

4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die regulatorischen Auswirkungen einer veränderten Sialinsäurebiosynthese und die damit verbundenen Veränderung der intrazellulären Sialinsäurekonzentration näher charakterisiert. Hierzu wurde untersucht, ob eine Erhöhung der Sialinsäurekonzentration sich auf die Polysialylierung des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) auswirkt. Es wurden zwei CHO-Zelllinien, die jeweils nur eine der beiden Polysialyltransferasen ST8SiaII, ST8SiaIV exprimieren, mit N-Acetyl-D-Mannosamin (ManNAc), einem Intermediat der Sialinsäurebiosynthese, supplementiert. Die Supplementation mit ManNAc führte zu einem mehr als dreifachen Anstieg der intrazellulären Sialinsäurekonzentration. In beiden Zelllinien kam es daraufhin zu einer Zunahme von polysialyliertem NCAM (PSA-NCAM). Die Sialylierung anderer Glycokonjugate blieb jedoch unverändert.

Die Zelllinien wurden außerdem mit einem Expressionsvektor transfiziert, der für eine Sialuridemutation tragende UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (GNE-R263L) kodiert. Die Mutation hat einen Defekt in der „*feedback*“-Regulierung der GNE zur Folge und führt bei Sialurie-Patienten zu einer stark erhöhten Produktion von Sialinsäure. Die transfizierten Zelllinien zeigten, wie die mit ManNAc supplementierten Zellen, eine erhöhte intrazelluläre Sialinsäurekonzentration und eine Zunahme an PSA-NCAM. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Polysialylierung von NCAM von der intrazellulären Sialinsäurekonzentration und der Regulation der Sialinsäurebiosynthese abhängig ist. Die erhöhte Polysialylierung von NCAM könnte damit eine mögliche Ursache für die bei Sialurie-Patienten beschriebene Entwicklungsverzögerung sein.

Die Anzahl an rekombinanten Glycoproteinen, die zu Therapie Zwecken eingesetzt werden, ist in den letzten Jahren stark angestiegen. Um einen hohen Wirkungsgrad zu erzielen, müssen diese Glycoproteine möglichst vollständig sialyliert sein. Die Produktion rekombinanter Glycoproteine durch Überexpression in eukaryotischen Zellen liefert jedoch eine heterogene und unvollständige Sialylierung. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Teil der Arbeit untersucht, ob durch Expression der GNE-R263L in eukaryontischen Produktionszelllinien die Produktion von hoch sialylierten Glycoproteinen verbessert werden kann. Die Expression der GNE-R263L in

CHO-Zellen führte zu einer homogenen Expression der hochsialylierten Form des rekombinanten Glycoproteins Erythropoetin. Eine Expression der GNE-R263L in eukaryontischen Produktionszelllinien stellt somit eine effiziente Möglichkeit zur Verbesserung der Sialylierung von rekombinanten Glycoproteinen dar.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde die Dopaminsekretion in PC12-Zellen nach Supplementation mit N-Propanoylmannosamin (ManNProp) untersucht. ManNProp ist ein unnatürlicher Sialinsäurevorläufer, der im Gegensatz zum physiologischen Sialinsäurevorläufer (ManNAc) eine zusätzliche Methylengruppe in der N-Acetylseitenkette besitzt. Nach Behandlung mit ManNProp stieg die Dopaminsekretion um 38%. Es konnte gezeigt werden, dass nach ManNProp-Behandlung die Menge an O-GlcNAc (N-Acetylglucosamin) modifizierter Tyrosin-3-Monooxygenase (T3M) ab- und im Gegenzug die Phosphorylierung von T3M zunimmt. Die T3M ist das Schlüsselenzym der Dopaminsynthese. Durch die Phosphorylierung wird die T3M aktiviert und es kommt zu einer vermehrten Synthese und Sekretion von Dopamin. Die aufgezeigte Regulation der Dopaminsekretion über eine O-GlcNAc-Modifizierung der T3M könnte einen neuen Ansatzpunkt für die Therapie der Parkinson-Krankheit und anderer neurodegenerativer Erkrankungen mit gestörter Dopaminsekretion bieten.

Summary

In this thesis, the regulatory role of an altered sialic acid biosynthesis was characterized. Therefore, it was investigated if an enhanced intracellular sialic acid concentration leads to a modified polysialylation of the neural cell adhesion molecule (NCAM). CHO cells were supplemented with N-acetyl-D-mannosamine (ManNAc), an intermediate of the sialic acid biosynthesis. Supplementation with ManNAc led to an increased intracellular sialic acid concentration and polysialylation of NCAM (PSA-NCAM). However, the concentration of other membrane bound sialic acid was not increased. Moreover, CHO cells were transfected with an expression vector encoding for the key enzyme of the sialic acid biosynthesis the UDP-GlcNAc-2-epimerase/ManNAc-kinase carrying a sialuria mutation (GNE-R263L). The sialuria mutation inhibits the feedback mechanism of the enzyme and leads to an unregulated synthesis of sialic acid in sialuria patients. The transfected cells showed, like the ManNAc supplemented cells, an increased intracellular concentration of sialic acid and an enhanced polysialylation of NCAM. This clarified that the polysialylation of NCAM depends on the intracellular concentration of sialic acid and therefore on the regulation of the sialic acid biosynthesis. An increased polysialylation of NCAM could hence be a cause for the developmental delay of sialuria patients.

The number of recombinant glycoproteins used in therapy has increased over the past years and many of the high-value therapeutic proteins in the market today are glycoproteins. A complete sialylation of therapeutic glycoproteins is essential for optimum efficiency. However, the sialylation of over-expressed glycoproteins in mammalian cell lines like CHO cells used for the production of therapeutic glycoproteins is incomplete. Therefore it was investigated, if the utilization of the GNE sialuria mutation (GNE-R263L) leads to an enhanced sialylation of recombinant glycoproteins. As a model system we chose CHO cells producing recombinant human erythropoietin (rhEPO). Overexpression of the GNE-R263L results in an increased intracellular sialic acid concentration and an increased sialylation of rhEPO. This shows that sialuria-mutated-GNE over-expressing cells are the perfect platform to express highly sialylated therapeutic proteins, such as rhEPO.

In an additional experimental approach the dopamine secretion after application of N-propanoylmannosamine (ManNProp) was investigated. ManNProp is a novel, synthetic sialic acid precursor. After treatment with ManNProp the dopamine secretion increased by 38% in PC12-cells. Further experiments showed that tyrosine 3-monooxygenase is modified by O-GlcNAc and that application of ManNProp decreases its content of O-GlcNAc and leads to an increased phosphorylation of tyrosine 3-monooxygenase, which in turn results in activation of tyrosine 3-monooxygenase, leading to an increased synthesis of dopamine by PC12-cells. The described regulation of tyrosine 3-monooxygenase by O-GlcNAc modification is new starting-point for the therapy of the Parkinson's disease or other neurodegenerative disorders with altered dopamine synthesis.