetig an; längere Inkubationszeiten führten zu keiner weiteren Erhöhung. Bei den eingesetzten ManNAc-Konzentrationen kam es bis zu einer Konzentration von 50 mM zu einem Anstieg der Sialinsäurekonzentration. Bei höheren Konzentrationen wirkte das ManNAc aufgrund der veränderten Osmolarität im Medium zunehmend toxisch.

Die erhöhte Sialinsäurekonzentration führte zu einer deutlichen Zunahme von polysialyliertem NCAM (PSA-NCAM) in den beiden Polysialyltransferase exprimierenden Zelllinien. Dies zeigt, dass sowohl die ST8SiaIV als auch die ST8SiaII über die intrazelluläre Sialinsäurekonzentration reguliert werden können. Eine

signifikante Erhöhung der gesamten Sialylierung von Glycokonjugaten konnte nicht nachgewiesen werden.

Um die Ergebnisse mit einer von ManNAc unabhängigen Steigerung der Sialinsäurekonzentration zu bestätigen, wurde in den Zelllinien die GNE-R263L exprimiert. Die GNE-R263L ist durch die Sialurie-Mutation nicht mehr „*feedback*“-inhibiert, was zu einem Anstieg der Sialinsäurekonzentration führt. In den CHO-Zellen konnte so die intrazelluläre Sialinsäurekonzentration verdoppelt werden. Hierdurch kam es, wie bei den ManNAc supplementierten Zellen, ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme von PSA-NCAM.

Des Weiteren zeigte sich bei der Untersuchung der intrazellulären Verteilung der Sialinsäure, dass deren Konzentration im Kern höher ist als im Cytosol.

2.1.2 Publikation

Bork K, Reutter W, Gerardy-Schahn R, Horstkorte R.

The intracellular concentration of sialic acid regulates the polysialylation of the neural cell adhesion molecule.

[FEBS Lett. 2005 Sep 12;579\(22\):5079-83.](#)

2.2 Enhanced sialylation of EPO by overexpression of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc-kinase containing a sialuria mutation in CHO cells

2.2.1 Zusammenfassung

Es sollte untersucht werden, ob die Expression von GNE-R263L in eukaryontischen Expressionzelllinien zu einer höheren Sialylierung von rekombinant hergestellten Glycoproteinen führt.

Dazu wurden CHO-Zellen mit einem Expressionsvektor (pL748-pKex-EPO) für rekombinantes humanes EPO (rhEPO) transfiziert, um eine Zelllinie zu erhalten die rhEPO als rekombinantes Modellglycoprotein stabil exprimiert. Mit Hilfe der Hygromycin-Resistenz des Expressionsvektors wurden einzelne Klone selektiert. Das Expressionsniveau der einzelnen Klone wurde getestet und der Klon mit der höchsten EPO-Expression (CHO-EPO) wurde für die weiteren Versuche genutzt. Unter Zuhilfenahme eines pcDNA3.1-Zeocin(-)-Expressionsvektors wurde in den CHO-EPO-Zellen GNE-R263L stabil exprimiert. Um die Funktionalität der Sialurimutation zu untersuchen, wurde die intrazelluläre Sialinsäurekonzentration von 14 CHO-EPO-GNE-R263L-Klonen bestimmt. Bei der Mehrzahl der Klone lag die Konzentration über der Konzentration von CHO-EPO-Zellen, die mit 10 mM ManNAc supplementiert wurden (40 fmol/Zelle). Die höchste Konzentration wurde in Klon 5 gemessen und war mit 90 fmol/Zelle sechsmal höher als in unbehandelten CHO-Zellen. Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der erhöhten Sialinsäurekonzentration auf die Sialylierung von EPO bestimmt. Aufgrund der negativen Ladung der Sialinsäuren bedingt eine Veränderung der Sialylierung eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes (pI) des sialylierten Proteins. Durch isoelektrische Fokussierung mit anschließendem „*Western-Blotting*“ und Immunodetektion mit einem Anti-EPO-Antikörper wurde der Grad der Sialylierung des EPOs bestimmt. Das von CHO-EPO-Zellen exprimierte EPO wies eine heterogene Sialylierung auf. Die Supplementation der Zellen mit 10 mM ManNAc führte zu einer Verringerung der Heterogenität der Sialylierung und das von den CHO-EPO-GNE-R263L-Zellen exprimierte EPO zeigte eine fast homogene Sialylierung. Hier lagen

nahezu alle EPO-Moleküle als hoch sialylierte Form mit einem pI von 4,2 vor. Dies zeigt, dass die Expression von GNE-R263L in CHO-Zellen zu einer verstärkten Sialylierung von rekombinant exprimiertem EPO führt. Ein Proliferationsassay ergab zudem, dass durch die Expression der GNE-R263L die Proliferationsrate der CHO-Zellen nur um 5% abnahm, wohingegen die Supplementation mit 10 mM ManNAc eine um 10% geringere Proliferationsrate bedingte.

2.2.2 Publikation

Bork K, Reutter W, Weidemann W, Horstkorte R.

Enhanced sialylation of EPO by overexpression of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManAc kinase containing a sialuria mutation in CHO cells.

[FEBS Lett. 2007 Sep 4;581\(22\):4195-8.](#)

2.3 N-Propanoylmannosamine interferes with O-GlcNAc modification of the tyrosine 3-monooxygenase and stimulates dopamine secretion

2.3.1 Zusammenfassung

N-Propanoylmannosamin (ManNProp) ist ein neuartiger, synthetischer Sialinsäurevorläufer. Es konnte gezeigt werden, dass ManNProp das Neuritenwachstum von Oligodendrozyten und PC12-Zellen stimuliert. Neuritenwachstum kann ebenfalls durch den Nervenwachstumsfaktor NGF („*nerve growth factor*“) induziert werden, was gleichzeitig auch zu einer erhöhten Dopaminsekretion führt. Deshalb sollte untersucht werden, ob die Behandlung von PC12-Zellen (Pheochromocytoma-Tumorzelllinie der Ratte) mit ManNProp ebenfalls einen Einfluss auf die Dopaminsekretion hat.

Zunächst wurde die Dopaminsekretion von unbehandelten PC12-Zellen quantifiziert, sie lag bei 0,8 ng/ml. Anschließend wurden die PC-12-Zellen für 48 Stunden mit ManNProp supplementiert. Bei den so behandelten Zellen stieg die Dopaminsekretion um 38%.

Um die molekularen Ursachen für diese verstärkte Sekretion zu ermitteln, wurde im Weiteren untersucht, ob die Behandlung mit ManNProp und NGF Einfluss auf das Schlüsselenzym der Dopaminbiosynthese, die Tyrosin-3-Monooxygenase (T3M), hat. Die Expression der T3M in PC12-Zellen zeigte nach Inkubation mit ManNProp bzw. NGF keine Veränderung. Da die T3M über Phosphorylierung aktiviert wird und O-GlcNAc eine Phosphorylierung verhindert, wurde die Expression von O-GlcNAc im cytosolischen Extrakt von unbehandelten und behandelten PC12-Zellen analysiert. Es zeigte sich, dass nach induziertem Neuritenwachstum durch Zugabe von ManNProp oder NGF die O-GlcNAcylierung von zwei Proteinen stark abnahm. Eines dieser beiden Proteine war die T3M, bei der die Menge an konjugiertem O-GlcNAc um 80% sank. Bei der Untersuchung der Phosphorylierung der T3M in PC12-Zellen ergab sich, dass diese nach Behandlung mit ManNProp oder NGF um 35% anstieg. Der durch ManNProp und NGF vermittelte Anstieg der Dopaminsekretion wird somit nicht über

die Expression der T3M reguliert, sondern ist auf die veränderte O-GlcNAcylierung und die verstärkte Phosphorylierung der T3M zurückzuführen.

2.3.2 Publikation

Bork K, Kannicht C, Nöhring S, Reutter S, Weidemann W, Hart G and Horstkorte R.

N-Propanoylmannosamine interferes with O-GlcNAc modification of the tyrosine 3-monooxygenase and stimulates Dopamine secretion

[J Neurosci Res. 2007 Sep 26](#)

