

3 Diskussion

Viele pathologische Veränderungen sind mit einer Dysregulation des Sialinsäurestoffwechsels assoziiert. Eine erhöhte Sialylierung von Glycokonjugaten ist bei einer Vielzahl von malignen Tumoren vorzufinden und ist oft mit einer schlechten Prognose verbunden (Jayant et al., 2007; Suzuki et al., 2006). Auch wird die Konzentration freier Sialinsäuren im Blut häufig als Tumormarker herangezogen (Sebzda et al., 2006). Eine veränderte Serumkonzentration freier Sialinsäuren ist jedoch eher ein generelles Anzeichen für eine pathologische Veränderung und tritt unter anderem auch bei Langzeit-Alkoholmissbrauch auf (Chrostek et al., 2007; Kurtul et al., 2006; Kurtul et al., 2005). Dies legt nahe, dass die Regulation des Sialinsäurestoffwechsels mit zentralen zellulären Prozessen verknüpft ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der intrazellulären Sialinsäurekonzentration durch Supplementation mit ManNAc oder die Expression von GNE-R263L in CHO-Zellen nicht zwingend zu einem allgemeinen Anstieg der Sialylierung von Glycokonjugaten führt. Eine alleinige Zunahme der Sialinsäurekonzentration kann somit nicht die erhöhte Sialylierung von Glycokonjugaten in malignen Tumoren erklären. Vielmehr muss hierfür zusätzlich eine erhöhte Expression geeigneter Akzeptormoleküle vorliegen. Die verstärkte Sialylierung von NCAM in CHO-Zellen, die in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist durch die Besonderheit der Polysialylierung zu erklären, die eine nahezu unlimitierte Akzeptorstelle bietet. Eine durch einen Anstieg der intrazellulären Sialinsäurekonzentration auftretende verstärkte Polysialylierung von NCAM, könnte auch die Ursache für die bei Sialurie-Patienten beschriebenen Entwicklungsverzögerungen (Ferreira et al., 1999) sein, denn die Polysialylierung von NCAM verändert die synaptische Plastizität, die im Laufe der Entwicklung stark abnimmt (Rutishauer et al., 1988). Welchen genauen Einfluss eine solche erhöhte synaptische Plastizität hat, ist nicht geklärt. Bekannt ist, dass sich eine verringerte Polysialylierung auf die Entwicklung bestimmter Hirnregionen auswirkt (Angata et al., 2007; Gascon et al., 2007). So kommt es bei „*knock-out*“-Mäusen, die nur eine der beiden

Polysialyltransferasen (ST8SiaII^{-/-} oder IV^{-/-}) exprimieren, zu leichten Defekten im Hippocampus. Im Gegensatz dazu zeigen Doppel-, „knock-out“-Mäuse (ST8SiaII^{-/-} und IV^{-/-}) einen lethalen Phänotyp mit spezifischen Defekten im Hirn (Weinhold et al., 2005; Galuska et al., 2006; Brocco et al., 2006). Es wird diskutiert, dass eine Erhöhung der Polysialylierung aufgrund der erhöhten Plastizität zu einer verbesserten Regenerierung von Axonen im zentralen Nervensystem führen kann (El Maarouf et al., 2005). Bisherige Versuche in Mäusen zeigten bei erhöhter Polysialylierung von NCAM in Astrozyten eine leicht erhöhte axonale Regeneration der Pyramidenbahn (*Tractus corticospinalis*) nach partieller Läsion. Zur Erhöhung der Polysialylierung wurde in diesen Versuchen, mittels eines viralen Vektors, die Polysialyltransferase ST8SiaIV überexprimiert (El Maarouf et al., 2005). Die im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Experimente mit den ManNAc supplementierten CHO-Zellen und den GNE-R263L exprimierenden Zellen zeigen, dass es weitere Möglichkeiten gibt, die Polysialylierung von NCAM zu erhöhen. Die einfache Applikation von ManNAc könnte eine mögliche Alternative zum gentherapeutischen Ansatz mit viralen Vektoren darstellen, und auch eine stärkere Erhöhung der Polysialylierung durch Expression der GNE-R263L könnte die axonale Regeneration darüber hinaus noch weiter verbessern.

Die in den CHO-Zellen gefundene höhere Sialinsäurekonzentration im Zellkern gegenüber dem Cytosol, lässt auf einen aktiven Transport der Sialinsäuren in den Zellkern schließen. Dies unterstützt die Vermutung, dass Sialinsäuren neben ihrer Bedeutung in Glycokonjugaten noch weitere zelluläre Funktionen ausüben. So könnten die Sialinsäuren, aufgrund ihrer negativen Ladung, mit positiv geladenen Transkriptionsfaktoren interagieren und eine regulatorische Rolle im Zellkern übernehmen. Eine solche regulatorische Funktion der Sialinsäuren könnte auch eine Erklärung liefern, warum die CMP-Neu5Ac-Synthetase bei Vertebraten im Zellkern lokalisiert ist, obwohl eine solche Lokalisation für die Aktivität des Enzyms nicht essentiell ist (Tiralongo et al., 2007).

Die in dieser Arbeit gezeigte Stimulierung der Dopaminsekretion in PC12-Zellen durch Supplementation mit dem unnatürlichen Sialinsäurevorläufer ManNProp ist ein weiterer Hinweis für die funktionelle Verknüpfung der Sialinsäuren mit intrazellulären Prozessen. Nach Supplementation mit ManNProp kam es zu einer erhöhten Phosphorylierung und einer damit verbundenen erhöhten Aktivität der T3M. Es zeigte

sich, dass die erhöhte Phosphorylierung dieses Schlüsselenzyms der Dopaminbiosynthese auf eine verringerte O-GlcNAc-Modifizierung zurückzuführen ist. Wie ManNProp die O-GlcNAcylierung von intrazellulären Proteinen inhibiert, ist jedoch unklar. ManNProp wird von den Zellen aufgenommen und zu N-Propanoylneuraminsäure metabolisiert, einer nicht natürlich vorkommenden Sialinsäure. Diese wird in Glycokonjugate eingebaut und kann die Eigenschaften von sialinsäureabhängigen Oberflächen-rezeptoren verändern (Keppler et al., 1995). Da die O-GlcNAcylierung auch über Oberflächen-rezeptoren wie den Insulinrezeptor reguliert werden kann (Brennan et al., 1988; Zachara et al., 2006), ist eine auf diesem Weg veränderte Signaltransduktion eine Möglichkeit, wie ManNProp indirekt die O-GlcNAcylierung beeinflussen könnte. Es ist aber auch denkbar, dass ManNProp direkt die Aktivität der O-GlcNAc-Transferase hemmt oder den Abbau von O-GlcNAc durch die O-GlcNAcase stimuliert. Zieht man eine regulatorische Funktion der Sialinsäuren im Zellkern in Betracht, so könnte die Anwesenheit der unnatürlichen N-Propanoylneuraminsäure im Kern einen Einfluss auf die Regulation der Transkription haben.

Die Stimulation der Dopaminsekretion nach ManNProp-Behandlung könnte einen neuen Ansatzpunkt für die Entwicklung von Strategien zur Therapie von Morbus Parkinson liefern. Bei Parkinson-Patienten kommt es im Laufe der Erkrankung zu einem Absterben von dopaminergen Zellen in der *Substantia nigra*. Der daraus resultierende Dopaminmangel beeinträchtigt die Funktion der Basalganglien und löst so die für die Parkinson-Krankheit bekannten Symptome aus. Für die Therapie von Morbus Parkinson wäre eine Stimulation der Dopaminsekretion der verbliebenen dopaminergen Zellen ein entscheidender Fortschritt (Kitagawa et al., 2007). Bisherige Versuche die Dopaminsekretion in der *Substantia nigra* mittels des neurotrophen Faktors NGF zu verstärken erwiesen sich als schwierig, da die durch NGF hervorgerufenen Nebeneffekte nur eine lokale Expression des Proteins über gentherapeutische Ansätze zulassen (Tuszynski et al., 2007). Bisherige Versuche an Ratten mit ManNProp zeigen hingegen keine toxische Wirkung.

Die Expression einer Sialurie-GNE, bei der es durch eine Punktmutation zu keiner „feedback“-Inhibierung des Enzyms mehr kommt (z.B. GNE-R263L), könnte von biotechnologischer Bedeutung sein. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte,

kommt es durch die Expression der GNE-R263L zu einer erhöhten und homogeneren Sialylierung von EPO in CHO-Zellen. Für die Produktion von Glycoproteinen in Bioreaktoren ist die Expression von GNE-R263L somit eine mögliche Alternative zur Supplementation mit ManNAc. Hierfür spricht auch, dass die Proliferationsrate bei den GNE-R263L exprimierenden CHO-Zellen höher war als bei den ManNAc supplementierten CHO-Zellen. Kombiniert man die Expression der GNE-R263L mit einer Überexpression des CMP-Neu5Ac-Golgi-Transporters oder der Expression bestimmter Sialyltransferasen, sollte eine noch effektivere Sialylierung möglich sein. Dies könnte insbesondere für sehr hoch glycosylierte Proteine nützlich sein, die inzwischen auch durch Einfügen zusätzlicher Glycosylierungsstellen, wie beim Darbepoetin α , erzeugt werden.