

1 Einleitung

1.1 Glycoproteine

Glycoproteine sind Proteine mit kovalent gebundenen Mono- oder Oligosacchariden. Bis auf wenige Ausnahmen sind alle integralen Membran- und Exportproteine glycosyliert. Die Glycosylierung erfolgt im endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat. Die Zucker können entweder O-glycosidisch über die Hydroxyl-Gruppen von Serin- oder Threonin-Seitenketten (O-Glycane), oder N-glycosidisch über die Amino-Gruppe von Asparagin-Resten (N-Glycane) mit dem Protein verknüpft sein (Rademacher et al., 1988). Eine Besonderheit ist die Glycosylierung von cytoplasmatischen und nukleären Proteinen, die sich auf die dynamische O-glycosidische Verknüpfung von N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc) beschränkt (Hart et al., 1997).

1.2 N-Glycane

In N-Glycanen sind die Oligosaccharide an Asparagin-Reste der Proteinsequenz Asn X Ser/Thr (X kann jede beliebige Aminosäure außer Prolin sein) gebunden. Jedoch sind im Durchschnitt nur etwa 30% der möglichen N-Glycosylierungsstellen eines Proteins glycosyliert (Mellquist et al., 1998). Die Biosynthese der N-Glycane beginnt im ER mit der Synthese einer an Dolicholphosphat gebundenen Oligosaccharid-„core“-Struktur (GlcNAc₂Man₃), die anschließend *en bloc* auf naszierende Proteine übertragen wird. Durch Modifizierung im ER und im Golgi entstehen die drei Subtypen der N-Glycane: Mannose-reiche Oligosaccharide, hybride Oligosaccharide und komplexe Oligosaccharide (Kornfeld et al., 1994). Die Synthese der „core“-Struktur und einige anfängliche Prozessierungsschritte sind in allen Eukaryoten konserviert. Die weitere Modifizierung zu hybriden und komplexen N-Glycanen tritt hingegen nur bei Vertebraten auf. Die Diversität, insbesondere von komplexen N-Glycanen, zwischen verschiedenen Geweben und Spezies ist hoch (Dairaku et al., 1997). Die biologischen

Funktionen der Proteinglycosylierung sind vielfältig. Glycostrukturen tragen zur korrekten Faltung der Proteine im ER bei (Hammond et al., 1994; Matzuk et al., 1988; Helenius et al., 1994; Williams et al., 1995), erhöhen die Wasserlöslichkeit der Proteine (Uhrig et al., 2000), schützen vor proteolytischer Spaltung (Matzuk et al., 1988) und sind an einer Vielzahl von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt (Berg et al., 1992; Larkin et al., 1992; Walz et al., 1990; Horstkorte et al., 1993).

1.3 O-GlcNAc-Modifizierung

Die Glycosylierung von nukleären und cytoplasmatischen Proteinen erfolgt durch die Anheftung eines GlcNAc-Restes an Serin- oder Threoninreste und ist erst seit Mitte der 80er Jahre bekannt (Torres et al., 1984; Hart et al., 1989; Comer et al., 2001). Katalysiert wird die Reaktion von der O-GlcNAc-Transferase, die in allen Eukaryoten ubiquitär exprimiert wird (Lubas et al., 1997; Kreppel et al., 1997). Die Glycosylierung erfolgt ebenso dynamisch wie die Proteinphosphorylierung und steht mit dieser in einer kompetitiven Beziehung, da beide dieselben Serin- und Threoninreste modifizieren können (Kelly et al., 1993; Chou et al., 1995; Cheng et al., 2001; Comer et al., 2000). Die O-GlcNAc-Modifizierung ist beteiligt an der Regulation der Genexpression (Kadonaga et al., 1998; Kelly et al., 1998; Dahmus et al., 1995; Shaw et al., 1996), dem Transport von RNA und Makromolekülen aus dem Kern (Hubert et al., 1989; Hanover et al., 1992) und dem Aufbau des Cytoskeletts (Dong et al., 1996).

1.4 Sialinsäuren

1.4.1 Struktur und Vorkommen

Sialinsäuren sind Kohlenhydrate, deren Grundgerüst aus 9 Kohlenstoffatomen besteht. Die C-1-Position ist carboxyliert. Durch diese Carboxylfunktion ist das Molekül unter physiologischen Bedingungen negativ geladen und besitzt als organische Säure einen pKs-Wert von 2,2. Die C-2-Position trägt eine Ketogruppe, C-5 eine Aminofunktion und die Position C-4, C-6, C-7, C-8 und C-9 sind hydroxyliert. Unter physiologischen Bedingungen liegen die Sialinsäuren als Halbacetal vor (Schauer et al., 1982). Die

biologische Vielfalt ergibt sich durch die unterschiedliche Substituierung der aufgezählten Gruppen, vorwiegend durch Acetylgruppen (Schauer et al., 1982; Varki et al., 1993). Bis heute wurden über 40 verschiedene natürlich vorkommende Sialinsäuren entdeckt (Varki et al., 1992). Die N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) ist die am häufigsten vorkommende Sialinsäure und gleichzeitig der Vorläufer aller anderen Sialinsäurederivate. Das Vorkommen von Sialinsäuren beschränkt sich auf höhere Invertebraten und Vertebraten sowie einige pathogene Bakterien, die als Anpassung an den Wirt eine eigene Sialinsäurebiosynthese entwickelt haben (Faillard et al., 1989; Roth et al., 1992).

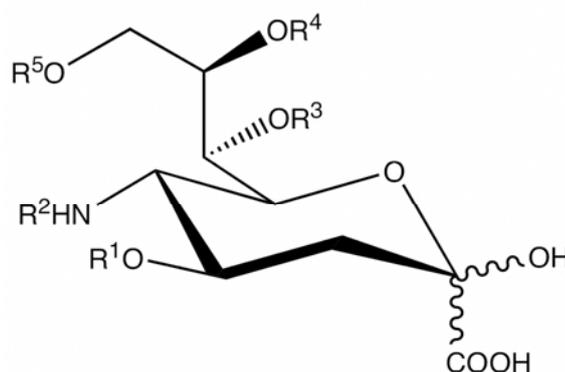


Abb. 1: Struktur von Sialinsäuren. Sialinsäuren sind N-acylierte (R₂ = Acetyl- oder Glycolylgruppen) Derivate der Neuraminsäure mit Acetyl-, Lactoyl-, Methyl-, Sulfonyl- und Phosphonylgruppen als mögliche O-Substituenten (R₁, R₃, R₄, R₅). Bei Neu5Ac, dem häufigsten Vertreter der Sialinsäuren, liegen alle Hydroxyfunktionen unmodifiziert vor. Die Carboxylgruppe liegt bei physiologischem pH-Wert deprotoniert vor.

1.4.2 Biologische Rolle

Sialinsäuren kommen vorwiegend als terminale Komponenten am nicht reduzierenden Ende von Glycoproteinen und Glycosphingolipiden vor. Sie bestimmen in wesentlichem Maße die hohe chemische und biologische Vielfalt von Glykokonjugaten. In N-Glycanen sind Sialinsäuren über eine glycosidische Bindung (α 2-6, α 2-3) zumeist mit Galactose und in O-Glycanen vorwiegend mit N-Acetylgalactosamin verknüpft

(Blix et al., 1956). Bei Glycosphingolipiden erfolgt die Bindung über die C-1-Hydroxylgruppe an das Ceramidgrundgerüst (Kelm et al., 1997). Eine besondere Form der Sialylierung stellt die beim Zelladhäsionsmolekül NCAM („*neuronal cell adhesion molecule*“) gefundene Polysialylierung dar. Polysialinsäure (PSA) ist ein langes Homopolymer von α 2-8-verknüpften Sialinsäuren ($n = 8-100$). Die PSA wird endständig an N-Glycane des komplexen Typs addiert (Troy et al., 1992).

Ihre terminale Position prädestiniert die Sialinsäure für die Interaktion mit anderen Molekülen. Auf der Zelloberfläche befindliche Sialinsäuren beeinflussen durch ihre negative Ladung die Abstoßung zwischen den Zellen sowie die Interaktion zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix (Wang et al., 2006).

1.4.3 Biosynthese

Als Ausgangssubstanz für die Biosynthese von N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) dient UDP-N-Acetyl-D-Glucosamin (UDP-GlcNAc), das über die Glycolyse zur Verfügung gestellt wird. Zunächst kommt es zur Epimerisierung von UDP-GlcNAc zu N-Acetyl-D-Mannosamin (ManNAc), welches anschließend in 6-Position phosphoryliert wird (Corfield und Schauer, 1982). Diese beiden Schritte werden von dem bi-funktionellen Enzym UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (GNE) katalysiert (Hinderlich et al., 1997; Stäsche et al., 1997; Effertz et al., 1999). ManNAc-6-Phosphat wird durch die Neu5Ac-9-Phosphat-Synthase in Neu5Ac-9-Phosphat umgewandelt, und durch Abspaltung der Phosphatgruppe entsteht Neu5Ac (Warren et al., 1961; Warren et al., 1962; Jourdian et al., 1964). Im Unterschied zur Aktivierung aller anderen Monosaccharide findet die Aktivierung der Neu5Ac durch die CMP-Neu5Ac-Synthetase nicht im Cytosol, sondern im Kern statt (Kean et al., 1969; Kean et al., 1970). CMP-Neu5Ac wird dann über den CMP-Neu5Ac-Golgi-Transporter in den Golgi transportiert (Eckhardt et al., 1996) und dort von Sialyltransferasen auf Glycokonjugate übertragen (Harduin-Lepers et al., 2005) (Abb. 2).

Reguliert wird die Sialinsäurebiosynthese über einen „*feedback*“-Mechanismus: CMP-Neu5Ac bindet an die GNE und hemmt selektiv die Epimeraseaktivität des Enzyms (Kornfeld et al., 1964).

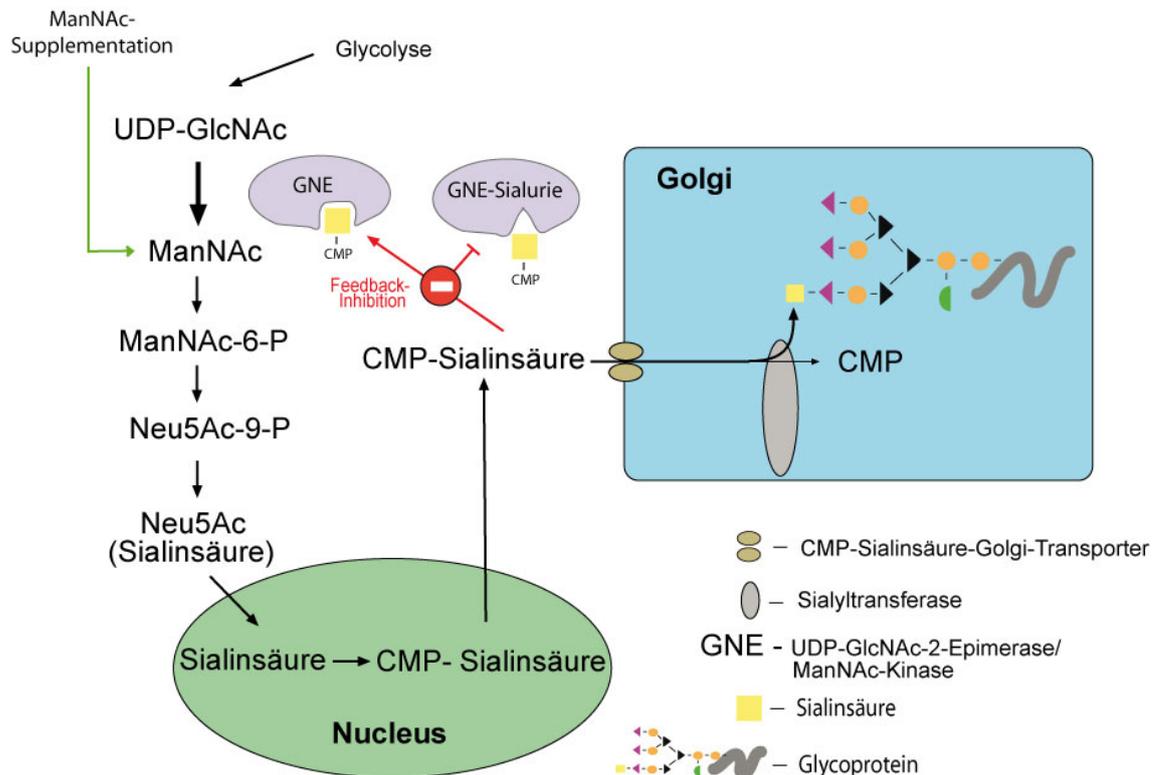


Abb. 2: Biosynthese von Sialinsäuren und sialylierten Glykokonjugaten in Säugetierzellen.

1.4.4 Biotechnologische Bedeutung

Die Zahl der für Therapiezwecke produzierten rekombinanten Glycoproteine hat in den letzten Jahren stark zugenommen und erreicht jährlich einen weltweiten Umsatz von mehr als 60 Milliarden Dollar. Um ein Glycosylierungsmuster zu erhalten, welches weitgehend mit dem des Menschen übereinstimmt, werden viele rekombinante Glycoproteine in Säugetierzelllinien produziert. Dies ist essentiell, denn die Glycan-Zusammensetzung von Glycoproteinen beeinflusst deren biologische Funktion (Jenkins et al., 1994) und somit die Wirkung der Therapeutika. Die „Chinese Hamster Ovary“ (CHO)-Zelllinie ist eine der am häufigsten genutzten Zelllinien für die Expression von Glycoproteinen. Die Überexpression der Glycoproteine in CHO-Zellen führt jedoch zu einer inkompletten und heterogenen Sialylierung der komplexen N-Glycane (Santell et al., 1999). Diese unvollständige Sialylierung verringert die Halblebenszeit der produzierten therapeutischen Glycoproteine im Blut: Der vorwiegend in Hepatozyten

exprimierte Asialoglycoproteinrezeptor bindet die exponierten Galactosereste der unsialylierten komplexen N-Glycane (Ashwell and Harford, 1982), was zu Internalisierung und Abbau des Glycoproteins führt (Higuchi et al., 1992; Misaizu et al., 1995; Spivak and Hogans, 1989; Takeuchi et al., 1989). Mit Hilfe verschiedener Ansätze wurde versucht, die Sialylierung in CHO-Zellen zu optimieren, um die Qualität der produzierten rekombinanten Glycoproteine zu verbessern. Die Überexpression verschiedener Sialyltransferasen und des CMP-Neu5Ac-Golgi-Transporters hatten nur eine geringfügige Steigerung der Sialylierung zur Folge (Wong et al., 2006; Fukuta et al., 2000). Die Supplementierung der CHO-Zellen mit dem Sialinsäure Vorläufer ManNAc führt zur Erhöhung der intrazellulären Sialinsäurekonzentration und zu einer verbesserten Sialylierung, jedoch ist ManNAc in der für eine optimale Nutzung in Bioreaktoren benötigten Konzentration toxisch (Gu et al., 1998).

1.4.5 Sialurie

Sialurie ist eine seltene autosomal-dominant vererbte Stoffwechselkrankheit, die durch Akkumulation freier Sialinsäuren in den Zellen und im Blut der betroffenen Personen charakterisiert ist und zu einer erhöhten Ausscheidung von Sialinsäuren im Urin (daher der Name Sialurie) führt (Seppala et al., 1991; Weiss et al., 1989; Enns et al., 2001). Die Überproduktion resultiert aus einem Verlust der „*feedback*“-Hemmung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase, der durch Punktmutationen in der allosterischen Bindungsstelle hervorgerufen wird. Bisher sind drei verschiedene Punktmutationen beschrieben, die zu Sialurie führen: R266W, R266Q und R263L (Seppala et al., 1999; Leroy et al., 2001).

Sialurie-Patienten weisen eine Vergrößerung der Leber (Hepatomegalie), „*coarse facial features*“ und unterschiedlich stark ausgeprägte Entwicklungsverzögerungen auf (Ferreira et al., 1999).

1.5 NCAM

Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM ist ein membranassoziiertes Glycoprotein. Es besteht im extrazellulären Bereich aus fünf Ig-artigen Domänen und zwei membranahen Fibronectin Typ-III-Domänen (Cunningham et al., 1987). Die drei Hauptisoformen NCAM180, NCAM140 und NCAM120 unterscheiden sich in der Größe ihrer cytoplasmatischen Domäne. Die größte der cytoplasmatischen Domänen besitzt NCAM180, die gegenüber der cytoplasmatischen Domäne von NCAM140 ein zusätzliches Insert von 267 Aminosäuren aufweist. Die Isoform NCAM120 besitzt keine cytoplasmatische Domäne und ist über einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Plasmamembran verbunden (Goridis et al., 1983). NCAM verfügt über sechs potentielle N-Glycosylierungsstellen. Eine einzigartige posttranskriptionale Modifikation ist die Polysialylierung von NCAM. Als Schlüsselenzyme der NCAM-Polysialylierung fungieren die Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV, welche die komplexen N-Glycane der drei Glycosylierungsstellen der 5. Ig-Domäne mit α -2,8 gebundenen Sialinsäuren verlängern (Finne et al., 1983; Kojima et al., 1996; Scheidegger et al., 1995; Yoshida et al., 1995). Die Zahl der repetitiven Elemente der PSA kann dabei bis zu 200 Sialinsäuren betragen (Nakata et al., 2005) (Abb. 3).

Die Polysialylierung von NCAM wird entwicklungsabhängig reguliert. Während im Embryo nahezu alle NCAM-Moleküle polysialyliert (PSA-NCAM) sind, nimmt postnatal die Expression von PSA-NCAM deutlich ab und ist schließlich in adulten Säugetieren auf wenige Hirnregionen beschränkt (Edelman et al., 1985). Zu diesen Regionen zählen der Hippocampus, die Hypophyse und der Hypothalamus, die sich durch ihre Fähigkeit, Neuronen zu regenerieren und ihre lebenslange Plastizität auszeichnen. Die erhöhte morphologische Plastizität wird auf die elektrostatische Abstoßung der negativ geladenen PSA zurückgeführt, die eine Verringerung der Zelladhäsion bewirkt (Rutishauer et al., 1988).

Die Expression von PSA-NCAM ist auch mit dem malignen Potential einiger Tumore assoziiert, wie dem alveolären Rhabdomyosarkom (Hildebrandt et al., 1998), dem Wilms-Tumor (Roth et al., 1988), dem Kolonkarzinom (Roesler et al., 1997) und dem

Pankreaskarzinom (Tezel et al., 2001). Bei neuroendokrinen Lungenkarzinomen konnte gezeigt werden, dass die vermehrte PSA-NCAM-Expression mit Metastasierung und verstärkter Knotenbildung vergesellschaftet ist (Lantuejoul et al., 1998).

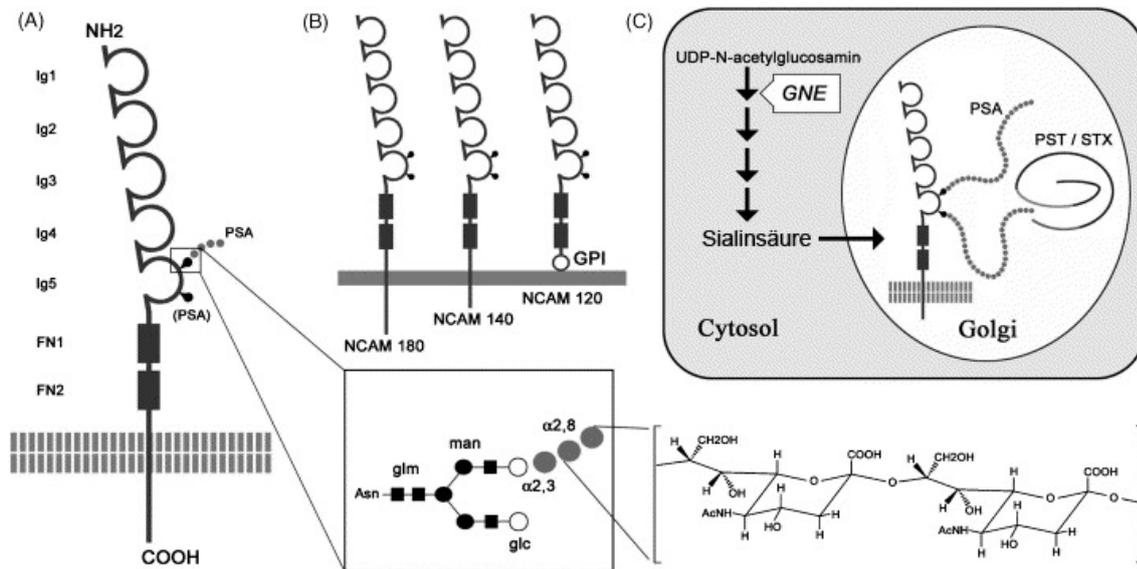


Abb. 3: Schematische Darstellung der Struktur von NCAM (modifiziert nach Bonfanti, 2006). (A) NCAM besitzt einen extrazellulären N-terminalen Bereich aus fünf Ig-artigen Domänen und zwei membrannahen Fibronectin Typ-III-Domänen, eine Transmembran-Domäne und eine intrazelluläre C-terminale Domäne. Die N-Glycane der 5. Ig-Domäne werden durch α -2,8 gebundene Sialinsäuren verlängert (Polysialinsäure). (B) Die drei Hauptisoformen von NCAM sind charakterisiert über ihre cytoplasmatischen Domänen. (C) Die α -2,8 gebundenen Sialinsäuren werden im Golgi durch die beiden Polysialyltransferasen ST8SialII (PST) und ST8SialIV (STX) an die endständigen α -2,3 gebundenen Sialinsäuren der N-Glycane addiert.

1.6 Tyrosin 3-Monooxygenase

Die Tyrosin 3-Monooxygenase (T3M) katalysiert die Synthese von L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) aus L-Tyrosin, Tetrahydrobiopterin (BH₄) und molekularem Sauerstoff. Dies ist der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Biosynthese der als Neurotransmitter fungierenden Catecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin (Dunkley et al., 2004). Reguliert wird das Enzym über einen „*feedback*“-Mechanismus: Die Catecholamine konkurrieren mit dem BH₄ um

die Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms. Neben dieser kompetitiven Hemmung kommt es zu einer Inhibierung der T3M durch eine irreversible Bindung der Catecholamine an das Enzym. Eine Phosphorylierung des Ser40 der T3M verhindert diese irreversible Bindung und reguliert so die Aktivität des Enzyms (Almas et al., 1992). Als Schlüsselenzym der Dopamin-Biosynthese kann die T3M einen neuen Ansatzpunkt für die Therapie von Parkinson und anderen neurodegenerativen Erkrankungen mit gestörter Dopaminsekretion bieten (Kitagawa et al., 2007).

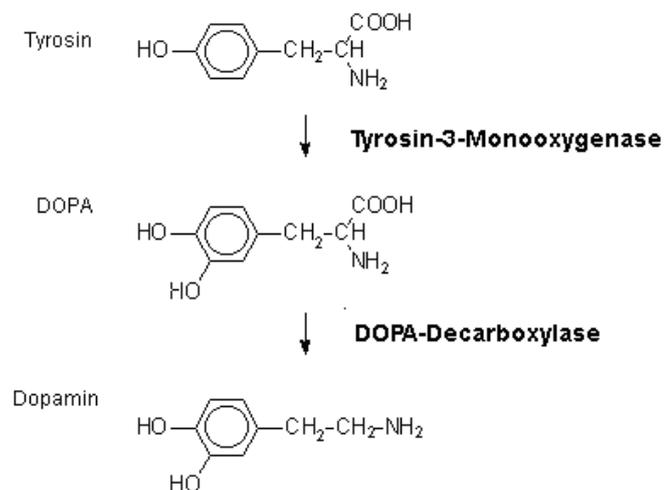


Abb. 4 Biosynthese von Dopamin. Tyrosin wird durch die Tyrosin-3-Monooxygenase in L-DOPA umgewandelt und anschließend decarboxyliert zu Dopamin.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Sialinsäuren sind als terminale Zucker in Glycokonjugaten an einer Vielzahl von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt. Über die Regulation der Sialylierung der Glycokonjugate ist zum jetzigen Zeitpunkt noch wenig bekannt. Die zelltypspezifische Expression einiger Sialyltransferasen ist beschrieben (Kitagawa und Paulson, 1994); inwieweit andere Faktoren, wie die intrazelluläre Sialinsäure-konzentration, einen Einfluss auf die Oberflächensialylierung haben, ist weitgehend unbekannt. Die Bedeutung der Regulation der Sialinsäurekonzentration zeigt sich bei Sialurie-Patienten, bei denen es durch einen Defekt im „*feedback*“-Mechanismus der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase zu einer cytoplasmatischen Akkumulation freier Sialinsäuren kommt. Sialurie-Patienten leiden an unterschiedlich stark ausgeprägten Entwicklungsverzögerungen und Hepatomegalie (Ferreira et al., 1999).

Im Rahmen der Arbeit sollte untersucht werden, welche Auswirkungen eine erhöhte intrazelluläre Sialinsäurekonzentration auf die Oberflächensialylierung hat. Insbesondere sollte dabei die Polysialylierung von NCAM betrachtet werden, denn im Gegensatz zu anderen Glycokonjugaten ist bei NCAM die Anzahl der konjugierten Sialinsäuremoleküle nicht durch die Anzahl der Glycosylierungsstellen beschränkt. Zudem spielt die Polysialylierung von NCAM bei der Erhaltung der morphologischen und physiologischen Plastizität bestimmter Hirnregionen eine Rolle und könnte daher mit den Entwicklungsverzögerungen der Sialurie-Patienten assoziiert sein.

Die Regulation der Sialinsäurebiosynthese ist auch ein bedeutender Faktor bei der Produktion von therapeutischen Glycoproteinen, denn die Sialylierung der rekombinanten Glycoproteine ist für die Halbwertszeit im Blut des Patienten und damit für die Wirkungsdauer des Therapeutikums entscheidend (Takeuchi et al., 1989). Die Herstellung von hoch sialylierten rekombinanten Glycoproteinen ist schwierig, denn geeignete Produktionszelllinien sind nicht vorhanden. Deshalb sollte untersucht werden, ob durch die Überexpression von Sialurie-mutierter UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (GNE-R263L) und einer damit verbundenen Erhöhung der intrazellulären Sialinsäurekonzentration eine verbesserte Sialylierung von therapeutischen Glycoproteinen zu erreichen ist.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollten neue regulatorische Eigenschaften der Sialinsäuren mit Hilfe des synthetischen Sialinsäurevorläufers N-Propanoylmannosamin (ManNProp) identifiziert werden. Es ist bekannt, dass die Behandlung von PC12-Zellen mit ManNProp ein durch NGF („*nerve growth factor*“) stimuliertes Neuritenwachstums verstärkt (Büttner et al., 2002). Die Stimulation mit NGF induziert ebenfalls die Synthese und Sekretion von Dopamin (Baizer et al., 1985; Huang et al., 1996; Dunkley et al., 2004). Die Reduktion der Dopamin-Sekretion in dopaminergen Neuronen des Soemmerring-Ganglions ist ein entscheidender Faktor bei der Entstehung der Parkinson-Krankheit (Shannon, 2007). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob die Behandlung mit ManNProp ebenfalls die Synthese und Sekretion von Dopamin beeinflusst.

