

Aus dem Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. Guido Posern)

**Modifikation der Sialylierung von Erythropoietin durch nichtphysiologische
Acylmannosamine und ihr Einfluss auf die Resistenz gegenüber Sialidase A**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktor rerum medicarum (Dr. rer. medic.) für das Fachgebiet
Medizinische Physiologie und Pathophysiologie

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Anselm Cornelius Werner
geboren am 7. Juni 1976 in Burg b. Magdeburg

Betreuer: Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte

Gutachter: 1. Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte
2. Prof. Dr. Oliver Thews
3. Prof. Dr. Werner Reutter

Eröffnung des Promotionsverfahrens am 26.2.2013
Öffentliche Verteidigung am 6.5.2013

Referat

Während der letzten Jahre hat die Verwendung rekombinanter Glykoproteine für therapeutische Zwecke drastisch zugenommen. Die Glykosylierung und Sialylierung sind für die Funktionalität der meisten Säugerproteine von herausragender Bedeutung. Da die Art und Weise der Glykosylierung einen großen Einfluss auf die pharmakologischen Eigenschaften von therapeutischen Glykoproteinen hat, werden diese in Säugerzellen hergestellt, um eine säugertypische Glykosylierung zu erhalten. Die terminalen Positionen der Glykane der Säugerproteine werden normalerweise von Sialinsäuren eingenommen. Sialinsäuren erhöhen unter anderem die Halblebenszeit von Serumproteinen. Sie werden jedoch mit der Zeit durch Sialidasen abgespalten. Infolgedessen werden die Glykoproteine von Asialoglykoproteinrezeptoren der Leber gebunden und aus dem Blutstrom entfernt. Aber auch bei der Produktion werden Glykoproteine durch aus abgestorbenen Zellen freigesetzte Sialidasen desialyliert. Daher ist eine stabile Sialylierung für die Produktion von therapeutisch relevanten Glykoproteinen von herausragender Bedeutung. Neben N-Acetylmannosamin, dem natürlich vorkommenden Vorläufer der Sialinsäuren, werden auch andere nichtphysiologische N-Acylmannosamine von der ManNAc-Kinase in die entsprechenden N-Acylneuraminsäuren umgesetzt, wodurch es möglich ist, die Sialylierung der Glykane biochemisch zu modifizieren und damit auch deren Eigenschaften zu verändern. In dieser Arbeit konnten die Glykane von in CHO-S-Zellen exprimiertem Erythropoietin, für welches bisher keine Untersuchungen dieser Art vorliegen, durch Zusatz von N-Propanoylmannosamin und N-Pentanoylmannosamin, nicht jedoch durch N-Heptanoylmannosamin, zum Zellkulturmedium erfolgreich modifiziert werden. Die resultierende Sialylierung mit N-Propanoylneuraminsäure und N-Pentanoylneuraminsäure konnte massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Die Stabilität der Sialylierung wurde in einem Degradationsassay mit Sialidase A, der durch eine 2D-Gelelektrophorese ausgewertet wurde, überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass diese neuartigen Sialinsäuren, insbesondere N-Pentanoylneuraminsäure, im Vergleich zur nativen N-Acetylneuraminsäure resistenter gegenüber dem Abbau durch Sialidase A sind. Die Sialinsäurevorläufer N-Propanoyl- und N-Pentanoylmannosamin ermöglichen somit eine stabilere Sialylierung, wodurch sich die Halblebenszeit rekombinanter Glykoproteine wie EPO verlängern lassen könnte.

Werner, Anselm Cornelius: Modifikation der Sialylierung von Erythropoietin durch nichtphysiologische Acylmannosamine und ihr Einfluss auf die Resistenz gegenüber Sialidase A. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 70 Seiten, 2013

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis.....	i
	Abkürzungsverzeichnis.....	iv
1	Einleitung.....	1
1.1	Glykosylierung von Proteinen.....	1
1.2	N-glykosidische Glykosylierung.....	2
1.3	O-glykosidische Glykosylierung.....	4
1.4	Sialinsäuren.....	4
1.5	Bedeutung in natürlichen Systemen.....	7
1.6	Stabilität und Löslichkeit von glykosylierten Serumproteinen.....	7
1.7	Biotechnologische Bedeutung und Manipulation der Glykosylierung und Sialylierung.....	8
1.8	Modifizierung der Glykane durch nichtnatürliche Sialinsäurevorläufer.....	10
1.9	Erythropoietin.....	11
1.10	Vorkommen und biologische Funktion von EPO.....	12
1.11	EPO als therapeutisches Glykoprotein.....	14
2	Zielstellung.....	16
3	Material und Methoden.....	17
3.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	17
3.2	Verwendete Organismen.....	17
3.2.1	<i>Escherichia coli</i>	17
3.2.2	CHO-S-Zellen.....	17
3.3	Oligonukleotide und Plasmide.....	17
3.3.1	Oligonukleotide (Primer).....	17
3.3.2	Plasmide.....	18
3.4	Antikörper und Enzyme.....	19
3.4.1	Antikörper.....	19
3.4.2	Enzyme.....	20
3.5	Kits und Größenmarker.....	20
3.6	Medien und Antibiotika.....	20
3.6.1	Antibiotika.....	20
3.6.2	Medien für die Bakterienkultur.....	21
3.6.3	Medien für die Zellkultur.....	21

3.7	Lösungen, Gele und Membranen.....	21
3.8	Andere Chemikalien.....	25
3.9	Geräte.....	25
3.10	Behandlung von Lösungen und Geräten.....	26
3.11	Arbeiten mit <i>E. coli</i>	26
3.11.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	26
3.11.2	Konservierung von <i>E. coli</i>	26
3.11.3	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmiden.....	26
3.12	Arbeiten mit Säugerzellen.....	27
3.12.1	Kultivierung von CHO-S-Zellen.....	27
3.12.2	Konservierung der CHO-S-Zellen.....	28
3.12.3	Zellzählung.....	28
3.12.4	Transfektion von Säugerzellen durch Lipofektion.....	28
3.12.5	Synthese modifizierter Sialinsäurevorläufer für die Zellkultur	29
3.12.6	Supplementierung von CHO-S-Zellen mit artifiziellen Sialinsäurevorläufern.....	29
3.13	Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	30
3.13.1	Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> durch alkalische Lyse.....	30
3.13.2	Chromatographische Aufreinigung von Plasmiden mithilfe des QIAprep Spin Miniprepkits (Quiagen, Hilden).....	31
3.13.3	Restriktionsverdau.....	31
3.13.4	Nachweis von DNA-Fragmenten in Agarosegelen.....	31
3.13.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	32
3.13.6	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	32
3.13.7	Plasmidpräparation für Sequenzierungen	32
3.13.8	Primerdesign.....	32
3.13.9	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	33
3.13.10	Umklonierung der EPO-cDNA-Sequenz aus pL748-pKEX-EPO in den Vektor pESG- IBA3 zur Einführung eines C-terminalen StreptagII.....	34
3.14	Proteinbiochemische Methoden.....	37
3.14.1	Anreicherung von EPO durch Membranfiltration.....	37
3.14.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	37
3.14.3	Westernblots.....	37
3.14.4	Dotblots.....	38
3.14.5	Immunpräzipitation.....	38

3.14.6	Präparation von EPO über eine Streptaktinaffinitätschromatografie.....	39
3.14.7	Coomassiefärbung.....	39
3.14.8	Vorbereitung der Proben für eine MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	40
3.14.9	Sialidaseassay.....	40
3.14.10	2D-Gelelektrophorese.....	41
4	Ergebnisse.....	42
4.1	Expression von EPO in mit pL748-pKex-EPO transfizierten CHO-S-Zellen.....	42
4.2	Umklonierung der EPO-cDNA in den Vektor pESG-IBA3 zur Fusion an einen StreptagII.....	43
4.3	Wachstum der mit neuartigen Sialinsäurevorläufern supplementierten CHO-S-Zellen.....	44
4.4	Affinitätschromatografie von EPO-StreptagII über eine Streptaktinsäule.....	44
4.5	Anteil neuartiger Sialinsäuren in EPO-StreptagII.....	45
4.6	Sialidaseresistenz von EPO aus mit ManNProp und ManNPent behandelten Zellkulturen.....	48
5	Diskussion.....	50
5.1	Reaktion der Zellkulturen auf die zugesetzten N-Acylmannosamine.....	50
5.2	Nachweis neuartiger Sialinsäuren in mit N-Acylmannosaminen behandelten Zellkulturen.....	51
5.2.1	Gesamtsialylierungsgrad der Glykane von EPO-StreptagII.....	51
5.2.2	N-Propanoylneuraminsäure und N-Pentanoylneuraminsäure.....	51
5.2.3	N-Heptanoylneuraminsäure.....	52
5.3	Resistenz der neuartigen Sialinsäuren gegenüber Sialidase und deren Bedeutung für therapeutische Glykoproteine.....	53
5.4	Ausblick.....	54
6	Zusammenfassung.....	56
7	Literatur.....	57
8	Thesen.....	70
	Tabellarischer Lebenslauf	
	Selbstständigkeitserklärung	
	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
Amp	Ampizillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>Aqua bidest.</i>	doppelt destilliertes Wasser
Asn	Asparagin
Bcl-X _L	B-cell lymphoma-extra large proteine
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BFU-E	Burst forming unit-erythroid
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre DNA
CFU-E	Erythroid colony forming unit
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-Propansulfonat
CHO-Zellen	Chinese Hamster Ovary-Zellen, eine immortale Zelllinie aus dem Ovar des chinesischen Streifenhamsters
CMV	Cytomegalievirus
CMP	Cytosinmonophosphat
Cys	Cystein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EPO	Erythropoietin
EPO-R	Erythropoietinrezeptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK 1/2	Extracellular-signal-regulated kinases ½
EtOH	Ethanol
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor

GNE	UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HABA	Hydroxylazophenylbenzoesäure
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor
HSP 70	Hitzeschockprotein 70
IL-6	Interleukin 6
IL 1- β	Interleukin-1 β
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
JAK2	Januskinase 2
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight
Man	Mannose
ManNAc	N-Acetylmannosamin
ManNProp	N-Propanoylmannosamin
ManNPent	N-Pentanoylmannosamin
ManNHept	N-Heptanoylmannosamin
NaOMe	Natriummethanolat
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	N-Glycolylneuraminsäure
Neu5Hept	N-Heptanoylneuraminsäure
Neu5Prop	N-Propanoylneuraminsäure
Neu5Pent	N-Pentanoylneuraminsäure
NF- κ B	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
PI-3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC- ϵ	Proteinkinase C Typ ϵ
rhEPO	rekombinantes humanes Erythropoietin
SDS	Natriumdodecylsulfat

Ser	Serin
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
StreptagII	Streptaktin-tag II
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris buffered Saline
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamintrifluoressigsäure
Thr	Threonin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
VEGF	Vascular endothelial growth factor
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UDP	Uracildiphosphat

1 Einleitung

1.1 Glykosylierung von Proteinen

Die Glykosylierung von Proteinen ist die am häufigsten vorkommende posttranslationale Modifikation in eukaryontischen Organismen (Varki et al., 2009) und betrifft nahezu alle membrangebundenen und sekretorischen Proteine dieser Organismengruppe. Man versteht darunter die kovalente Bindung von Monosacchariden, Oligosacchariden oder Polysacchariden an Proteine. Die Bindung der Zuckerseitenketten kann entweder über das N-Atom der Aminogruppe eines Asparaginrestes oder über das O-Atom der Hydroxylgruppen von Serin- und Threoninresten, seltener auch von Hydroxylprolin, Hydroxyllysin oder Tyrosin erfolgen (Spiro, 2002). Im ersten Fall spricht man von einer N-glykosidischen Bindung und im zweiten von einer O-glykosidischen Bindung der Glykane. Weiterhin gibt es die C-Glykosylierung, bei der Mannose über sein C2-Atom an das C2-Atom eines Tryptophanrestes gebunden wird (Doucey et al., 1998), die P-Glykosylierung, bei der die Glykane über eine Phosphodiesterbindung an die Hydroxylgruppe von Serin- oder Threoninresten gebunden werden (Mehta et al., 1997; Haynes, 1998) sowie die Glykosylierung über Ethanolaminphosphat an den GPI-Anker (Paulick und Bertozzi, 2008). Die Glykane modulieren die Eigenschaften der Proteine. Die Glykosylierung spielt eine große Rolle für die Funktionalität der betroffenen Proteine, unter anderem für die korrekte Faltung (Parodi, 2000), Prozesse des Immunsystems (Rudd et al., 2001), Zell-Zell-Kontakte (Marshall und Haskard, 2002), Proteintransport (Scheiffele und Füllekrug, 2000) und Stabilität (Shental-Bechor und Levy, 2008). Am Aufbau der Zuckerseitenketten sind vergleichsweise wenige Monosaccharide beteiligt. Trotzdem ergibt sich durch die Zusammensetzung, Sequenz und Verzweigung der Glykane eine extrem hohe Zahl an möglichen Varianten mit entsprechend vielfältigen Eigenschaften. Ein Glykan kann dabei aus einem einzelnen Monosaccharid bestehen, aber auch aus Polymeren von mehr als 100 Monosaccharideinheiten (Finne et al., 1983; Wells et al., 2001). Die an der Glykosylierung beteiligten Enzyme werden von etwa 700 Genen codiert, was etwa 1 bis 2 % des Genoms entspricht (Feizi und Mulloy, 2003). Die Biosynthese der Glykane findet hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum und im Golgiapparat statt. Bezogen auf ein Glykoprotein kann zwischen der Makro- und Mikroheterogenität unterschieden werden. Unter der Makroheterogenität werden Anzahl und Positionsvarianten der gebundenen Glykane verstanden. Die Mikroheterogenität beschreibt dagegen die Anzahl unterschiedlicher Glykane, die an einer bestimmten Glykosylierungsstelle im Protein vorkommen kann. Analog zum Genom und Proteom bildet die Gesamtheit der Glykane eines Organismus dessen

Glykom. Tabelle 1 zeigt die am häufigsten am Aufbau der Glykane beteiligten Monosaccharide.

Tabelle 1: Häufig in Glykanen vorkommende Monosaccharidbausteine.

Monosaccharid	Abkürzung	Symbol
Fucose	Fuc	◀
Mannose	Man	●
Galactose	Gal	●
Glucose	Glc	●
N-Acetylglucosamin	GlcNAc	■
N-Acetylgalactosamin	GalNAc	■
N-Acetylneuraminsäure	Neu5Ac	◆
N-Glycolylneuraminsäure	Neu5Gc	◆

1.2 N-glykosidische Glykosylierung

Bei der N-glykosidischen Glykosylierung werden die Glykane an der freien Aminogruppe eines Asparaginsäurerestes, der sich in der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr befinden muss, gebunden, wobei X eine beliebige Aminosäure außer Prolin sein kann (Gavel und von Heijne, 1990). Allerdings werden im Allgemeinen nicht alle vorhandenen Asn-X-Ser/Thr Motive eines Proteins glykosyliert, sondern nur etwa 65 %. In Abhängigkeit der Anordnung der Grundbausteine werden ausgehend von einer Basisstruktur drei Glykosylierungsmuster unterschieden, welche in Abb. 1 dargestellt sind. Die Basisstruktur besteht aus zwei N-Acetylglucosaminuntereinheiten und drei Mannoseeinheiten, die in einer verzweigten Struktur vorliegen. Die sich an diese Grundstruktur anschließenden Oligosaccharidketten werden Antennen genannt. Wenn weitere Mannoseeinheiten folgen, spricht man vom High-Mannosetyp. Beim komplexen Typ folgen auf die Mannosen andere Zucker. Treten sowohl Antennen des High-Mannosetyps als auch des komplexen Typs auf, spricht man vom Hybridtyp.

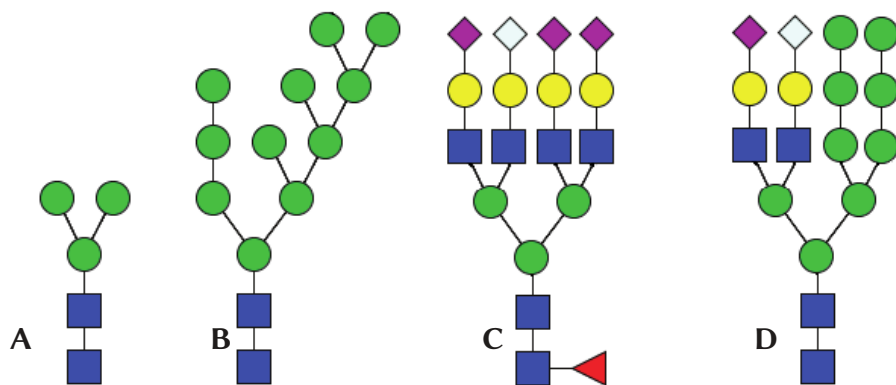


Abbildung 1: Glukanstrukturen A) Basisstruktur, B) Highmannosetyp C) komplexer Typ D) hybrider Typ

Weiterhin kann man die Glykane nach der Anzahl der Antennen unterscheiden. Häufig sind bi-, tri- und tetraantennäre Glykane, während mono- oder pentaantennäre Glykane die Ausnahme bilden (Taguchi et al., 1994; Zhang et al., 1997). Die komplexe Synthese der N-Glykane erfolgt zunächst auf der cytosolischen Seite des endoplasmatischen Retikulums an einem dort verankerten, aus 20 Isopreneinheiten bestehendem Dolicholphosphatmolekül, wobei zunächst am Phosphat ein kurzes Glykan aus 2 GlcNAc- und 5 Mannosemolekülen aufgebaut wird. Nach einer Translokation in das Lumen des ER durch eine noch unbekannte Flippase (Snider und Rogers, 1984; Kornfeld und Kornfeld, 1985) werden 4 weitere Mannosen und 3 Glukoseeinheiten auf das Molekül übertragen, bevor das Glykan $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ durch die ebenfalls in der ER-Membran verankerte Oligosaccharyltransferase cotranslational auf eine in der Synthese befindliche Proteinkette übertragen wird (Kaplan et al., 1987). Nach Abspaltung von 2 Glukoseresten durch Glukosidase I und II, kann das Protein unter Beteiligung der Chaperone Calnexin und Calreticulin gefaltet und die dritte Glukose abgespalten werden. Wenn es dabei zu einer Fehlfaltung kommt, kann durch eine Glykosyltransferase erneut Glukose auf das Glykoprotein übertragen werden, so dass Calnexin und Calreticulin wieder zur Neuorganisation des Proteins binden können (Parodi, 2000; Shental-Bechor und Levy, 2008). Weitere 4 Mannosen werden im Golgiapparat abgespalten. Jetzt kann die endgültige Glykanstruktur aufgebaut werden, deren Zusammensetzung vom Vorhandensein und der Konzentration der verschiedenen CMP- oder UDP- aktivierten Monosaccharidbausteine und den dazugehörigen Glykosyltransferasen, Nukleotidtransportern und Glucosidasen abhängt. Auch die Zugänglichkeit der Glykosylierungsstelle für diese Enzyme in dem schon gefalteten Protein spielt dabei eine Rolle (Frenkel et al., 2003; Jones et al., 2005; Ruddock und Molinari, 2006).

1.3 O-glykosidische Glykosylierung

Im Gegensatz zur N-Glykosylierung gibt es bei den O-Glykanen 8 Basisstrukturen, die gewöhnlich mit einem GalNAc beginnen, welches im Golgi-Apparat durch eine Polypeptid-GalNAc-Transferase direkt auf einen Serin- oder Threoninrest eines Proteins übertragen wird, und dann durch Glycosyltransferasen mit verschiedenen Kombinationen aus GalNAc, GlcNAc und Gal, wie in Abb. 2 gezeigt, verlängert werden (Van den Steen et al., 1998; Novak et al., 2000). Anders als bei den N-Glykanen gibt es bei den O-Glykanen keine einheitliche Konsensussequenz. Diese Grundstrukturen können dann weiter mit Fucose, Sialinsäuren, Galaktose GalNAc oder GlcNAc verlängert werden, welche nach Aktivierung durch Glycosyltransferasen auf die wachsende Glykankette übertragen werden. Es gibt aber auch einige Proteine, deren O-Glykane mit O-GlcNAc, O-Glc, O-Fuc, oder O-Man initiiert werden (Brockhausen, 1999; Brockhausen et al., 2009; Hart und Akimoto., 2009).

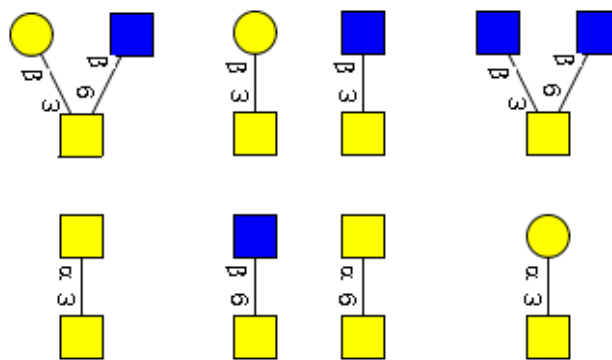
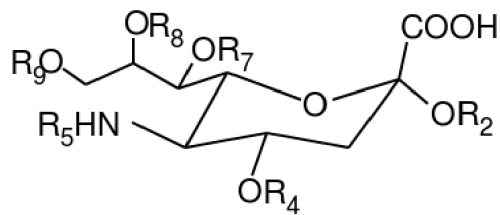


Abbildung 2: Die acht Basisstrukturen der O-Glykane

1.4 Sialinsäuren

In den Glykanen der Säuger findet man neben den ungeladenen Zuckern auch die unter physiologischen Bedingungen einfach negativ geladenen Sialinsäuren. Diese sauren Aminozucker bestehen aus einem 9 Kohlenstoffatome umfassenden Grundgerüst, welches am C5-Atom eine Aminogruppe trägt (Blix et al., 1957). Die negative Ladung kommt durch die am C2-Atom gebundene Carboxylgruppe zustande. Neben der nur selten vorkommenden unsubstituierten Form (Manzi et al., 1990) sind etwa 50 natürliche Sialinsäuren beschrieben worden, da sowohl die Aminogruppe als auch die vier vorhandenen Hydroxylgruppen durch verschiedene Reste substituiert sein können (Abb. 3) (Varki, 1992).



- R_2 H bei freier Sialinsäure, α -Verknüpfung zu Gal, GalNAc, GlcNAc, Sialinsäure
 R_4 H, O-Acetyl
 R_5 H, N-Acetyl, N-Glykoly, Hydroxyl
 R_7 H, O-Acetyl
 R_8 H, O-Acetyl, O-Methyl, O-Sulfat, Sialinsäure
 R_9 H, O-Acetyl, O-Lactyl, O-Phosphat, O-Sulfat, Sialinsäure

Abbildung 3: Strukturformel der Sialinsäure und natürlich vorkommende Substituenten (Abb. nach Varki, 1992)

Die häufigste Sialinsäure ist die N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), welche auch den Vorläufer für die anderen Formen darstellt. Die meisten Derivate entstehen durch Substitution der Hydroxylgruppen mit Phosphat-, Sulfat-, Methyl-, Acetyl- und Lactylgruppen. Im Säugetier kann die N-Acetylneuraminsäure weiter zu N-Glycolylneuraminsäure hydroxyliert werden. Eine Ausnahme stellt der menschliche Organismus dar, in dem dies nicht möglich ist, da das Gen für die CMP-Sialinsäurehydroxylase durch eine Deletionsmutation nicht mehr vorhanden ist (Irie et al., 1998; Varki, 2001). Die Sialinsäuren können als endständige Monomere vorliegen, aber auch langkettige Polymere bilden. Durch ihre endständige Position sind Sialinsäuren an Interaktionen der betroffenen Proteine mit anderen Molekülen direkt beteiligt und spielen aufgrund ihrer negativen Ladung eine besondere Rolle bei Zell-Zellkontakten und Wechselwirkungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix. Durch die hohe Anzahl an Sialinsäurederivaten wird die ohnehin schon vorhandene chemische und biologische Vielfalt der Glykane zusätzlich erhöht. Ausgangsmolekül für die Biosynthese der Sialinsäure, welche in Abb. 4 dargestellt ist, ist das UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc). Es wird aus Fructose-6-phosphat, welches aus der Glykolyse abgezweigt wird, synthetisiert. UDP-GlcNAc wird durch das für den Aminosäurestoffwechsel bedeutende Enzym Glutamin-Fructose-6-phosphat-Aminotransferase zu Glucosamin-6-phosphat aminiert (Kornfeld et al., 1964). Daraus entsteht nach Übertragung eines Acetylrestes und eines UTPs unter Abspaltung von Pyrophosphat UDP-GlcNAc. Im nächsten Schritt wird UDP-GlcNAc durch die bifunktionelle UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (GNE) zu ManNAc epimerisiert und an Position 6 phosphoryliert (Hinderlich et al., 1997; Stäsche et al., 1997). Durch die Neu5Ac-9-Phosphat-Synthase wird ManNAc-6-Phosphat in Neu5Ac-9-Phosphat umgewandelt, welches durch

Abspaltung des Phosphatrestes in Neu5Ac überführt wird. Neu5Ac wird im Gegensatz zu anderen Monosacchariden durch die CMP-Neu5Ac-Synthetase im Zellkern und nicht im Zytosol mit CMP aktiviert (Kean, 1970). Die CMP-Neu5Ac wird über den CMP-Neu5Ac-Transporter in den Golgi transportiert, wo sie unter Abspaltung von CMP durch Sialyltransferasen auf Glykane übertragen wird (Eckhardt et al., 1996; Harduin-Lepers et al., 1995; Harduin-Lepers et al., 2005). Die Epimeraseaktivität der GNE wird durch Bindung des Endprodukts CMP-Neu5Ac inhibiert (Kornfeld et al., 1964). Somit nimmt dieses Enzym eine Schlüsselposition in der Sialinsäuresynthese ein. Während die Hydroxylierung von Neu5Ac zu Neu5Gc direkt am aktivierten Nukleotid stattfindet, können die Hydroxylgruppen der Neuraminsäure erst nach dem Einbau in die Glykane durch entsprechende Transferasen substituiert werden (Kawano et al., 1995; Reuter und Gabius, 1996).

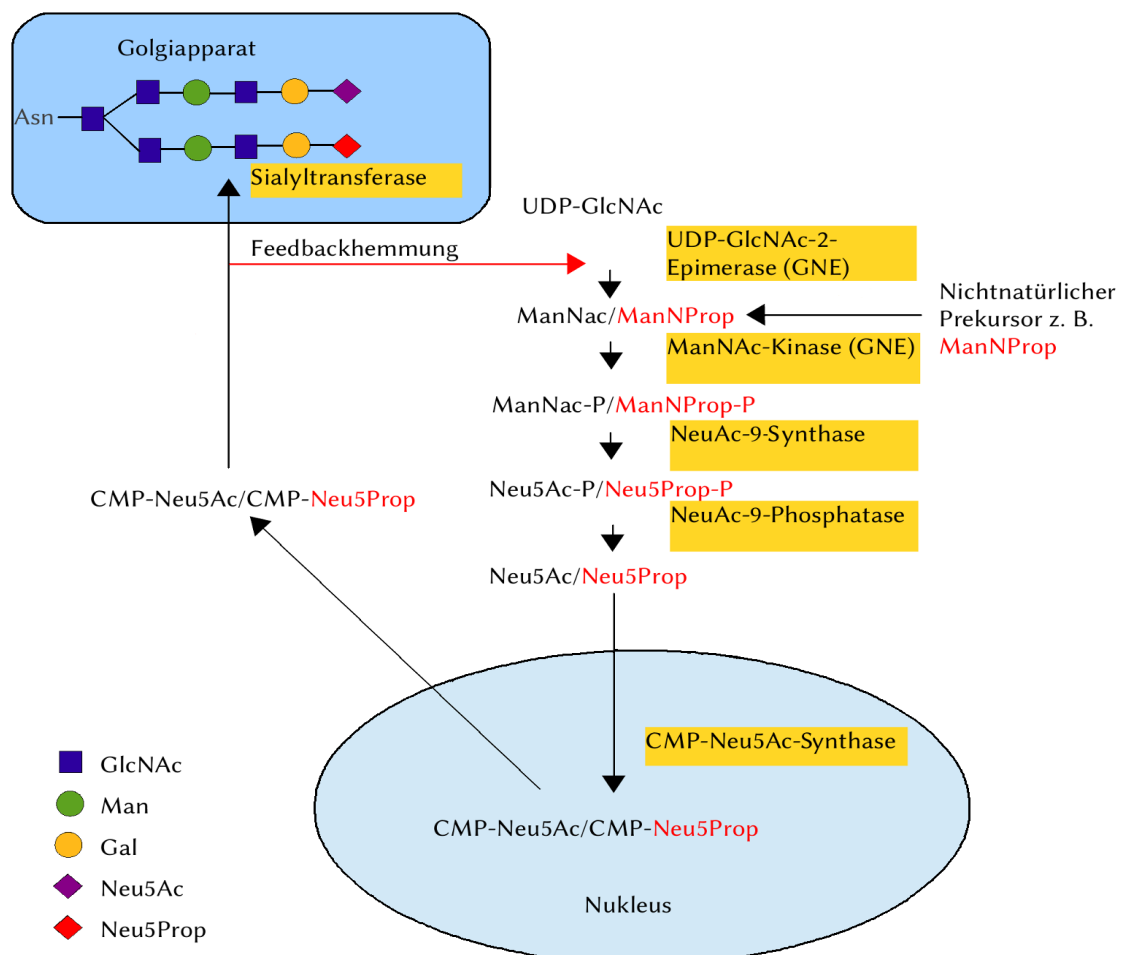


Abbildung 4: Biosynthese der Neuraminsäure, rot dargestellt ist die Synthese nicht-nativer Neuraminsäuren ausgehend von Mannosaminderivaten z. B. ManNProp, siehe auch 1.8 (Abb. modifiziert nach Keppler et al., 2001)

1.5 Bedeutung in natürlichen Systemen

Obwohl an der Glykansynthese nur relativ wenige Monosaccharide beteiligt sind, ergibt sich, bedingt durch die möglichen Verzweigungstypen, Verknüpfungstypen, Ringgrößen und anomere C-Atome der Strukturen, eine viel größere Anzahl an möglichen Glykanen für eine gegebene Anzahl an Monosacchariden als für ein Peptid aus der gleichen Anzahl an Aminosäuren, die nur einen Verknüpfungstyp zulassen und nur linear miteinander verbunden werden können. Die Glykosylierung eines Proteines hängt zum einen von der Anzahl und Position der Glykosylierungsstellen und zum anderen von den Konzentrationsverhältnissen der beteiligten Zucker und Enzyme ab. Dadurch ist es möglich, eine räumlich und zeitlich differenzierte Glykosylierung zu erreichen. Ein und dasselbe Protein kann gewebespezifisch bzw. entwicklungspezifisch unterschiedlich glykosyliert sein und dabei unterschiedliche Funktionen erfüllen (Rademacher et al., 1988). Die Glykosylierung ist unter anderem wichtig für Signaltransduktions- und Zelladhäsionsprozesse. Beim Epidermal Growth Faktor Receptor (EGFR) ist die Fukosylierung eine Bedingung für die Bindung von EGF an diesen Rezeptor (Wang et al., 2006). Parasiten wie z. B. *Trypanosoma cruzi*, dem Erreger der Chagaskrankheit, können Sialinsäuren des Wirtsorganismus mittels einer Transsialidase sequestrieren und damit ihre eigenen Glykoproteine maskieren. Sie entgehen somit der Immunabwehr des Wirtes (Colli, 1993). Auch die *Zona pellucida* der Eizelle ist umfangreich mit Sialinsäuren maskiert und entzieht sich so dem mütterlichen Immunsystem (Schauer, 1985). Andererseits werden Sialinsäuren von Parasiten und Viren als Zielstrukturen genutzt. Das Oberflächenprotein Pf200 von *Plasmodium falciparum* erkennt beispielsweise spezifische sialylierte Glykane des Glycophorins auf humanen Erythrozyten und bindet an diese, um dann in die Erythrozyten einzudringen (Perkins und Rocco, 1988). Inflenzaviren binden mittels Hämagglutinin, einem sialinsäurespezifischen Lektin an Neu5Ac-Gal-Strukturen der Wirtszellen (Suzuki et al., 2000). Die Spezifität dieser Hämagglutinine, z. B. für α 2-3 oder α 2-6 verknüpfte Sialinsäuren, ist abhängig vom Virusstamm und bestimmt im Zusammenhang mit dem Vorhandensein der genannten Epitope beim Wirt die Pathogenität des Virusstamms. Der Vogelgrippe auslösende Stamm H5N1 ist für Menschen nur schwach pathogen, weil die oberen Luftwege eine α 2-6-Sialylierung aufweisen und nur die unteren Luftwege eine für das H5N1 erkennbare α 2-3-Sialylierung besitzen, die nur bei hohen Infektionsdosen erreicht werden (Varki und Varki, 2007; Chandrasekaran et al., 2008).

1.6 Stabilität und Löslichkeit von glykosylierten Serumproteinen

Eine weitere wichtige Funktion der Glykosylierung ist die Erhöhung der Löslichkeit und der

Stabilität der Proteine. Deglykosylierter Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF) und Fibrinogen bilden unlösliche biologisch inaktive Aggregate (Langer et al., 1988; Oh-eda et al., 1990). Durch die Glykosylierung können zudem Proteaseschnittstellen abgeschirmt werden, was die Proteinestabilität erhöht (Wittwer und Howard, 1990; Cantell et al., 1992). Proteine mit sialylierten Glykanen haben zudem eine erhöhte Serumlebensdauer im Vergleich zu Proteinen mit nicht sialylierten Zuckerseitenketten. Wenn die Glykane in Gal enden, werden sie von in den Hepatozyten der Leber lokalisierten Asialoglykoproteinrezeptoren gebunden und abgebaut, was zu einer stark verkürzten Lebensdauer im Blutstrom führt (Ashwell und Harford, 1982). So wird desialyliertes Erythropoietin (EPO) schon nach wenigen Minuten in der Leber absorbiert und abgebaut (Fukuda et al., 1989; Spivak und Hogans, 1989). Vollständig sialylierte Glykoproteine werden dagegen vom Asialoglykoproteinrezeptor nicht erkannt und verbleiben im Blutstrom. Dennoch werden sialylierte Serumproteine durch unspezifische Sialidasen mit zunehmender Zirkulationszeit desialyliert, wodurch Galaktose und Galaktosamin für den Asialoglykoproteinrezeptor zugänglich werden und die desialylierten Proteine aus dem Blutstrom entfernt werden (Weiss und Ashwell, 1989). Das betrifft nicht nur freie Serumproteine, sondern auch ganze Erythrozyten, deren Oberflächenproteine unmittelbar nach der Reife sialyliert sind und die mit zunehmenden Alter desialyliert werden.

1.7 Biotechnologische Bedeutung und Manipulation der Glykosylierung und Sialylierung

Therapeutisch und diagnostisch wichtige Biopharmazeutika, wie Antikörper, Hormone, Wachstumsfaktoren, Impfstoffe und andere rekombinante Proteine werden zunehmend wichtiger für Pharmaindustrie und hatten 2009 einen Marktwert von annähernd 100 Milliarden Dollar (Walsh, 2010). Annähernd 50 % aller eukaryontischen Proteine sind glykosyliert (Apweiler et al., 1999). Daraus folgt, dass auch ein Großteil der für therapeutische Zwecke zugelassenen rekombinanten Proteine glykosyliert ist. So betrug 2009 der Anteil der Glykoproteine an allen zugelassenen biopharmazeutischen Produkten 40 % (Walsh, 2010). Da die Glykosylierungsmuster abhängig von der taxonomischen Zugehörigkeit eines Organismus sind, werden diese hauptsächlich in Säugetierzelllinien hergestellt, um eine weitgehende Ähnlichkeit zu humanen Glykosylierungsmustern zu garantieren. Gleichwohl gibt es erste Bestrebungen, Glykoproteine mit humanisierter Glykosylierung in Hefen und Pflanzenzelllinien zu produzieren, bei denen die eigene Glykosylierungsmaschinerie vollständig ausgeschaltet und durch entsprechende humanspezifische Enzyme ersetzt wurde (Bakker et al., 2006; Hamilton und Gerngross, 2007; Schähs et al., 2007; Jacobs and Callewaert, 2009). Dies

ist sehr wichtig da die Glykanzusammensetzung die biologische Funktion und damit die Wirksamkeit des Therapeutikums beeinflusst. Weil die Glykosylierung eine posttranslationale Proteinmodifikation ist, und damit auch stark von physiologischen Parametern wie Zellalter, pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck, Ammoniumgehalt und Temperatur abhängt (Goochee and Monica, 1990; Borys et al., 1993; Yang and Butler, 2000; Restelli et al., 2006; Gawlitzek et al., 2009), ist das Erreichen einer für ein therapeutisches Produkt essenziellen, gleichbleibenden, möglichst kompletten Glykosylierung und Sialylierung ein großes Problem. Bedingt durch die Kulturbedingungen und durch aus abgestorbenen Zellen freigesetzte Sialidasen ist die Sialylierung oftmals nicht vollständig (Munzert et al., 1997), was sich entweder negativ auf die Serumhalbwertszeit auswirkt oder hohe Nachfolgekosten für die Aufreinigung der vollständig sialylierten Proteinfraction zur Folge hat. Neben der Optimierung der oben genannten Zellkulturbedingungen wird in zunehmendem Maße versucht die natürlich vorkommende Glykosylierung durch chemische, biochemische und molekularbiologische Methoden zu modifizieren, um eine höhere und stabilere Glykosylierung zu erreichen oder die Eigenschaften der Glykoproteine zu verändern. Ein Beispiel für dieses „Glykodesign“ oder „Glykoengineering“ ist unter anderem die *in vitro* Glykosylierung von Proteinen, die nach der Proteinbiosynthese chemisch oder enzymatisch erfolgen kann. Hierbei können die Glykane z. B. mithilfe der β -1,4-Galaktosyltransferase und der α -2,3-Sialyltransferase in Anwesenheit der Nukleotidzucker UDP-Gal und CMP-Neu5Ac terminal galaktosyliert und sialyliert werden, um so die Halbwertszeit zu erhöhen. Dies ist jedoch sehr kostenintensiv (Raju et al., 2001). Polysialinsäure kann unter Verwendung von Natriumcyanoborhydrid in einer reduktiven Aminierung an Proteine gebunden werden (Egrie et al., 2003; Elliott et al., 2003) und deren Serumhalbwertszeit verlängern (Fernandes und Gregoriadis, 1996; Fernandes und Gregoriadis, 1997; Gregoriadis et al., 2000). Eine weitere Methode besteht in der Einführung zusätzlicher Glykosylierungsstellen in die Proteinsequenz durch Mutagenese der zugehörigen DNA-Sequenz, welche ebenfalls zu einer höheren Glykosylierung und damit Sialylierung führt. Dabei werden N-Glykosylierungsstellen vom Typ Asn-X-Thr eingefügt, deren Glykosylierungseffizienz gegenüber dem Typ Asn-X-Ser deutlich erhöht ist (Kasturi et al., 1997). Weiterhin muss beachtet werden, dass die neue Glykosylierungsstelle nicht in einer aktiven Proteindomäne liegt oder die Faltung des Proteins stört. Erfolgreich wurde diese Methode z. B. beim kommerziellen Darbepoitin α , welches gegenüber natürlichem EPO eine dreifach erhöhte Verweildauer im Serum hat und zwei zusätzliche Glykosylierungsmotive vom Typ Asn-X-Thr aufweist, umgesetzt (Elliott et al., 2003; Egrie et al., 2003). Bei dem normalerweise nicht glykosylierten Interferon α konnte durch Einführung von vier

Glykosylierungsstellen die Halbwertszeit 25-fach erhöht werden (Ceaglio et al., 2008; Ceaglio et al., 2010). Andere Ansätze verfolgen die Modifizierung der Glykosylierungsmaschinerie durch Verstärkung oder Unterdrückung der Expression der beteiligten Enzyme beziehungsweise Mutagenese dieser Enzyme. Durch Deletion des Fukosyltransferasegens in CHO-Zellen können defukosylierte rekombinante Antikörper, die eine um 50- bis 100-fach erhöhte Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität aufweisen, erzeugt werden (Shinkawa et al., 2003; Yamane-Ohnuki et al., 2004). Um die Sialylierung von Glykoproteintherapeutika während der Produktion zu erhöhen, können Enzyme der Sialinsäurebiosynthese in CHO-Zellen überexprimiert (Son et al., 2011) oder die Zellen mit dem Sialinsäurevorläufer ManNAc supplementiert werden (Hinderlich et al., 2001; Tanner, 2005). Dies führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Sialinsäurekonzentration und zur Steigerung der Sialylierungsrate. Die spätere Verringerung der Sialylierungsrate während der Produktion und im Blutstrom kann hierdurch jedoch nicht verhindert werden.

1.8 Modifizierung der Glykane durch nichtnatürliche Sialinsäurevorläufer

Nicht nur ManNAc kann zu Neu5Ac umgesetzt werden, sondern auch andere in der Natur nicht vorkommende N-Acylmannosamine können zu den entsprechenden N-Acylneuraminsäuren verstoffwechselt werden. Das konnte zunächst in einem zellfreien System, dem radioaktiv markiertes ManNProp zugesetzt wurde, nachgewiesen werden (Grünholz et al., 1981). Ratten, die mit radioaktiv markiertem ManNProp behandelt werden, zeigen schon nach wenigen Stunden eine Integration der dazugehörigen N-Acetylpropanoylneuraminsäure in den Glykanen der Serum- und Membranproteine (Kayser et al., 1992). Außer N-Propanoylmannosamin können aber auch N-Butanoyl-, N-Pentanoyl-, Hexanoyl-, Crotonoyl-, Levinoyl- und Azidoacetylmannosamin metabolisiert werden (Keppler et al., 2001).

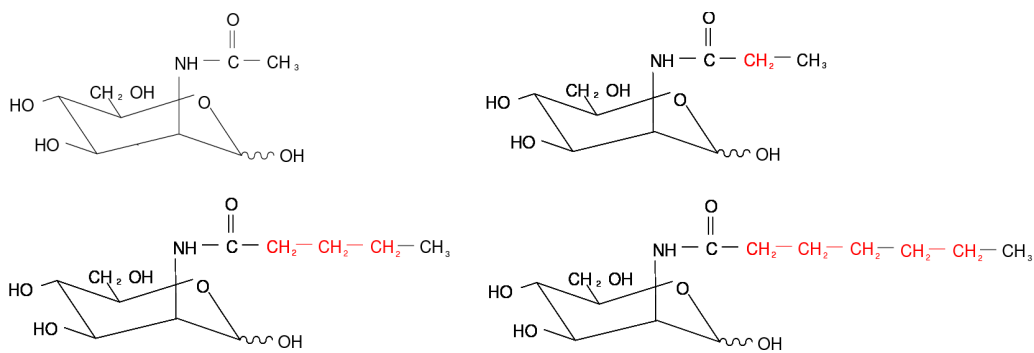


Abbildung 5: Verschiedene N-Acylmannosamine: A) N-Acetylmannosamin, der physiologische Präkursor der Sialinsäuren, und die in dieser Arbeit verwendeten Derivate B) N-Propanoylmannosamin, C) N-Pentanoylmannosamin und D) N-Heptanoylmannosamin

In Abb. 5 sind neben dem physiologischen Vorläufermolekül ManNAc die in dieser Arbeit verwendeten Derivate ManNProp, ManNPent und ManNHept dargestellt. Sie werden analog zu ManNAc aufgrund der nur gering spezifischen ManNAc-Kinase und den folgenden Enzymen der Sialinsäurebiosynthese in die entsprechenden neuartigen, nicht-nativen Sialinsäuren umgesetzt (siehe Abb. 4), welche dann je nach Zelltyp und verwendetem N-Acylmannosamin bis zu 85 % der in den Glykanen inkorporierten Sialinsäuren ausmachen (Keppler et al., 2001). Aminozucker wie ManNAc und seine Derivate passieren normalerweise nicht die Zellmembran und werden erst durch Zugabe in millimolarer Größenordnung von den Zellen aufgenommen, wobei angenommen wird, dass unter diesen Bedingungen die Aufnahme der Aminozucker in Abhängigkeit der Hydrophobizität entweder durch Endozytose oder passive Diffusion stattfindet (Collins et al., 2000; Bardor et al., 2005).

1.9 Erythropoietin

Erythropoietin (EPO), dessen Name sich vom altgriechischen ἐρυθρός erythros „rot“ und ποιεῖν poiein „machen“ ableitet, ist ein Glykoproteinormon aus der Klasse der Zytokine. Es stimuliert das Wachstum der Erythroblasten im Knochenmark. 1863 beschrieb der französische Arzt Denis Jourdanet zum ersten Mal den Zusammenhang zwischen dem niedrigen Sauerstoffpartialdruck in großer Höhe und der erhöhten Anzahl roter Blutkörperchen im Blut von Menschen, die in Hochgebirgsregionen leben. Friedrich Miescher beschrieb 1893 die Bildung der Erythrozyten als Folge einer Sauerstoffunterversorgung des Knochenmarks. 1906 stellten die Franzosen Paul Carnot und Catherine Deflandre anhand von Transfusionsversuchen, bei denen durch Aderlass anämisch gemachten Kaninchen Serum entnommen und gesunden Tieren injiziert wurde, die Hypothese auf, dass ein humoraler

Faktor an der Blutbildung beteiligt ist. Sie beobachteten einen Anstieg der Erythrozytenkonzentration. Diese Experimente konnten jedoch lange nicht genau genug reproduziert werden. Erst 1953 konnte die Existenz von EPO durch Allan Jacob Erslev wirklich bewiesen werden (Erslev, 1953). Da die Konzentration mit nur etwa 50 ng/L Blutplasma sehr gering ist, dauerte es noch bis 1977, bis das Protein erstmals im Milligramm Maßstab von Eugene Goldwasser und seinen Mitarbeitern aus 2550 L Urin anämischer Patienten isoliert werden konnte (Miyake et al., 1977). 1985 wurde schließlich das EPO-Gen isoliert und in CHO-Zellen exprimiert (Jacobs et al., 1985; Lin et al., 1985).

1.10 Vorkommen und biologische Funktion von EPO

EPO wird im embryonalen Organismus hauptsächlich in der Leber, im erwachsenen Menschen jedoch zu 85 bis 90 % in der Niere durch peritubuläre Fibroblasten gebildet (Bachmann et al., 1993). Der Rest wird zum größten Teil in den Hepatozyten der Leber produziert, aber es konnten auch andere Syntheseorte nachgewiesen werden, wie Lunge, Milz, Knochenmark, Hoden, Gebärmutter, Haarfollikel und Gehirn (Tan et al., 1992; Fandrey und Bunn, 1993; Marti et al., 1996). Das 34 kDa schwere und aus 165 Aminosäureresten bestehende Protein besitzt eine O-glykosidisch (Ser 126) und drei N-glykosidisch (Asn 24, 38 und 83) gebundene Zuckerseitenketten, welche annähernd 40 % der Proteinmasse ausmachen. Es liegen je eine Disulfidbrücke zwischen Cys 7 und Cys 161 sowie zwischen Cys 29 und Cys 33 vor. EPO entsteht bei der Biosynthese aus einem 193 Aminosäurereste umfassenden Prohormon, bei dem ein aus 27 Aminosäureresten bestehendes N-terminales Signalpeptid vor der Sekretion abgespalten wird. Die grundlegende Funktion von EPO besteht in der Stimulation des Wachstums der Erythroblasten vom Typ BFU-E und CFU-E (Iscove und Sieber, 1975; Gregory, 1976; Gregory and Eaves, 1977). Der wachstumsfördernde Effekt auf diese Zelltypen kommt durch die Hemmung derer Apoptose zustande (Koury und Bondurant, 1990; De Maria et al., 1999). Die vielfältigen Signaltransduktionskaskaden, die durch EPO ausgelöst werden können beginnen mit der Bindung von EPO an seinen EPO-R genannten membranständigen Rezeptor, der von D'Andrea *et al.* charakterisiert wurde (D'Andrea et al., 1989). Dieser dimerisiert unter der Bindung von EPO und aktiviert über eine Transphosphorylierung die an der cytoplasmatischen Seite am Rezeptor gebundene Januskinase-2 (Witthuhn et al., 1993). Im weiteren Verlauf werden die endständigen Tyrosinreste des EPO-R phosphoryliert, was zur Bindung des Signaltransduktionsproteins STAT5 führt (Constantinescu et al., 1999). Es dimerisiert und bindet an zytokinresponive Promotorelemente z. B. des Bcl-X-Gens, welches den antiapoptotischen Faktor Bcl-X_L in den erythrogenen Zellen kodiert (Socolovsky et al.,

1999). Außer dem JAK2/STAT-Signalweg können durch EPO/EPO-R auch der MAP-Kinase-, Proteinkinase C- sowie der PI-3K/Akt-Signalweg aktiviert werden (Klingmüller, 1997), wobei Letzterer bei der Hemmung der Apoptose eine Rolle spielt. EPO ist jedoch nicht nur an der Hämatopoese beteiligt, sondern steuert eine Vielzahl anderer Prozesse, die erst in jüngerer Zeit entdeckt wurden. So findet sich der EPO-Rezeptor im Herzmuskelgewebe und hat dort einen kardioprotektiven Effekt bei Mangel durchblutung, welcher durch Hemmung der Apoptose über den 3K/Akt-Signalweg zustande kommt (Tramontano et al., 2003). Außerdem wird die Expression des entzündungshemmenden Interleukins 10 hoch reguliert, während die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und IL 1- β über den JAK/STAT-Weg herunter reguliert werden (Li et al., 2006). EPO aktiviert hier auch ERK 1/2 sowie PKC- ϵ , was im Tiermodell die Ausdehnung eines Herzinfarkt verringert (Miki et al., 2007; Hanlon et al., 2005). Weiterhin wird die Expression vom Hitzeschockprotein HSP 70 verstärkt und die von NF- κ B gehemmt, was ebenfalls die Auswirkungen eines Herzinfarkts verringert (Xu et al., 2005). Im Zentralnervensystem wird EPO-R in Neuronen und EPO in den Astrozyten exprimiert, was einem parakrinen System gleichkommt (Masuda et al., 1993; Masuda et al., 1994; Lombardero et al., 2011). Auch hier hat EPO eine zellschützende Funktion durch Hemmung der Apoptose über den PI3K/Akt-Signalweg (Ruscher et al., 2002). Im Rattenmodell des Hirninfarkts steigt nach Zugabe von EPO die Konzentration des neurotrophen Faktors BDNF (brain-derived neurotrophic factor) und des Endothel stimulierenden VEGF (vascular endothelial growth factor) (Wang et al., 2004). Weiterhin wirkt EPO wachstumsfördernd auf Endothelvorläuferzellen und stimuliert die Angiogenese (Carlini et al., 1995; Heeschen et al., 2003; Bahlmann et al., 2004). EPO-R wurde auf glatten Muskelzellen des Vaskularsystems gefunden (Ammarguella et al., 1996; Akimoto et al., 2000). EPO ist hier an Regulation des cytosolischen Ca²⁺ Spiegels beteiligt, bewirkt die Aktivierung von Phospholipase C und löst Muskelkontraktionen aus (Neusser et al., 1993; Gogusev et al., 1994; Morakkabati et al., 1996). Die Expression von EPO selbst hängt vom Sauerstoffpartialdruck im Gewebe ab. Das Gen wird über einen HIF-1 (Hypoxie induzierter Faktor) genannten Transkriptionsfaktor reguliert, der bei niedriger Sauerstoffsättigung an die Promotorregion des EPO-Gens bindet und dessen Transkription zulässt (Wang und Semenza, 1993). Er besteht aus 2 Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β . HIF-1 α wird unter normalem Sauerstoffpartialdruck vom Enzym HIF-Prolylhydroxylase an zwei Prolylresten hydroxyliert, anschließend ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut. Unter Sauerstoffmangel findet die Hydroxylierung, die vom Cosubstrat Sauerstoff abhängt, nicht statt, so dass HIF-1 α an HIF-1 β binden kann. Erst jetzt kann der HIF-1 Komplex an den Promotor des EPO-Gens binden und dieses aktivieren (Maxwell et al., 1999;

Semenza, 2004). Die am EPO gebundenen Glykane sind für seine Funktion *in vivo* essenziell. Desialyliertes oder deglykosyliertes EPO zeigt zwar in Versuchen mit Knochenmarkzellen biologische Aktivität (Dordal et al., 1985), wird aber *in vivo* innerhalb kürzester Zeit aus dem Blutstrom entfernt (Fukuda et al., 1989) und hat daher keinen hämatopoetischen Effekt. Dabei wird desialyliertes EPO, wie auch andere desialylierte Glykoproteine, durch die Asialoglykoproteinrezeptoren der Hepatozyten erkannt, internalisiert und abgebaut (Weiss und Ashwell, 1989). Aber auch EPO-R ist an der Internalisation von EPO beteiligt (Sawyer et al., 1987), wobei dies unabhängig von der Aktivierung des nachfolgenden JAK2/STAT-Signaltransduktionsweges bzw. der Tyrosinphosphorylierung des EPO-R geschieht (Beckman et al., 1999). Paradoxe Weise ist die Affinität von EPO zum EPO-Rezeptor in der deglykosylierten Form am höchsten und nimmt mit zunehmender Anzahl sialylierter Glykane stark ab. Aufgrund der höheren Halbwertszeiten der sialylierten EPO-Spezies wird die notwendige minimale effektive Konzentration, die bei sialyliertem EPO zwar höher ist, viel später unterschritten, wodurch über einen längeren Zeitraum betrachtet, die relative Konzentration des sialylierten EPOs die des desialylierten bei Weitem überschreitet. Die längere Exposition der EPO-R tragenden Zellen zum sialyliertem EPO resultiert daher in eine höhere Aktivität *in vivo* (Elliott et al., 2004).

1.11 EPO als therapeutisches Glykoprotein

Schon lange bevor EPO direkt isoliert werden konnte, erkannte Erslev das Potential von EPO für die Therapie chronischer Anämien (Erslev, 1953). Aber erst 34 Jahre später, nachdem die Möglichkeit gegeben war, rekombinantes EPO herzustellen, konnte es erstmals für die Therapie renaler Anämien im Endstadium eingesetzt werden (Winearls et al., 1986; Eschbach et al., 1987). Seitdem gehört rekombinantes EPO zu den wirtschaftlich wichtigsten für therapeutische Zwecke verwendeten Glykoproteinen. Im Jahr 2009 wurden auf EPO basierende Produkte im Wert von 9,5 Milliarden Dollar verkauft (Walsh, 2010). RhEPO hat die gleiche Aminosäuresequenz wie humanes EPO, aber bedingt durch die Herstellung in unterschiedlichen Säugerzelllinien, ein in der Mikroheterogenität abweichendes Glykosylierungs- und Sialylierungsmuster. Die Zirkulationshalbwertszeiten von rhEPO sind mit 6–8 h sehr kurz, wodurch die intravenöse Therapie chronisch kranker Patienten aufgrund kurzer Behandlungsintervalle und der hohen Produktionskosten unzumutbar ist. Daher wurde schon bald nach Möglichkeiten gesucht, die Serumhalbwertszeiten durch gezielte Veränderungen im EPO zu verlängern. Im Jahr 2000 wurde Darbepoetin α entwickelt, welches zwei zusätzliche Glykosylierungsstellen durch Einführung zweier As-X-Thr Motive enthält

(Egrie und Browne, 2001). Dadurch steigt sowohl der Anteil der Sialinsäuren als auch das Molekulargewicht, wodurch sich eine im Vergleich zu rhEPO drei- bis vierfach erhöhte Halbwertszeit ergibt. Trotz der geringeren Affinität zum EPO-R ist die biologische Aktivität größer als beim rhEPO, was sich auf den oben genannten Zusammenhang zwischen minimaler effektiver Konzentration und Halbwertszeit zurückführen lässt.

2 Zielstellung

Sialinsäuren sind ein wesentlicher Bestandteil der Glykane in den Glykoproteinen von Säugern und spielen für deren Funktion und Serumhalbwertszeit eine große Rolle. Therapeutische Glykoproteine sind im Blutstrom und im Herstellungsprozess Sialidasen ausgesetzt, die zur Desialylierung führen. Desialylierte Glykoproteine haben für therapeutische Zwecke nur einen geringen Wert, da sie von Asialoglykoproteinrezeptoren der Leber gebunden werden und schnell degradiert werden. Eine hohe und stabile Sialylierung ist daher von herausragender Bedeutung für die Halblebenszeit von therapeutischen Glykoproteinen. Eine Möglichkeit, eine stabilere Sialylierung zu erreichen, besteht in der Verwendung von chemisch modifizierten Sialinsäurevorstufen, die unspezifisch von der ManNAc-Kinase als Substrat genutzt und in entsprechenden modifizierten Neuraminsäuren umgesetzt werden. Die Abspaltung derartiger Sialinsäuren durch Sialidasen könnte aufgrund der sterischen Änderungen verzögert sein und damit ausgestattete Glykoproteine eine verlängerte Halbwertszeit haben. Für EPO liegen trotz seiner großen Bedeutung als therapeutisches Glykoprotein keine Untersuchungen dieser Art vor. Daher sollte in dieser Arbeit die Sialylierung von rekombinant in CHO-Zellen exprimierten EPO durch die Zugabe der modifizierten Sialinsäurevorstufen ManNProp, ManNPent und ManNHept zum Zellkulturmedium verändert werden. Die Integration der resultierenden Neuraminsäuren Neu5Prop, Neu5Pent und Neu5Hept sollte durch eine Analyse mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie überprüft werden. Die Resistenz gegenüber Desialylierung sollte in einem Sialidaseassay untersucht werden, wobei der Grad der Desialylierung durch eine isoelektrische Fokussierung mit anschließender 2D-Gelelektrophorese bestimmt werden sollte.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Gibco (Detroit, USA), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen. Sterile Verbrauchsmaterialien für den Einmalgebrauch in der Zellkultur wurden von den Firmen Falcon (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen), Invitrogen (Carlsbad, USA) und Nunc (Wiesbaden) bezogen.

3.2 Verwendete Organismen

3.2.1 *Escherichia coli*

Für Klonierungsversuche wurde der *E. coli* Stamm TOP 10 (Invitrogen, Carlsbad, USA) vom Genotyp F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) end A1 nupG verwendet.

3.2.2 CHO-S-Zellen

Für Expressionsexperimente mit EPO wurde die Säugerzelllinie CHO-S von Invitrogen (Carlsbad, USA) verwendet. Dabei handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie, die ursprünglich aus dem Ovar des Chinesischen Hamsters *Cricetulus griseus* gewonnen wurde und sich aufgrund des schnellen Wachstums besonders gut für Expressionsversuche eignet. Die CHO-S-Zelllinie zeichnet sich dadurch aus, dass ihre Zellen im serumfreien Zellkulturmedium nicht adhärent wachsen und bei Serumzusatz adhärent werden. Ersteres Wachstumsverhalten ist ideal für die Proteinexpression, letzteres für die Transfektion mit Lipofektamin.

3.3 Oligonukleotide und Plasmide

3.3.1 Oligonukleotide (Primer)

Oligonukleotide für diverse Polymerasekettenreaktionen wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. Folgende Primer wurden verwendet:

Tabelle 2: Primer für die Polymerasekettenreaktion

Primer	Sequenz
Epo Entry forward	5'AGCGGCTCTTCAATGGGGGTGCACGAATGTCCTG3'
Epo Entry reverse	5'AGCGGCTCTTCTCCCTCTGTCCCCTGTCCTGCAG3'

3.3.2 Plasmide

Für Transfektionsexperimente wurde der eukaryontische Vektor pL748-pKex-EPO (Abb. 6), der freundlicherweise von der AG Horstkorte zur Verfügung gestellt wurde, verwendet. Er enthält die cDNA des humanen Erythropoetins unter der Kontrolle eines CMV-Promotors sowie einer Hygromycinresistenz. Um EPO mit einem C-terminalen Streptag zu versehen, wurde die EPO-cDNA dieses Vektors mittels PCR amplifiziert und durch 2 Rekombinationsereignisse über den Zwischenvektor pENTRY51 in den Vektor pESG-IBA3 (Abb. 7) kloniert, welcher Teil des StarGate Kits der IBA GmbH (Göttingen) ist. Letzterer enthält neben einem CMV-Promotor, eine StreptagII-Sequenz und eine Gentamycinresistenz.

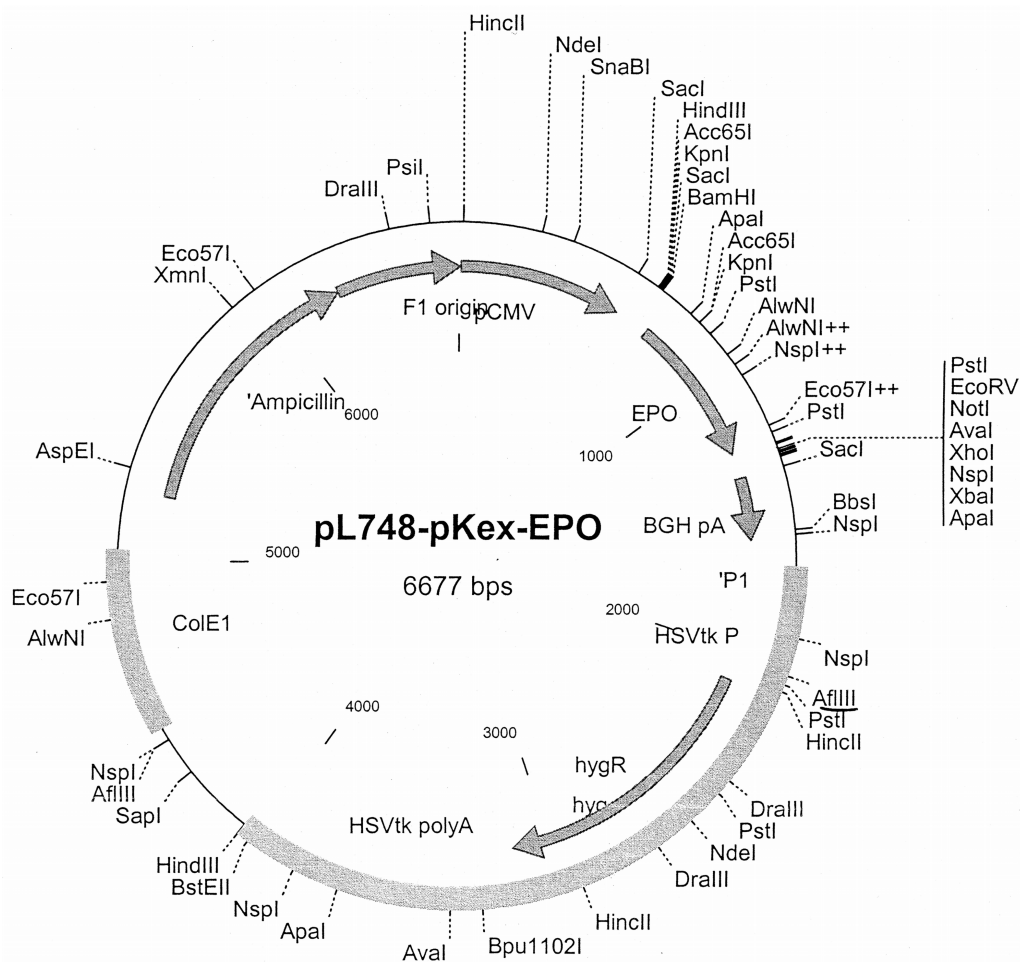


Abbildung 6: Karte des Expressionsvektors pL748-pKEX-EPO

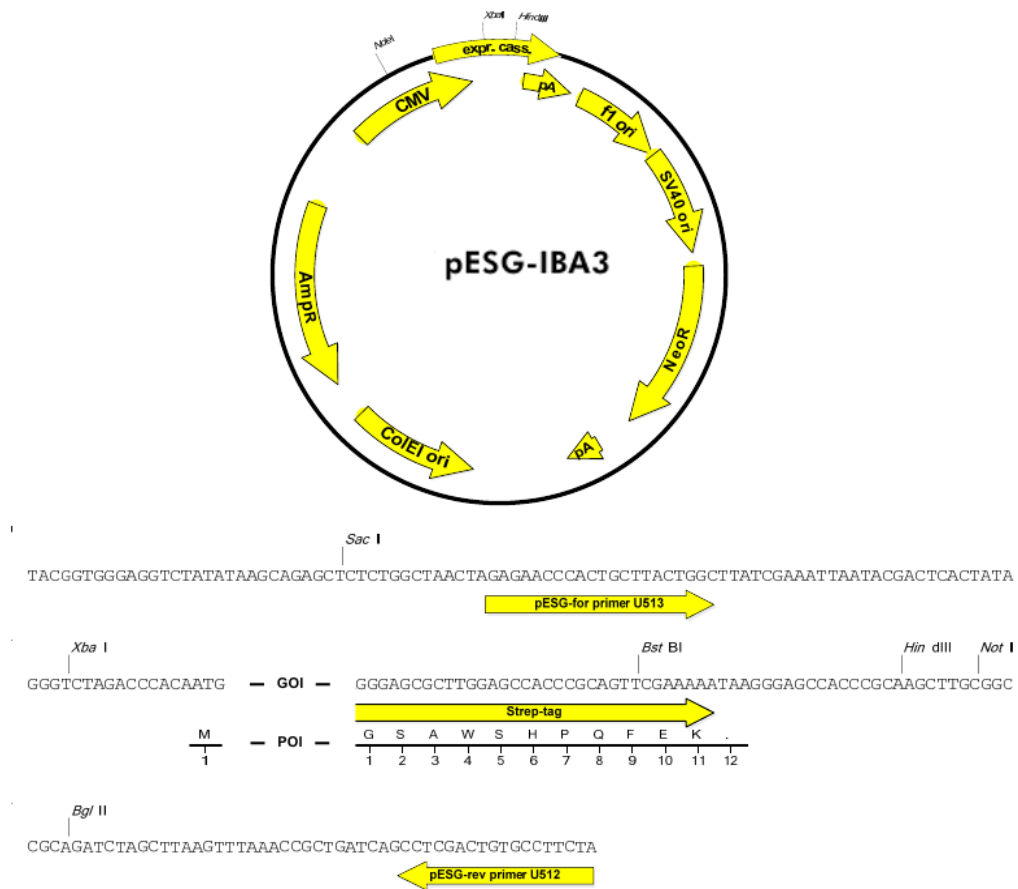


Abbildung 7: Vektorkarte des Expressionsvektors pESG-IBA3: A) Übersicht B) Expressionskassette (Abb. nach pESG-IBA3 Datenblatt, IBA GmbH, Göttingen)

3.4 Antikörper und Enzyme

3.4.1 Antikörper

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-EPO B4 Maus monoklonal 200 µg/ml	1:1000	Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, USA)
Anti-EPO H-162 Kaninchen polyklonal 200 µg/ml	1:1 für Immunpräzipitation	Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, USA)
Ratte-anti-Maus Peroxidasekonjugat 800 µg/ml	1:5000	Dianova (Hamburg)
Ziege-anti-Kaninchen Peroxidasekonjugat 400 µ/ml	1:5000	Dianova (Hamburg)

3.4.2 Enzyme

Für den Sialidaseassay wurde Sialidase A (Neuraminidase) aus *Clostridium perfringens* verwendet, die von Roche (Mannheim) bezogen wurde. Sie spaltet α 2-3, α 2-6 und α 2-8 gebundene Sialinsäurereste aus Glykanen ab. Für analytische Restriktionsverdau wurden die Restriktionsenzyme Hind III und Xba I von Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet.

3.5 Kits und Größenmarker

Tabelle 4: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Biolytes	Bio-Rad (München)
Luminata Forte Western HRP Substrate	Millipore (Billerica, USA)
Phusion High-Fidelity Master Mix (F531)	Finnzymes (Vantaa, Finnland)
QIAprep Spin Miniprep-Kit (250)	Qiagen (Hilden)
Qiaquick Gel Extraction Kit (250)	Qiagen (Hilden)
StarGate Cloning Kit	IBA GmbH (Göttingen)
Streptaktin-Sepharose	IBA, (Göttingen)
Trypan Blue Stain 0,4 %	Invitrogen (Carlsbad, USA)

Tabelle 5: Verwendete Größenmarker

Marker	Hersteller
Protein Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (10-250 kDa)	Fermentas, (St. Leon-Rot)
GeneRuler™1kb Plus DNA Ladder	Fermentas, (St. Leon-Rot)

3.6 Medien und Antibiotika

3.6.1 Antibiotika

Zur Sterilhaltung der empfindlichen Zellkulturen wurden Penicillin und Streptomycin verwendet (Invitrogen, Carlsbad, USA). Zur Selektion wurden je nach Resistenzmarker Ampizillin, Kanamycin (Invitrogen, Carlsbad, USA), Hygromycin und G418-Sulfat (PAA, Pasching, Österreich) eingesetzt.

3.6.2 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl

auf 1l *Aqua bidest.* auffüllen und autoklavieren.

LB-Agar

enthält zusätzlich 15 g Agar.

3.6.3 Medien für die Zellkultur

α -MEM-Medium

10 % v/v FCS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
100 U/ml Penizillin
0,1 mg/ml Streptomycin
0,272 mg L-Glutamin

in 500 ml α -MEM (Gibco, Detroit, USA) geben.

CHO-SF-II-Medium

100 U/mL Penicillin
0,1 mg/mL Streptomycin
0,292 mg L-Glutamin

in 500 ml CHO-SF-II (Gibco, Detroit, USA) lösen.

Transfektionsmedium

Für Transfektionen wurde Optimem (Invitrogen, Carlsbad, USA) ohne Zusatz von Antibiotika und Serum in Kombination mit Lipofetamin 2000 (Invitrogen, Carlsbad, USA) gemäß Herstellerangaben verwendet.

3.7 Lösungen, Gele und Membranen

Agarosegel zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

TAE-Puffer

0,04 M Tris/HCl, pH 8,5
0,1 % v/v Eisessig
2 mM EDTA

Agarosegel

1 % w/v Agarose in TAE-Puffer aufkochen, 1 μ l Ethidiumbromid je 50 ml Gel.

10x DNA-Ladepuffer

50 % v/v	Glycerin
50 mM	EDTA
0,05 % w/v	Bromphenolblau
0,05 % w/v	Xylencyanol

SDS-Polyacrylamidgel

Gelpuffer

Lösung 1 für Trenngele

1,5 M	Tris pH 8,8
0,2 % w/v	SDS

Lösung 2 für Sammelgele

0,5 M	Tris pH 6,8
0,2 % w/v	SDS

Tabelle 6: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

Trenngel 10 %	Sammelgel 4 %
7,5 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	1,6 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
5,6 ml Lösung 1	3 ml Lösung 2
9,4 ml <i>Aqua bidest.</i>	7,4 ml <i>Aqua bidest.</i>
125 µl APS 10 % v/v	48 µl APS 10 %
12,5 µl TEMED	12 µl TEMED

5x reduzierender Proteinladepuffer

12,5 % w/v	SDS
0,3 M	Tris/HCl, pH 6,8
50 % v/v	Glycerin
25 % w/v	DTT
0,015 % w/v	Bromphenolblau

10x Proteinlaufpuffer

0,25 M	Tris pH 8,8
1,92 M	Glycin
1 % w/v	SDS (w/v)

Coomassieblau Färbelösung

5 % w/v	$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O}$
0,02 % w/v	Coomassie Brilliantblau G 250
10 % v/v	Ethanol (96 %)
2 % v/v	H_3PO_4 (85 %)

Die Reihenfolge des Auflöserns der Komponenten ist hier essenziell. Zuerst wird das Aluminiumsulfat in *Aqua bidest.* gelöst, dann Coomassieblau und Ethanol hinzugeben. Die Phosphorsäure wird erst nach vollständiger Lösung der anderen Komponenten hinzugegeben und bewirkt eine Fällung des Coomassies in Form kolloidaler Partikel. Die Lösung ist in einer dunklen Flasche für mehrere Monate haltbar. Vor Gebrauch muss die Lösung kurz geschüttelt werden.

Entfärbelösung

10 % v/v	Ethanol (96 %)
2 % v/v	H_3PO_4 (85 %)

Puffer für die 2D-GelelektrophoreseRehydrationspuffer

8,45 M	Harnstoff
2 % w/v	CHAPS
57,5 mM	Dithiothreitol
0,2 % w/v	Biolytes Bio-Rad (München)
0,001 % w/v	Bromphenolblau

Tabelle 7

Equilibrierungspuffer I		Equilibrierungspuffer II	
6 M	Harnstoff	6 M	Harnstoff
2 % w/v	SDS	2 % w/v	SDS
0,375 M	Tris/HCl, pH 8,8	0,375 M	Tris/HCl, pH 8,8
20 % v/v	Glycerin	20 % v/v	Glycerin
130 mM	Dithiothreitol	135 mM	Jodoacetamid

Einbettungsgel für IPG-Streifen

0,5 % Agarose in 1x Proteinlaufpuffer

Transferpuffer für Westernblots

150 mM	Glycin
20 mM	Tris/HCl, pH 8,3
10 % v/v	Ethanol (96 %)

10x TBS-Puffer

0,5 M	TRIS/HCl pH 7,5
1,5 mM	NaCl

TBS-Tween

1x TBS-Puffer mit 0,1 % v/v Tween 20 versetzen.

Blockierungslösung

5 % w/v Milchpulver (Roth, Karlsruhe) in TBS-Tween lösen.

Puffer für Streptaktin-Affinitätschromatografie

Puffer W

100 mM	Tris/HCl pH 8.0
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA

Puffer E

Puffer W mit 2,5 mM Desthiobiotin.

Puffer R

1 M	Tris-Cl pH 8.0
1,5 M	NaCl
10 mM	EDTA
10 mM	HABA (Hydroxy-azophenyl-benzoesäure)

PBS-Puffer zum Waschen von Zellen

137 mM	NaCl
3 mM	KCl
8,5 mM	Na ₂ HPO ₄
1,5 mM	KH ₂ PO ₄

PBS-EDTA zum Ablösen schwach adhärenter Zellen

1,34 mM EDTA in PBS-Puffer

Tabelle 8: Verwendete Membranen und Fertiggele

Artikel	Hersteller
Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman (Dassel)

Whatmanpapier	Whatman (Dassel)
IPG-Strips, pH 3–6, 7 cm	Bio-Rad (München)

3.8 Andere Chemikalien

EDTA (Sigma, München)

Trypanblau (Invitrogen, Carlsbad, USA)

Coomassie G 250 (Serva, Heidelberg)

Isopropanol (Merck, Darmstadt)

3.9 Geräte

Tabelle 9: Verwendete Geräte

Allgemeine Bezeichnung	Gerätebezeichnung	Hersteller
Brutschrank für Bakterien	B 6200	Heraeus Holding
Brutschrank für Zellen	Heracell	Heraeus
Feinwaage	MC1	Satorius
Gelelektrophoresesystem	B1 Easycast Horizontal Minigel	Thermo Fisher Scientific
Heizblock	Thermomixer 5436 Thermomixer	Eppendorf UNIVERSAL Labortechnik
Imager	Chem Doc XRS System, Molecular Imager Model	Bio-Rad
Isoelektrische Fokussierkammer	Protean IEF Cell	Bio-Rad
Kühlzentrifuge	Biofuge Fresco Centrifuge 5415 R	Heraeus Eppendorf
Magnetrührer	FB 1500	Fisher Scientific
Mikroskop	Axiovert 100 Telaval 31	Zeiss
Mikrowelle	KOR-6305	Daewoo
PCR-Thermo-Cycler	Mastercycler gradient iQ5 icycler	Eppendorf Bio-Rad
Pipetten	Eppendorf Research Eppendorf Reference	Eppendorf
Powersupply	Blue Power 500 PAC 300	Serva Bio-Rad
Schüttelinkubator	Innova 4300	New Brunswick Scientific
Spektralfotometer	Nanodrop ND1000	Peqlab
Sterilbank	Aura 2000 M.A.C.	Bioairinstruments

Tischzentrifuge	Biofuge Pico Centrifuge 5412 C	Heraeus Eppendorf
Ultrazentrifuge	ZK 300	Hermle
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage	MXX-2001	Denver Instrument
Wasserbad	GFL 1013 GFL 1083	GFL
Western-Blot-Kammer	DCX-700	CBS Scientific
Zellzähler	Countess	Invitrogen

3.10 Behandlung von Lösungen und Geräten

Lösungen und Geräte wurden soweit nicht anders vermerkt durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 Minuten sterilisiert. Nicht hitzestabile Geräte und Arbeitsflächen wurden mit 70-prozentigem Ethanol desinfiziert. Hitzelabile Lösungen wurden durch 0,2 µm-Filter steril filtriert.

3.11 Arbeiten mit *E. coli*

3.11.1 Anzucht von *E. coli*

E. coli TOP 10 wurde in 5 ml LB-Medium aerob bei 175 Upm oder auf LB-Platten über Nacht bei 37 °C angezogen. Die Flüssigkulturen wurden mit einer Einzelkolonie einer LB-Platte angeimpft. Für die Selektion der Plasmide pL748-pKex-EPO, pENTRY-IBA51 und pESG-IBA3 wurden die Medien auf eine Endkonzentration von 100 µg/ml Ampilicin eingestellt. Für die Selektion des Zwischenvektors pENTRY-IBA51 wurde Kanamycin in einer Konzentration von 50 µg/ml eingesetzt. Zur *lac*-Selektion wurden LB-Platten mit 40 µg/ml X-Gal und dem entsprechenden Antibiotikum eingesetzt.

3.11.2 Konservierung von *E. coli*

LB-Platten und auch Flüssigkulturen können für mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden. Für die längerfristige Konservierung wurden Übernachtskulturen mit 30 % v/v Glycerol versetzt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.11.3 Transformation von *E. coli* mit Plasmiden

Für die Transformation durch Hitzeschock (Sambrook et al., 1989) mit den Plasmiden pESG-

IBA3, pENTRY-IBA51 und pL748-pKex-EPO wurden 50 µl Aliquote chemisch kompetenter *E. coli* TOP10 Zellen verwendet, die auf Eis aufgetaut wurden. Nach dem Auftauen wurden die Zellen mit 0,1–0,5 µg Plasmid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen für 30 bis 45 Sekunden im Heizblock oder Wasserbad bei 42 °C inkubiert. Nach rascher Abkühlung auf Eis wurden die Bakterienzellen in 300 µl LB-Medium aufgenommen und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Danach wurden 50–200 µl des Ansatzes auf LB-Platten mit dem zum Selektionsmarker passenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Rest des Ansatzes kann für mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden und bei Bedarf nochmals ausplattiert werden.

3.12 Arbeiten mit Säugerzellen

Für EPO, das als glykosyliertes Protein im Säuger zudem sialyliert ist, ist eine Säugerzelliene zwingend erforderlich. Für die rekombinante Expression von Proteinen im größeren Maßstab eignen sich besonders CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary), da sie schnell wachsen und robust sind. Die daraus abgeleitete CHO-S-Zelllinie zeichnet sich zudem dadurch aus, dass sie in serumfreien Medien als Suspension gehalten werden kann, wodurch höhere Zelldichten und damit auch höhere Proteinausbeuten erreicht werden können. Sämtliche Arbeiten an Säugerzellen wurden an der Zellkulturwerkbank unter steriler Atmosphäre durchgeführt. Die Inkubation erfolgte im Zellkulturbrutschrank bei 37 °C und unter 5 % CO₂-Spannung. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 1100 rpm für 3 min.

3.12.1 Kultivierung von CHO-S-Zellen

CHO-S-Zellen wuchsen in serumhaltigen Medien wie α -MEM-FCS in unbeschichteten Zellkulturflaschen adhärent als Monolayer und wurden je nach Zelldichte alle 3–4 Tage umgesetzt. Um die leicht adhärenen Zellen abzulösen, wurde das alte Kulturmedium abgesaugt und die Zellkultur mit PBS-EDTA dünn überschichtet. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37 °C konnten die Zellen durch Schütteln der Flasche abgelöst werden. Um den Komplexbildner EDTA zu entfernen, wurden die CHO-S-Zellen abzentrifugiert und das Zellpellet anschließend in PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen 1:5 bis 1:10 in Medium verdünnt und ausplattiert. Für die Expression von EPO wurden die Zellen in dem serumfreien Medium CHO-S-SFII kultiviert, da sich das Serum störend bei der nachfolgenden Anreicherung von EPO auswirkt. In diesem Medium wachsen die CHO-S-Zellen als Suspension, so dass die Schritte zur Ablösung der Zellen und Eliminierung des EDTA nicht notwendig sind.

3.12.2 Konservierung der CHO-S-Zellen

Zur Konservierung aus Sicherheitsgründen wurden in gewissen Zeitabständen die CHO-S-Zellen konserviert. Dazu wurden die gewaschenen und pelletierten Zellen in FCS mit 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) aufgenommen und zu 1 ml in Einfrierröhrchen zur kontrollierten Abkühlung in einem Isopropanolbad bei -80 °C langsam eingefroren. Nach Abkühlung auf -80 °C im Tiefkühlschrank wurden die Zellen für die längerfristige Aufbewahrung entweder in flüssigem Stickstoff oder in einem speziellen Tiefkühlschrank bei -150 °C gelagert. Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie schnell aufgetaut und zur Entfernung des unter physiologischer Temperatur toxischen DMSO in 50 ml Medium aufgenommen und abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in serumhaltiges Medium aufgenommen und für mindestens drei Tage ohne Selektionsdruck rekultiviert. Da CHO-S-Zellen mit Serum adhärent wachsen, können die nach dem Auftauen in größerer Zahl vorhandenen abgestorbenen Zellen bereits nach einem Tag durch Spülen der Zellkulturflaschen mit PBS entfernt werden.

3.12.3 Zellzählung

Die Zellen wurden mithilfe eines automatischen Zellzählers (Invitrogen, Carlsbad, USA) gezählt. Dazu wurden $10\text{ }\mu\text{l}$ der Zellkultur oder in PBS suspendierte Zellen mit $10\text{ }\mu\text{l}$ 0,4 % Trypanblau gemischt und in eine zum Gerät gehörende Einwegzählkammer gegeben. Das Trypanblau färbt tote Zellen blau, während lebende Zellen transparent bleiben, was von der im Zellzähler integrierten Software ausgewertet wird. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors konnte die Lebendzellzahl der Zellkultur bestimmt werden.

3.12.4 Transfektion von Säugerzellen durch Lipofektion

Säugerzellen können durch Transfektion mit Lipidvesikeln dazu gebracht werden Fremd-DNA aufzunehmen und darauf vorhandene Gene transient oder nach Integration in das Genom dauerhaft zu exprimieren. Dabei bildet die DNA mit den kationischen Lipidvesikeln einen Komplex, der von den Zellen durch Endozytose aufgenommen wird. Für die Transfektion der CHO-S-Zellen wurde Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Deutschland) in der Kombination mit Optimem, einem eigens dafür optimierten Medium verwendet. Dabei wurden je ca. 4×10^5 Zellen einen Tag vor der Transfektion in Antibiotika-freiem α -MEM in die Slots (4 cm^2) einer 12er-Kulturschale ausplattiert. Am Tag der Transfektion wurden je Slot $1,6\text{ }\mu\text{g}$ Plasmid-DNA mit $100\text{ }\mu\text{l}$ Optimem vermischt und getrennt davon $4\text{ }\mu\text{l}$ Lipofectamin 2000 mit $100\text{ }\mu\text{l}$ Optimem. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden beide Ansätze vereinigt und das Gemisch für

weitere 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, wobei sich die Lipofectamin-DNA-Komplexe bildeten. 200 µl dieses Ansatzes wurde zu den mit frischem Medium versorgten Zellen gegeben und diese für weitere 24 h bei 37 °C im Inkubator belassen. Danach wurden die Zellen 1:10 oder stärker verdünnt und in Zellkulturschalen von 15 cm Durchmesser ausplattiert. Die Selektion der Klone erfolgte durch 400 µg/ml Hygromyzin im Falle des Plasmids pL748-pKex-EPO und durch 1000 µg/ml im Falle des Plasmids pESG-IBA3-EPO. Antibiotika-resistente potenziell EPO exprimierende Einzelkolonien konnten nach 2 Wochen isoliert werden. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellkolonien durch vaselinierte Glasringe voneinander isoliert. Die Kolonien konnten dann durch auf- und abpipettieren in etwa 100 µl PBS-EDTA aufgenommen werden und wurden zur Weiterkultur unter Selektionsdruck in neue Kulturflaschen mit CHO-S-SF2-Medium überführt, um die Zellen als Suspensionskultur EPO bilden zu lassen. Der Überstand wurde durch Dotblots bzw. Westernblots auf die Expression von EPO überprüft. Von den EPO exprimierenden Zellkulturen wurden, um Reinkulturen zu erhalten, die Zellen in 96-Lochplatten mit α -MEM vereinzelt und unter Selektionsdruck ausgesät. Die erscheinenden Kolonien wurden abermals auf die Bildung von EPO überprüft, so dass nach insgesamt 6 Wochen die besten Kolonien als stabil EPO exprimierende Klone etabliert werden konnten.

3.12.5 Synthese modifizierter Sialinsäurevorläufer für die Zellkultur

ManNAc, der natürliche Vorläufer von Neu5Ac wurde von der Firma NZP (Palmerston, Neuseeland) bezogen. Die Synthese der anderen Derivate erfolgte ausgehend von 10 mM D-Mannosaminhydrochlorid (NZP, Palmerston, Neuseeland) in 30 ml Methanol bei 0 °C. Zu der Lösung wurden 11 mM NaOMe und 11 mM des entsprechenden Karbonsäureanhydrids hinzugefügt und für weitere 2 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Lösung im Vakuum getrocknet. Die resultierenden N-Acylmannosamine wurden über eine Säulenchromatografie mit einem Silica 60 Gelbett (Merck, Darmstadt) aufgereinigt. Als Elutionsmittel wurde ein Gemisch aus Ethyllessigsäureester, Methanol und *Aqua bidest.* verwendet, wobei das Verhältnis der Komponenten in Abhängigkeit der Polarität der Anhydride von 5:2:1 bis 10:2:1 reichte (Keppler et al., 1995). Die N-Acylmannosamine wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.12.6 Supplementierung von CHO-S-Zellen mit artifiziellen Sialinsäurevorläufern

Um die Sialinsäuren (Neuraminsäuren) der Glykane des in CHO-S-Zellen rekombinant exprimierten Erythropoietins zu modifizieren, wurden jeweils die nichtnatürlichen Vorläufer

N-Propanoylmannosamin, N-Pentanoylmannosamin und N-Heptanoylmannosamin zu serumfrei und frisch angesetzten Zellkulturen mit 10^6 Zellen/ml in CHO-S-SF2-Medium gegeben. Diese Aminozucker wurden dazu 0,5 molar in PBS aufgelöst und durch einen 0,2- μ m-Filter steril filtriert, da Zuckerlösungen nicht autoklavierbar sind. N-Heptanoylmannosamin bildet aufgrund seiner Hydrophobizität eine zweiphasige Lösung, die erst durch Erhitzen auf 65 °C einphasig wird. Die Zellkulturen wurden auf eine Endkonzentration von 10 mM eingestellt, mit Ausnahme von N-Heptanoylmannosamin, das aufgrund seiner Toxizität nur in einer Konzentration von 2,5 mM verwendet wurde. Die so behandelten Zellkulturen wurden zur Integration der Präkursoren in die Glykane für weitere 72 h im Inkubator bebrütet.

3.13 Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.13.1 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* durch alkalische Lyse

Plasmide wurden durch alkalische Lyse isoliert (Birnboim and Doly, 1979). Diese beruht darauf, dass in einem pH-Bereich von 12 bis 12,5 das nicht überspiralisiert vorliegende Bakterienchromosom denaturiert wird, während die überspiralisierte Plasmid-DNA stabil bleibt. In diesem pH-Bereich werden in der entspannten genomischen DNA die Wasserstoffbrücken gespalten und die DNA-Doppelhelix entwunden. Durch Zugabe von Säure lagern sich die DNA-Einzelstränge unkontrolliert zu einer unlöslichen Masse, die abzentrifugiert werden kann, zusammen. Auch Proteine und RNA fallen nach der Zelllyse durch eine basische SDS-Lyse und anschließende Neutralisation durch Natriumacetat aus, so dass im Überstand von den Makromolekülen nur noch die Plasmid-DNA verbleibt. Für die Plasmidpräparation wurden 4 ml einer Übernachtskultur mit einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 μ l Lösung A resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen durch Zugabe von 200 μ l Lösung B lysiert. Nach weiteren 5 Minuten wurden genomische DNA und Proteine mit 200 μ l Lösung C versetzt und 15 Minuten auf Eis gefällt. Danach wurden Proteine und genomische DNA in einer Eppendorf-Zentrifuge für 10 Minuten bei 13000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,7 Volumen Isopropanol ausgefällt. Danach wurde das Plasmid in einer gekühlten Tischzentrifuge bei 13000 Upm 10 Minuten abzentrifugiert. Die DNA wurde mit 70-prozentigem Ethanol gewaschen, in einer Vakuum-Zentrifuge oder in einem 50 °C-Wasserbad getrocknet und in 20 bis 50 μ l H₂O aufgenommen.

3.13.2 Chromatographische Aufreinigung von Plasmiden mithilfe des QIAprep Spin Miniprepkits (Quiagen, Hilden)

Dieser Kit basiert auf der alkalischen Lyse nach (Birnboim and Doly, 1979), der sich eine säulenchromatische Aufreinigung der DNA anschließt. Dabei wird die DNA an eine Membran aus Silicagel gebunden und mit einem ethanolhaltigen Waschpuffer, durch den nicht gebundene Verunreinigungen, wie Salze, Nukleotide, Detergenzien und Proteine entfernt werden, ausgewaschen. Anschließend kann die Plasmid-DNA mit sterilem *Aqua bidest.* eluiert werden. Die Präparation erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

3.13.3 Restriktionsverdaus

Bakterien besitzen Restriktionsendonukleasen die fremde in die Zelle eingedrungene DNA, etwa von Phagen an spezifischen, kurzen Restriktionssequenzen von zumeist 4 bis 8 bp Länge erkennen und schneiden (Smith and Wilcox, 1970; Brooks, 1987). Die eigene DNA ist an diesen Stellen durch Methylierungen vor Abbau geschützt. In der Molekularbiologie werden rekombinant exprimierte Restriktionsendonukleasen aus verschiedensten Bakterienarten als Werkzeuge benutzt, um Vektoren und PCR-Produkte für eine Klonierung vorzubereiten. Andererseits kann die Analyse einer Plasmidpräparation durch Herstellung von DNA-Fragmenten spezifischer Länge, die in der anschließenden Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht werden können, stattfinden. Jedes dieser Restriktionsenzyme hat spezifische Reaktionsbedingungen wie Temperatur, Mg^{2+} -Konzentration, Ionenstärke usw. Sind die Reaktionsbedingungen sehr ähnlich, können Doppelverdaus in einem Schritt durchgeführt werden. Ansonsten ist ein sequenzieller Verdaus notwendig. In dieser Arbeit wurden Restriktionsverdaus gemäß Herstellerangaben (Fermentas, St. Leon-Rot) mit den Restriktionsenzymen XBa I und Hind III zur Analyse der Vektoren pIBA-ENTRY51-EPO und pESG-IBA3-EPO durchgeführt. Die Inkubation dauerte zwei Stunden. Die Enzyme wurden anschließend durch Erhitzen auf 65 °C denaturiert, um unspezifische Spaltung der DNA zu verhindern.

3.13.4 Nachweis von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Zum analytischen oder qualitativen Nachweis von DNA-Fragmenten und Plasmiden wurden Agarosegele verwendet (Sambrook et al., 1989). Für die Herstellung der Gele wurde 1 % Agarose in 1 x TAE-Puffer verwendet. Die Agarose wurde durch Aufkochen in 50 ml TAE-Puffer aufgelöst und nach Zusatz von 0,5 µl Ethidiumbromid im Gelschlitten zur Aushärtung

abgekühlt. Als Elektrophoresepuffer diente 1 x TAE. Die zu analysierenden Proben wurden mit 0,1 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt, auf das Agarosegel geladen und bei einer Spannung von 120 V im TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Zum Größenvergleich wurde der Marker GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) benutzt. Das zur Anfärbung verwendete Ethidiumbromid interkaliert durch hydrophobe Wechselwirkung zwischen den Basenpaaren der DNA. Im UV-Licht leuchten diese DNA-Ethidiumbromidkomplexe orange auf. Sollten die Fragmente weiter zur Klonierung verwendet werden, wurden sie mit einem Skalpell ausgeschnitten.

3.13.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu isolierenden DNA-Fragmente wurden ausgeschnitten, und mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Zur Kontrolle der Qualität und Quantität wurde eine Teilmenge auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen.

3.13.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA wurde mit einem Spektrofotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Dabei wurde die Differenz der Extinktion zwischen *Aqua bidest.* und der zu testenden DNA-Lösung gemessen. Eine $OD_{260nm} = 1$ entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Außerdem wurden die Proben auch bei einer Wellenlänge von 280 nm, die dem Absorptionsmaximum von Proteinen entspricht, vermessen. Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} gibt Aufschluss über die Kontamination der DNA-Probe mit Proteinen. Liegt der Quotient unter 1,8, enthält die Probe zu viel Protein.

3.13.7 Plasmidpräparation für Sequenzierungen

Die Sequenzierung von DNA wurde durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt. Dazu wurden 100 ng Plasmid und 15 pmol der Sequenzierprimer in einem Gesamtvolumen von 15 µl in Reaktionsgefäße abgefüllt und zur Analyse an das genannte Institut versendet.

3.13.8 Primerdesign

EPO sollte mit einem C-terminalen StreptagII versehen werden, damit es leichter in größeren Mengen angereichert werden kann, weshalb die cDNA in einen entsprechenden Expressionsvektor umkloniert wurde. Dazu wurde die cDNA aus pL748-pKex-EPO durch eine

PCR amplifiziert, bei der über die Primer zusätzliche Basenpaare am Anfang und Ende der EPO-cDNA eingeführt wurden, die für die folgende Rekombinationsreaktion in den Zwischenvektor pENTRY-IBA51, als Teil des StarGate Kits (IBA, Göttingen), notwendig waren. Die Primer wurden anhand der Sequenz der EPO-cDNA mit dem Programm StarPrimerDSigner des Herstellers erstellt.

3.13.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur Vermehrung von DNA-Abschnitten *in vitro*, die von Saiki, Mullis und deren Mitarbeitern erfunden wurde und heute eine der wichtigsten Techniken der Molekularbiologie darstellt (Saiki et al., 1985; K. Mullis et al., 1986; K. B. Mullis and Faloona, 1987). Bei dieser zyklischen Reaktion werden durch Erhitzen des Reaktionsansatzes die Wasserstoffbrücken der DNA-Doppelhelix aufgebrochen, so dass nach schneller Abkühlung Einzelstränge vorliegen. An diese können sich spezifische zur Zielsequenz passende Oligonukleotide (Primer) anlagern, die der ebenfalls im Reaktionsansatz vorhandenen DNA-Polymerase als Starter dienen. Die DNA-Polymerase benutzt die Einzelstränge als Matrize zur Synthese der jeweiligen Komplementärstränge, die in 5'→3'-Richtung ausgehend von den Primern unter Verwendung von Nukleotidtriphosphaten gebildet werden. Der betreffende DNA-Abschnitt wird somit bei jedem Reaktionszyklus verdoppelt. Als die PCR erfunden wurde, musste noch nach jedem Erhitzen die aus *E. coli* stammende DNA-Polymerase zugesetzt werden. Heute werden DNA-Polymerasen aus hitzeresistenten Organismen wie *Thermophilus aquaticus* (Taq-Polymerase) oder *Pyrococcus furiosus* (Pfu-Polymerase) verwendet, wobei letztere einen DNA-Reparaturmechanismus hat und sich für fehlerfreie Klonierungen besonders eignet. Hier wurde ein rekombinantes, aus der Pfu-Polymerase abgeleitetes Enzym verwendet, welches sich durch eine stark erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit auszeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurde das EPO-Gen aus dem Plasmid pL748-pKex-EPO unter Verwendung der Phusion-Polymerase, einer modifizierten Form der Pfu-Polymerase, amplifiziert. Die Sequenz wurde durch den Einsatz entsprechend verlängerter Primer an beiden Seiten um die Erkennungs- und Rekombinationssequenzen erweitert, die für die Integration in das Plasmid pENTRY-IBA51 notwendig sind. In dieser Arbeit wurde für die PCR ein Fertigmix benutzt, der neben der Phusion-Polymerase bereits Nukleotidtriphosphate und einen für die Reaktion geeigneten Puffer enthält, und der zu dem aus dem Plasmid pL748-pKex-EPO, den Primern und *Aqua bide* bestehenden Ansatz wie folgt hinzugeben wurde:

1 µl DNA-Template, 10–100 ng (pL748-pKEX-EPO)

- 1 μ l Forwardprimer, 10 pmol
- 1 μ l Reverseprimer, 10 pmol
- 22 μ l H₂O
- 25 μ l Phusion High-Fidelity Master Mix F531 (Finnzymes, Vantaa, Finnland)

In einer Gradienten-PCR mit einem Temperaturgradienten von 58 bis 68 °C wurde eine optimale Annealingtemperatur von 63 °C bestimmt. Die PCR wurde mit einem einminütigen Denaturierungsschritt bei 98 °C gestartet, danach folgten 25 Zyklen mit folgenden Temperaturen und Zeiten:

- 5 sek, 98 °C, Denaturierung
- 20 sek, 65 °C, Annealing
- 30 sek, 72 °C, Elongation

Nach dem letzten Zyklus wurde die Temperatur auf 4 °C heruntergefahren. Das Resultat der PCR wurde durch eine Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

3.13.10 Umklonierung der EPO-cDNA-Sequenz aus pL748-pKEX-EPO in den Vektor pESG-IBA3 zur Einführung eines C-terminalen StreptagII

Die Expression von EPO in mit pL748-pKex-EPO CHO-S-Zellen war erfolgreich und konnte durch Westernblotanalyse belegt werden. Für die MALDI-TOF-Analyse der Glykane war jedoch eine Aufreinigung in größeren Mengen, die durch Anreicherung durch Membranfiltration und Immunpräzipitation nicht reproduzierbar erreicht werden konnte, notwendig. Daher wurde auf eine Anreicherung über einen Streptag ausgewichen, was eine Umklonierung der EPO-cDNA in einen Vektor mit einer C-terminalen StreptagII-Sequenz notwendig machte. Hierfür wurde der StarGate Kit (IBA, Göttingen), bei dem ein durch PCR amplifiziertes Gen über eine Rekombinationsreaktion in einen Expressionsvektor kloniert werden kann, verwendet. Der Expressionsvektor enthält neben den notwendigen Promotorelementen auch eine Sequenz für einen Proteintag, wie z. B. StreptagII. Zunächst wird dabei die zu klonierende cDNA an beiden Seiten durch DNA-Sequenzen, welche die für die vom Hersteller StarCombinase1 genannte Rekombinase notwendige Bindungssequenz 5'-AGCGGCTCTTC und 4 bp große Rekombinationsstellen AATG und GGGA enthalten, ergänzt. Dabei enthalten letztere schon das Startcodon ATG bzw. Stoppcodon GGG des einzuführenden Gens. Bei der Rekombination des Zwischenvektors pENTRY-IBA51 mit dem Zielgen wird das in diesem Vektor vorhandene LacZ-Gen, das ebenfalls von der Bindungssequenz flankiert ist, durch die StarCombinase1 über die Rekombinationsstellen gegen das Zielgen ausgetauscht und gleichzeitig die Bindungssequenz der StarCombinase1

eliminiert, wodurch die Reaktion gerichtet, irreversibel und annähernd vollständig zur Bildung des Donorvektors führt (Abb. 8A). Nach Transformation in *E. coli* und Selektion auf Kanamycin/Xgal-Platten enthalten weiße Kolonien den Vektor mit dem Zielgen (hier EPO-cDNA). Die wenigen Kolonien ohne Zielgen färben sich blau, weil die vom LacZ-Gen gebildete β -Galactosidase X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) in Galaktose und einen blauen unlöslichen Indigofarbstoff spaltet. Analog kann das Zielgen von dem so gewonnenen Donorvektor auf den Expressionsvektor (hier pESG-IBA3) in einer zweiten Rekombinationsreaktion mithilfe der StarCombinase2 übertragen werden, wobei auch deren dazugehörige Bindungssequenz eliminiert wird (Abb. 8B). Durch dieses System ist es möglich, das Zielgen aus dem Zwischenvektor in eine Vielzahl von Expressionsvektoren mit unterschiedlicher genetischer Umgebung wie z. B. Promotoren oder Proteintags zu überführen. Die Integration der EPO-cDNA in den Zwischenvektor pENTRY-IBA51 und nachfolgende Übertragung in den Expressionvektor pESG-IBA3, der neben der für ein c-terminales StreptagII codierenden Sequenz, einen CMV-Promotor enthält, erfolgte gemäß Angaben des Herstellers. Die Richtigkeit der Klonierungen wurde anschließend durch Doppelverdau mit Xba I und Hind III, sowie Sequenzierung überprüft.

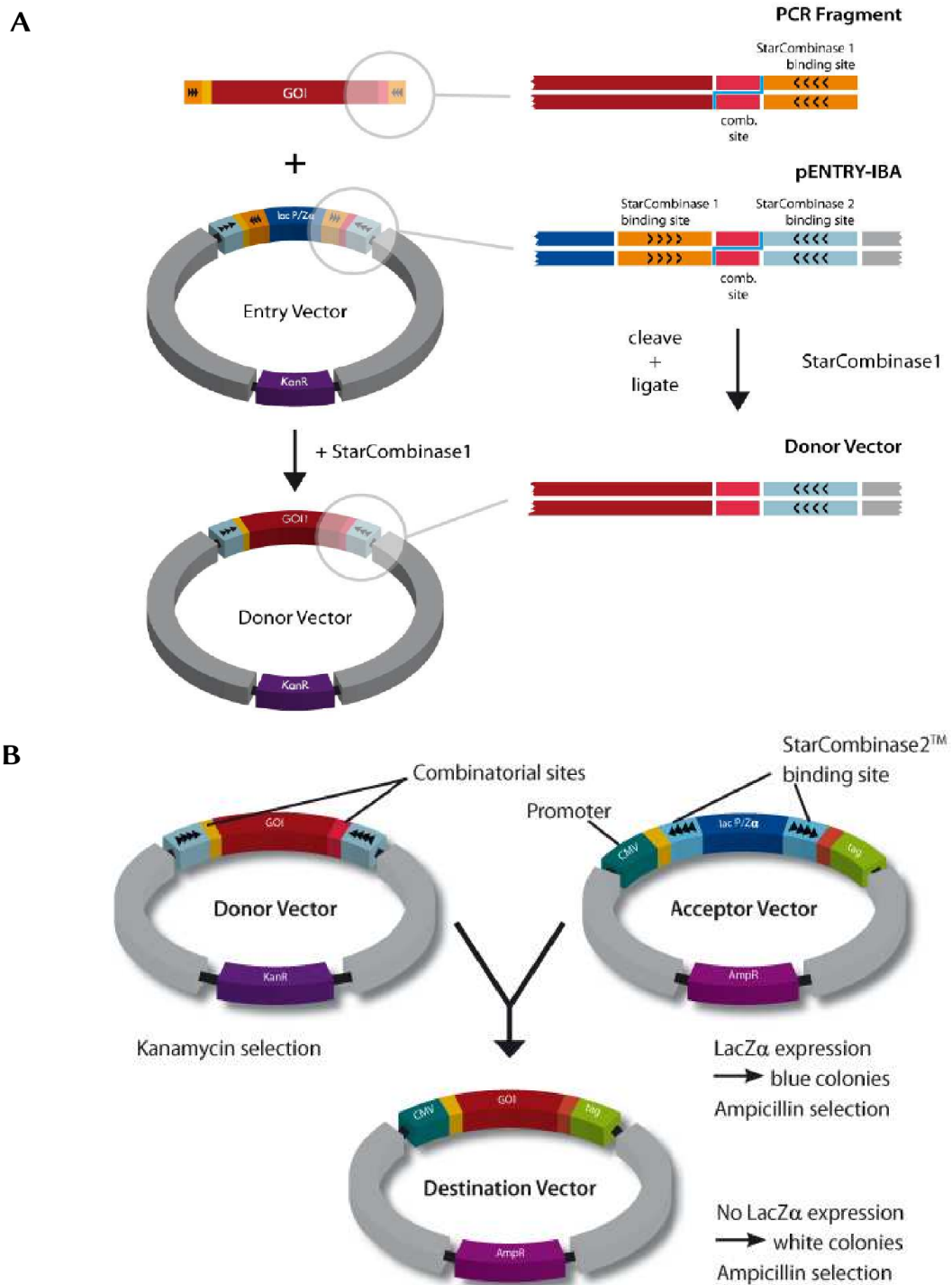


Abbildung 8: Reaktionsschema des StarGate Klonierungskits: A) Herstellung des Donorvektors, B) Herstellung des Zielvektors (Abb. nach StarGate Instruction Manual, IBA GmbH, Göttingen)

3.14 Proteinbiochemische Methoden

3.14.1 Anreicherung von EPO durch Membranfiltration

Zur Anreicherung von EPO wurden 72 h alte Zellkulturen in CHO-S-SF2-Medium verwendet. Die Zellkultur wurde zunächst für 3 min bei 1100 Upm abzentrifugiert, um die Zellen zu beseitigen. Um auch Zelltrümmer abgestorbener Zellen zu entfernen, wurde der Überstand anschließend 10 min bei 5000 Upm abzentrifugiert. Danach wurden jeweils 500 µl des Überstands in 0,5 ml Amicon Ultra 10 kDa Membranfilter (Millipore, Billerica, USA), die für störende Salze, Zucker und Proteine unter 10 kDa durchlässig sind, durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 10000 g bei 4 °C auf 50 µl eingengt. Proben, die für den Sialidaseassay bestimmt waren, wurden aus 4 ml Zellkulturüberstand auf 50 µl eingengt. Für die Säulenchromatografie mit Streptaktin wurden 80 ml Zellkulturüberstand auf 4 ml eingengt.

3.14.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Durch die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Dabei lagert das anionische, denaturierende Detergenz Natriumdodecylsulfat proportional zur Molekülmasse an die denaturierten Proteine, so dass diese nach Molekulargewicht in einer Gelmatrix durch ein anliegendes elektrisches Feld getrennt werden können. Über die eingesetzte Acrylamidkonzentration kann die Porengröße des Gels eingestellt werden. Die Elektrophorese wurde in einer vertikal ausgerichteten Gelapparatur (C.B.S. SCIENTIFIC CO) zwischen zwei durch Abstandhalter auf 0,75 bzw. 1,5 mm getrennten Glasplatten durchgeführt. Die Lösungen für das 10-prozentige Trenngel wurden unmittelbar vor dem Gießen gemischt und das Trenngel bis 3 cm unterhalb der oberen Glasplattenkante gegossen und für die blasenfreie und waagerechte Aushärtung mit Isopropanol überschichtet. Nach der Aushärtung wurde das Isopropanol entfernt und das 4-prozentige Sammelgel gegossen. Die Proteinproben wurden mit 20 % v/v reduzierendem Proteinladepuffer vermischt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Zum Einlaufen der Proben in das Sammelgel wurde eine konstante Spannung von 100 V angelegt, die zur Auftrennung im Trenngel auf 120 V erhöht wurde.

3.14.3 Westernblots

Beim Westernblot (Towbin et al., 1979) werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, auf der sie schließlich mit spezifischen Antikörpern und daran bindenden sekundären Antikörpern, die an

Meerretichperoxidase gekoppelt sind, detektiert werden können. Zum Blotten wurden die Nitrocellulosemembran und 2 gleichgroße Stücke Whatmanpapier im Blottingpuffer benetzt und danach ein Blotstapel mit folgender Anordnung zusammengebaut: Whatmanpapier, Nitrocellulosemembran, SDS-Gel, Whatmanpapier. Dieser Stapel wurde so in einer dazugehörigen Halterung in die Blotapparatur (C.B.S. Scientific Co., San Diego, USA) gehängt, dass die Nitrocellulosemembran der Anode zugewandt war. Für den Transfer der Proteine wurde eine konstante Stromstärke von 330 mA für 70 min angelegt. Zur Vermeidung von Überhitzung wurden zwei auf -20 °C gekühlte Kühlakkus in die dafür vorgesehenen Plätze der Blotapparatur gestellt und die mit einem Rührfisch versehene Apparatur auf einem Magnetrührer gestellt. Nach Ablauf der Zeit wurden die Nitrocellulosemembranen für 1 h in Blockingpuffer zum Blockieren unspezifischer Antikörperbindestellen leicht geschwenkt. Die so behandelten Membranen wurden dann kurz mit TBS-Tween gewaschen und anschließend 1 h in mit TBS-Tween 1:500 verdünntem monoklonalem EPO-Antikörper (Santa Cruz, Sta. Cruz, USA) inkubiert. Der zweite an Meerretichperoxidase gekoppelte Antikörper (Ratte-anti-Maus, Dianova) wurde in TBS-Tween 1:5000 verdünnt für 1 h eingesetzt, nachdem die nichtgebundene EPO-Antikörperfraktion durch dreimaliges Spülen zu je 5 min mit TBS-Tween entfernt wurde. Nach entfernen des überschüssigen sekundären Antikörpers durch TBS-Tween, wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien mit 1 ml einer Luminolhaltigen Lösung (Luminata Forte Western HRP Substrate, Millipore) benetzt und die Fluoreszenz im Imager (Chem Doc XRS System, BioRad) detektiert.

3.14.4 Dotblots

Dotblots wurden durch punktförmiges Auftragen von 30 bis 50 µl Zellkulturüberstand auf Nitrocellulosemembranen durchgeführt. Die Membran wurde dann für einige Minuten an der Luft getrocknet. Im Anschluss wurden die Membranen zur Detektion genauso wie beim Westernblot beschrieben behandelt. Zur Bestimmung der EPO-Konzentration des Überstandes wurde eine Standardreihe mithilfe einer definierten EPO-Lösung in verschiedenen Verdünnungen erstellt. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte durch eine fotometrische Vermessung der Leuchtintensität der Proben, die mit der Leuchtintensität des Standards verglichen wurde. Dazu wurde die zum Imager gehörige Software verwendet.

3.14.5 Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation bindet ein spezifischer Antikörper das Zielprotein, welches dadurch aufgereinigt werden kann. Der Antikörper ist dabei über die Fc-Kette an z. B. Protein

A aus *Staphylococcus aureus* an eine Matrix wie Sepharose gebunden. Für die Säule wurden 200 µl Sepharose A mit 200 µl polyklonalem gegen EPO gerichteten Kaninchenantikörper (200 µg/ml) gemischt und in 600 µl PBS aufgenommen. Dieses Gemisch wurde zur Bindung des Antikörpers für mindestens 2 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der überschüssige Antikörper durch zweimaliges Waschen in PBS und Abzentrifugieren bei maximal 2000 Upm abgetrennt. Die so gewonnene Säule wurde über Nacht mit aus 80 ml auf 4 ml über 10 kDa-Membranfiltern (Milipore, Billerica, USA) aufkonzentriertem Zellkulturüberstand von EPO exprimierenden CHO-S-Zellen bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Säule dreimal mit PBS gewaschen und das Säulenmaterial in Proteinprobenpuffer 5 min aufgeköcht. Das eluierte Material wurde im Westernblot bzw. Coomassiegelelektrophorese analysiert.

3.14.6 Präparation von EPO über eine Streptaktinaffinitätschromatografie

Um EPO in größeren Mengen, wie sie zur massenspektrometrischen Glykananalyse notwendig sind, zu gewinnen, wurde an StreptagII gekoppeltes EPO aus mit dem Vektor pESG-IBA3-EPO transfizierten CHO-S-Zellen verwendet, da sich Versuche zur Aufreinigung von EPO über eine Immunoaffinitätschromatografie als nicht reproduzierbar erwiesen. StreptagII ist ein weitgehend inertes aus 8 Aminosäuren bestehendes Oligopeptid, welches durch das an eine feste Phase gebundene Streptaktin, einem vom Streptavidin abgeleitetem Protein, nichtkovalent gebunden wird. Aufgrund des nur geringen Einflusses von StreptagII auf das gekoppelte Protein eignet sich das StreptagII/Streptaktin-System besonders gut für die Proteinaufreinigung. Für die Streptaktinchromatografie wurde eine Säule mit 0,6 ml Streptaktin-Sepharose (IBA, Göttingen) gefüllt. Diese wurde zunächst mit zwei Volumen des dazugehörigen Waschpuffers W equilibriert. Nachdem der Puffer durchgelaufen war, wurde die Säule mit von 80 ml auf 4 ml eingeeengtem serumfreiem Zellkulturüberstand beladen und nach Waschen mit fünf Volumen Puffer W mit 6 x 0,5 Volumen Puffer E eluiert. Das ca. 1,8 ml messende Eluat wurde weiter mit 0,5 ml Amicon Ultra 10 kDa-Membranfiltern (Milipore, Billerica, USA) auf 100 µl eingeeengt und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Säule konnte durch Spülen mit 5 x 3 Volumen Puffer R für weitere Aufreinigungen regeneriert werden.

3.14.7 Coomassiefärbung

Zur Anfärbung der SDS-Polyacrylamidgele wurde eine kolloidale Coomassielösung verwendet, da diese empfindlicher ist als die übliche Coomassielösung (Candiano et al., 2004). Der zu den Triphenylmethanen gehörende Farbstoff lagert sich an basische Aminosäureseitenketten der Proteine und färbt diese unspezifisch an. Für die Anfärbung der

Gele wurden diese zunächst 3x 10 min in *Aqua bidest.* gewaschen, weil sich das SDS störend auf die Bindung des Farbstoffs auswirkt. Die Färbelösung wurde zur gleichmäßigen Verteilung der kolloidalen Partikel unmittelbar vor Eingießen in die Färbekammer kurz geschüttelt und die Gele ein bis drei Stunden oder über Nacht unter leichtem Schütteln in der Färbelösung belassen. Um die Hintergrundfärbung zu entfernen, wurden die Gele anschließend für ca. 1 h in Entfärbelösung unter leichtem Schütteln entfärbt.

3.14.8 Vorbereitung der Proben für eine MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie ist ein Verfahren, bei dem Moleküle des Analyten in eine Matrix eingebettet werden, welche durch Anregung mit gepulstem Laserlicht einer bestimmten Frequenz plötzlich verdampft und dabei Moleküle des Analyten ionisiert. Diese werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und treffen auf einen Ionendetektor. Dabei können die Flugzeit und die Ladung des Moleküls zur Bestimmung der Molekülmasse herangezogen werden. Die massenspektrometrischen Untersuchungen der Glykane wurden in Rahmen einer Kooperation durch die AG Glykoanalytik an der Charité (Berlin) durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden die mit Coomassie gefärbten EPO-Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) versandt. Die genauere Aufbereitung der Proben und die Analyse mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie sind im gemeinsam verfassten Artikel „Glycoengineering the N-acyl side chain of sialic acid of human erythropoietin affects its resistance to sialidase“ beschrieben (Werner et al., 2012).

3.14.9 Sialidaseassay

Um die Abbauresistenz der mit den modifizierten Neuraminsäuren ausgestatteten Erythropoietine zu untersuchen, wurden sie mit einer Sialidase A behandelt, die α 2-3, α 2-6 und α 2-8 gebundene Sialinsäurereste aus den Glykanen spaltet. Dafür wurden 50 μ l (1 mg/ml EPO) aufkonzentrierter Zellkulturüberstand in 50 μ l 100 mM $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}/\text{CH}_3\text{COOH}$ pH 4,5 aufgenommen und mit 0,5 mU und 1 mU Sialidase für 20 und 60 Minuten bzw. mit 30 mU für 20 und 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch unmittelbare Entsalzung und Überführung der Proben in Rehydrationspuffer für die nachfolgende isoelektrische Fokussierung gestoppt.

Tabelle 10: Behandlungsschema des Sialidaseassays

Supplementierung	Behandlung mit Sialidase A		
Neu5Ac, unsupplementiert	0,5 mU, 20 min 0,5 mU, 60 min	1 mU, 20 min 1 mU, 60 min	
Neu5Prop	0,5 mU, 20 min 0,5 mU, 60 min	1 mU, 20 min 1 mU, 60 min	
Neu5Pent	0,5 mU, 20 min 0,5 mU, 60 min	1 mU, 20 min 1 mU, 60 min	30 mU, 20 min 30 mU, 60 min
Neu5Hept	0,5 mU, 20 min 0,5 mU, 60 min	1 mU, 20 min 1 mU, 60 min	

3.14.10 2D-Gelelektrophorese

Unmittelbar nach der Sialidasebehandlung wurden die Proben in 0,5 ml Amicon Ultra 10 kDa-Membranfiltern (Milipore, Billerica, USA) mit zehn Volumen 0,1 x TBS entsalzt und auf ein Volumen von 50 µl eingengt. Nach Zugabe von 200 µl Rehydrationspuffer zu den Proben wurden damit die IPG-Streifen (7 cm, pH 3–6, Bio-Rad, München) über einen Zeitraum von 12 h in einer Rehydrationskammer eingequollen. Anschließend wurden die Streifen in die isoelektrische Fokussierkammer (Bio-Rad, München) gelegt und unter folgenden Bedingungen fokussiert: 250 V für 15 min, 250 V bis 2000 V für 2 h, 4000 V für 12 h bzw. bis zum Erreichen von 20000 Vh. Die Stromstärke betrug maximal 50 µA je Streifen. Nach der Fokussierung wurden die Streifen zunächst in 10 ml reduzierendem Equilibrierungspuffer I mit DTT für 10 min inkubiert. Dem folgte eine Inkubation für 10 min im iodoacetamidhaltigen Equilibrierungspuffer II, welcher die Reoxidation in der nachfolgenden Polyacrylamidgelelektrophorese verhindert. Für die SDS-PAGE wurden 1,5 mm dicke Abstandhalter, anstatt der üblichen 0,75 mm genommen, um genügend Platz für die IPG-Streifen zu schaffen. Die Streifen wurden zum besseren Kontakt mit dem Sammelgel mit 0,5%iger in Proteinlaufpuffer aufgelöster Agarose überschichtet. Die weitere Behandlung gleicht der einer normalen SDS-PAGE. Sialinsäuren besitzen unter physiologischen Bedingungen eine negative Ladung pro Molekül. Aufgrund der Mikroheterogenität der Glykane in EPO gibt es mehrere Klassen unterschiedlich stark sialylierter EPO-Moleküle mit unterschiedlich großer negativer Ladung bzw. pI, die sich durch eine elektrische Fokussierung auftrennen und sich als diskrete Spots in einem Bereich von pH 4–5,8 in einem der 2D-Gelelektrophorese folgenden Westernblot nachweisen lassen. Werden Sialinsäuren durch Sialidasen abgespalten, verschiebt sich das Muster zugunsten höherer pH-Werte und es verringert sich die Anzahl der Spots.

4 Ergebnisse

Das primäre Ziel dieser Arbeit war die Sialylierung der Glykane von EPO mit neuartigen, nichtnatürlichen Sialinsäuren und die Überprüfung der Resistenz derselben gegenüber Sialidase. Sialinsäuren haben eine herausragende Bedeutung für die Halblebenszeit von EPO, welches in desialylierter Form von den Asialoglykoproteinrezeptoren der Leber schnell aus dem Blutstrom entfernt wird. Neuartige Sialinsäuren könnten den Abbau durch Sialidasen verzögern und somit auch die Bindung an den Asialoglykoproteinrezeptor verhindern.

4.1 Expression von EPO in mit pL748-pKex-EPO transfizierten CHO-S-Zellen

Die für die Expression vorgesehenen CHO-S-Zellen wurden zunächst mit dem Vektor pL748-pKex-EPO transfiziert. In Vorexperimenten stellte sich heraus, dass für eine sichere und schnelle Selektion auf die Expression von EPO 400 µg/ml Hygromyzin notwendig waren. Die EPO-Sekretion wurde durch Westernblots (Abb. 9) verifiziert, welche zur Überprüfung der Stabilität der Expression in regelmäßigen Abständen wiederholt wurden.

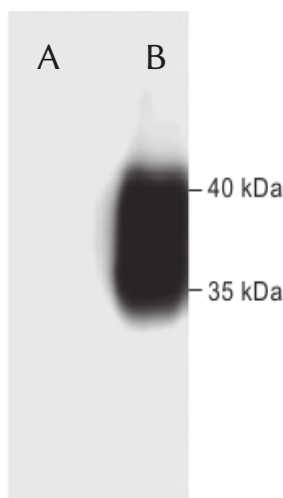


Abbildung 9: Westernblots von Zellkulturüberständen: A) Negativkontrolle B) mit p748-pKex-EPO transfizierte und EPO exprimierende CHO-S-Zelllinie

Um größere Mengen EPO in möglichst reiner Form für die Glykananalysen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie zu gewinnen, wurde versucht, EPO über eine Immunaffinitätschromatografie aufzureinigen. Zur Anreicherung wurden 80 ml Zellkulturüberstand durch Membranfiltration auf 4 ml eingengt. Dabei konnte EPO zwar im Westernblot nachgewiesen werden, aber im entsprechenden Coomassiegel war die zu EPO

gehörende Bande nur schwer zu erkennen bzw. wurde von den Banden des Antikörpers überlagert (Daten nicht gezeigt). Zudem ließen sich die Ergebnisse mit der Coomassiefärbung kaum reproduzieren. Daher stellte sich diese Methode für die Anreicherung von EPO für massenspektrometrische Analysen als ungeeignet heraus.

4.2 Umklonierung der EPO-cDNA in den Vektor pESG-IBA3 zur Fusion an einen StreptagII

Da eine reproduzierbare Anreicherung von EPO in einer Menge und Reinheit, wie sie für eine Analyse mit massenspektrometrischen Methoden notwendig ist, mit der Immunpräzipitation nicht erreicht werden konnte, wurde die EPO-cDNA in den Vektor pESG-IBA3, welcher die Sequenz für einen C-terminalen StreptagII enthält, in einem auf Rekombination basierenden Verfahren umkloniert. Dazu wurde zunächst die cDNA über eine PCR amplifiziert, wobei über die Primer Sequenzen für den Rekombinationsprozess und Erkennungssequenzen für die Rekombinase des kommerziellen Stargate Kits (IBA, Göttingen) beidseitig der EPO-cDNA eingeführt wurden. Die Annealingtemperatur durch eine Gradienten-PCR im Temperaturbereich von 58 bis 68 °C bestimmt, wobei sich eine Temperatur von 63 °C als optimal herausstellte (Abb. 10A). Das 606 bp große Amplifikat wurde anschließend, wie vom Hersteller beschrieben, in den Zwischenvektor pENTRY-IBA51 kloniert, danach durch Rekombination in den Zielvektor pESG-IBA3 überführt und in *E. coli* TOP10 vermehrt. Die Existenz der EPO-cDNA in den resultierenden Vektoren pENTRY-IBA51-EPO und pESG-IBA3-EPO wurde durch Restriktionsverdau mit Xba I und Hind III in 5 willkürlich ausgewählten Klonen nachgewiesen (Abb. 10B, C), wobei ein 622 bp bzw. 646 bp großes Fragment entsteht, welches die EPO-cDNA enthält. Vor der Transfektion in die CHO-S-Zellen wurden diese Fragmente sequenziert. Dabei konnte die Richtigkeit der integrierten cDNA-Sequenz in allen Fällen nachgewiesen werden.

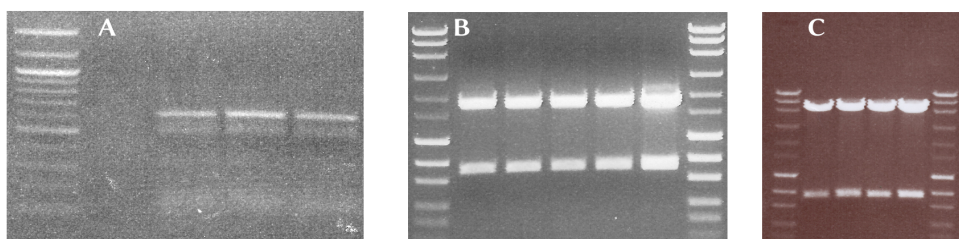


Abbildung 10: PCR-Fragmente: 1. Bahn Negativkontrolle, 2.-4. Bahn PCR-Amplifikate bei 58 °C, 63 °C und 68 °C Annealingtemperatur, B) Restriktionsverdau pENTRY-IBA51-EPO, C) Restriktionsverdau pESG-IBA3-EPO

4.3 Wachstum der mit neuartigen Sialinsäurevorläufern supplementierten CHO-S-Zellen

Die mit 10 mM sterilfiltriertem ManNProp und ManNPent versetzten CHO-S-Zellen zeigten im Vergleich zu unsupplementierten und mit 10 mM ManNAc supplementierten Kontrollen keine Wachstumsverzögerungen. Im Gegensatz dazu starben Zellen die mit 10 mM ManNHept behandelt wurden ab. Nur bei Absenkung der Konzentration auf 2,5 mM waren die Zellen in der Lage mit ManHept zu wachsen.

4.4 Affinitätschromatografie von EPO-StreptagII über eine Streptaktinsäule

Aufgrund der nicht reproduzierbaren Ergebnisse der Immunpräzipitation wurde zu einer affinitätschromatischen Aufreinigung mit einer Streptaktinsäule übergegangen. Dazu wurde an die Sequenz der cDNA von EPO die codierende Sequenz des StreptagII fusioniert, was durch die Umklonierung in den Vektor pESG-IBA3 erfolgte. Nach Transfektion in CHO-S-Zellen konnte das resultierende EPO-StreptagII exprimiert und anschließend über eine Streptaktinsäule in einer Menge aufgereinigt werden, die sich auch im Coomassiegel (Abb. 11) nachweisen ließ und somit für eine weitere Analyse in einer MALDI-TOF-Massenspektrometrie geeignet war.

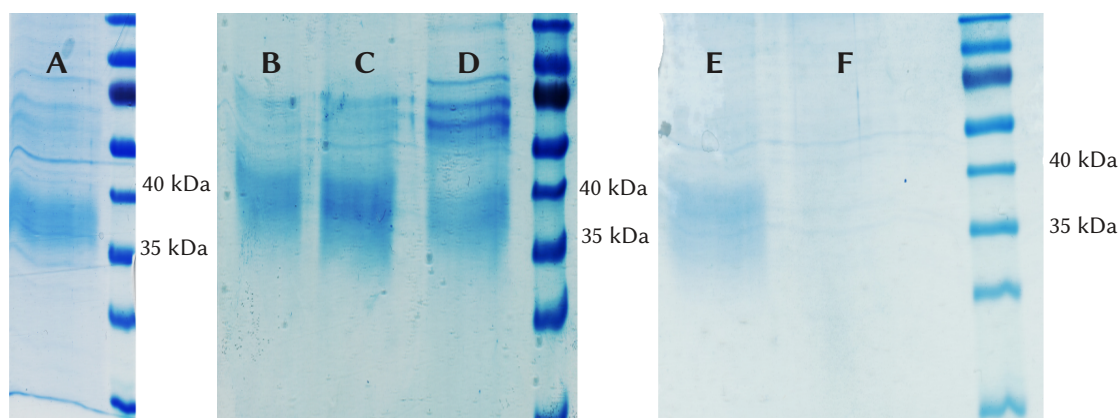


Abbildung 11: Coomassiegele von EPO-StreptagII: A) ohne Mannosaminzusatz, bzw. Zusatz von B) ManNAc, C) ManNProp, D) ManNPent, E) ManNHept und F) Negativkontrolle nicht transfizierter CHO-S-Zellen. EPO-StreptagII befindet sich in einem Bereich von 35-40 kDa.

Die zu EPO-StreptagII gehörenden Coomassiebanden ließen sich einwandfrei in der Westernblot-Kontrolle zuordnen (Abb. 12). Die mit Coomassie gefärbten EPO-StreptagII Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, und wie im Abschnitt „Material und Methoden beschrieben“, für die MALDI-TOF-Massenspektrometrie vorbereitet.

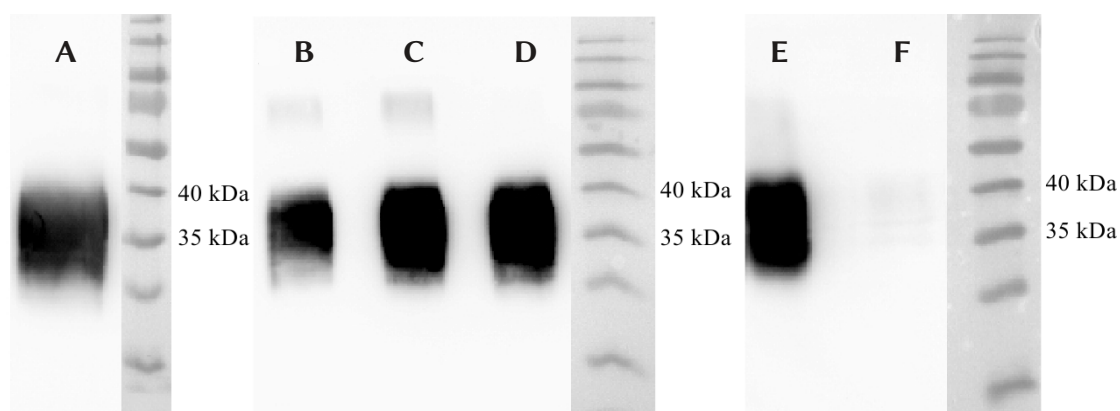


Abbildung 12: Westernblots von EPO-StreptagII: A) Ohne Mannosaminzusatz, Zusatz von B) ManNAc, C) ManNProp, D) ManNPent, E) ManNHept und F) Negativkontrolle vom Überstand nicht transfizierter CHO-S-Zellen.

4.5 Anteil neuartiger Sialinsäuren in EPO-StreptagII

Die Glykane von EPO-StreptagII aus mit den Sialinsäurevorläufern ManNAc, ManNProp, ManNPent und ManNHept. supplementierten Zellkulturen als auch aus nicht supplementierten Kontrollen wurden mithilfe einer MALDI-TOF-Massenspektrometrie auf die Integration der aus den Vorläufern abgeleiteten Sialinsäuren Neu5Ac, Neu5Prop, Neu5Pent und Neu5Hept untersucht. Im Spektrum der mit ManNProp supplementierten Zellkultur ist die natürliche Sialinsäure Neu5Ac nicht vorhanden. Der zu einem monosialylierten und monofukosylierten, tetraantennären N-Glycan gehörende Hauptpeak m/z 3517,8 zeigt eine Verschiebung von 14 Da in Richtung höherer Masse im Vergleich zum entsprechenden Peak des monosialylierten, monofukosylierten, tetraantennären Glykans aus der ManNAc-Kontrolle, was dem Molekulargewicht der zusätzlichen CH_2 -Einheit der Propanoylgruppe am C5-Atom der Neu5Prop im Vergleich zur N-Acetylgruppe der Neu5Ac zuzuschreiben ist (Abb. 13A). Der zu dem entsprechenden Glykan gehörende Peak zeigt wie erwartet eine um 42 Da erhöhte Masse, wenn das EPO-StreptagII aus einer mit ManNPent supplementierten Zellkultur stammt, da die Pentanoylgruppe gegenüber der Acetylgruppe der nativen Sialinsäure um eine C_3H_6 -Einheit länger ist (Abb. 13B). Auch bei den kleineren Peaks ist die Zunahme um die Masse einer bzw. dreier Methylengruppen zu erkennen. Der Sialyierungsgrad der Glykane aus den supplementierten Zellkulturen ist vergleichbar mit dem von unbehandelten Zellkulturen. Die Glykane der mit ManNHept versetzten Zellkulturen zeigen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keine Erhöhung der Molekülmasse, d. h., es wurde nur die natürlich vorkommende Sialinsäure Neu5Ac in die Glykane integriert. Die massenspektrometrischen Daten sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

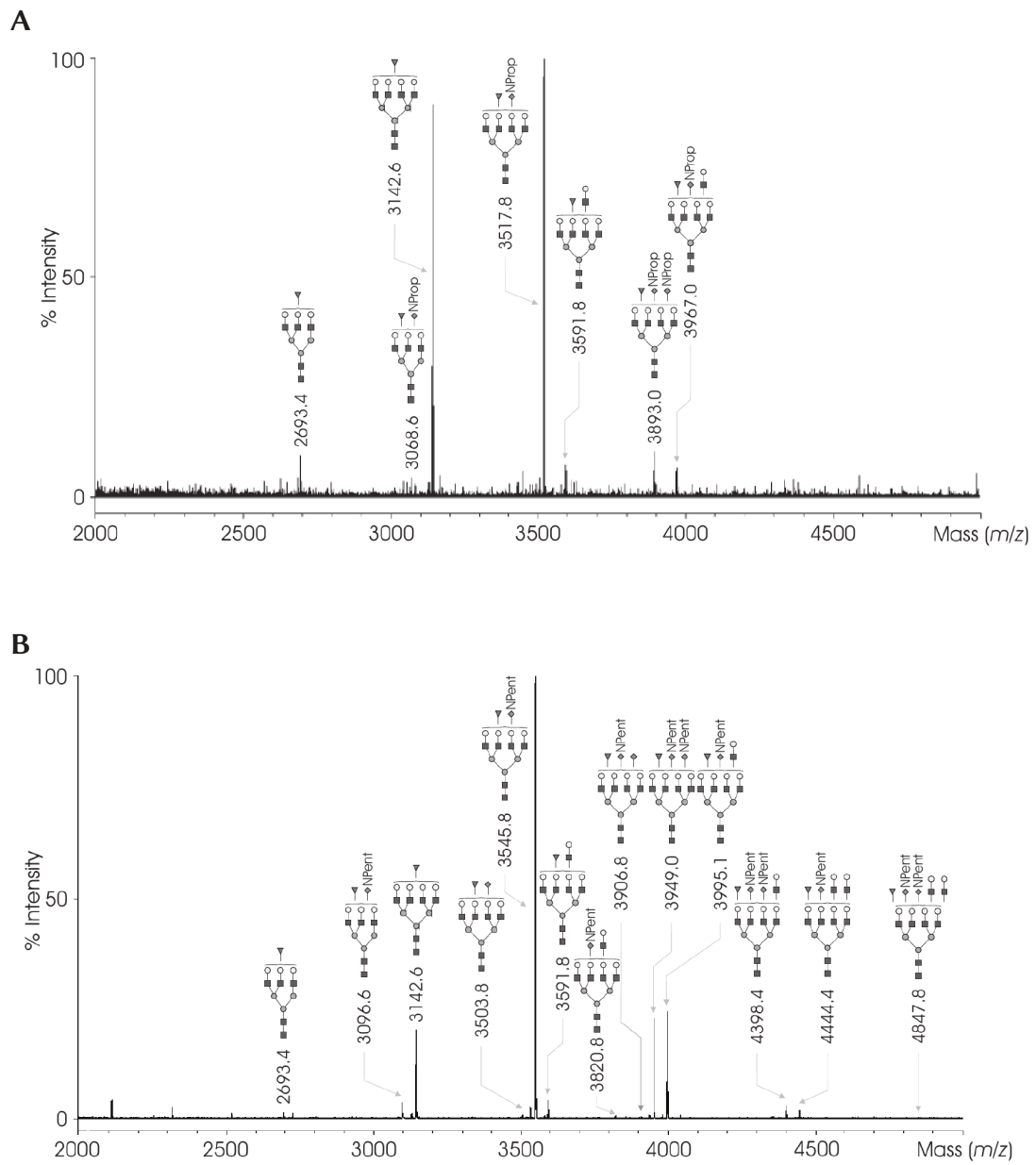


Tabelle 11: Relative Intensitäten (RI) permethylierter N-Glykane von EPO aus CHO-S-Zellkulturen, die mit ManNProp oder ManNPent supplementiert wurden.

m/z	Zusammensetzung	RI
ManNProp		
2693,4	dHex1Hex6HexNAc5	5,8
3068,6	dHex1Hex6HexNAc5Neu5A1	2,6
3142,6	dHex1Hex7HexNAc6	41,8
3517,8	dHex1Hex7HexNAc6Neu5A1	41,0
3591,8	dHex1Hex8HexNAc7	2,7
3893,0	dHex1Hex7HexNAc6Neu5A2	3,8
3967,0	dHex1Hex8HexNAc7Neu5A1	2,2
ManNPent		
2693,4	dHex1Hex6HexNAc5	1,2
3096,6	dHex1Hex6HexNAc5Neu5B1	2,5
3142,6	dHex1Hex7HexNAc6	13,4
3503,8	dHex1Hex7HexNAc6Neu5B1	0,3
3545,8	dHex1Hex7HexNAc6Neu5B1	57,6
3591,8	dHex1Hex8HexNAc7	2,3
3820,8	Hex8HexNAc7Neu5B1	0,1
3906,8	dHex1Hex7HexNAc6Neu5Ac1Neu5B1	0,2
3949,0	Hex8HexNAc7Neu5B2	10,1
3995,1	dHex1Hex8HexNAc7Neu5B1	10,3
4398,4	dHex1Hex8HexNAc7Neu5B2	1,1
4444,4	dHex1Hex9HexNAc8Neu5B1	0,7
4847,8	dHex1Hex9HexNAc8Neu5B2	0,1

4.6 Sialidaseresistenz von EPO aus mit ManNProp und ManNPent behandelten Zellkulturen

Die über Membranfiltration auf 1 mg/ml angereicherten EPO-Fractionen aus unbehandelten bzw. mit ManNAc, ManNProp, ManNPent und ManNHept versetzten CHO-S-Zellkulturen wurden mit Sialidase A in unterschiedlichen Konzentrationen und Einwirkzeiten behandelt und anschließend zur Analyse der Sialinsäureabspaltung einer 2D-Gelelektrophorese unterzogen. Als Vergleich dienten 2D-Gelelektrophoresen derselben Proben, die nicht mit Sialidase behandelt wurden. In ihnen konnte unabhängig vom verwendeten Sialinsäurevorläufer ein typisches Muster von diskreten Spots in einem pH-Bereich von 4-5,8 nachgewiesen werden (Abb. 14).

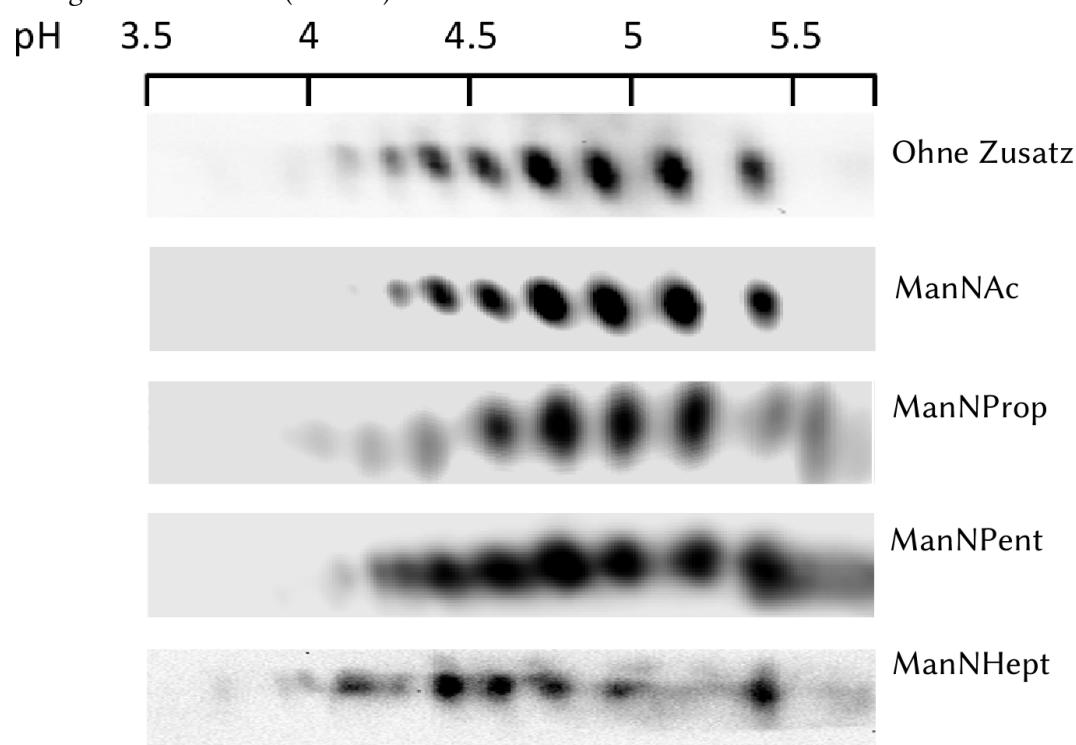


Abbildung 14: Isoelektrische Fokussierung von EPO aus Zellkulturüberständen mit unterschiedlichen Mannosaminanaloga: Aufgrund der Mikroheterogenität bezüglich der Sialinsäuren hat EPO mehrere pI im Bereich von pH 4-5,8.

Dabei entspricht jeder Spot einer Molekülklasse mit einer gleichgroßen Anzahl an Sialinsäureresten. In den mit Sialidase behandelten Proben lässt sich eine Verschiebung der Spots in Richtung pH 5,8 feststellen, da durch die Abspaltung von Sialinsäuren sich die Anzahl der negativen Ladungen reduziert und im Extremfall bei Abspaltung aller Sialinsäuren nur noch sialinsäurefreies EPO übrig bleibt, welches einen pI von etwa 5,8 hat. Diese vollständige Abspaltung wird bei EPO aus nicht supplementierten Zellkulturen und mit Neu5Ac

supplementierten Zellkulturen bei einer Sialidaseaktivität von 0,5 mU nach 20 Minuten erreicht (Abb. 15A). Bei Verwendung von ManNProp lassen sich unter diesen Bedingungen noch mehrere Spots im Bereich von pH 4,8-5,8 feststellen, was einer partiellen Desialylierung entspricht. Erst bei einer Sialidaseaktivität von 1 mU und einer Dauer von 60 Minuten ist die Probe vollständig desialyliert. EPO aus Kulturen, die mit ManNPent supplementiert wurden, zeigen selbst bei einer Behandlung mit 30m U Sialidase für 60 Minuten kaum eine Desialylierung d. h. es sind mehrere Spots im Bereich von pH 4–5,8 erkennbar, vergleichbar mit der dazugehörigen Kontrolle ohne Sialidase (Abb. 15B).

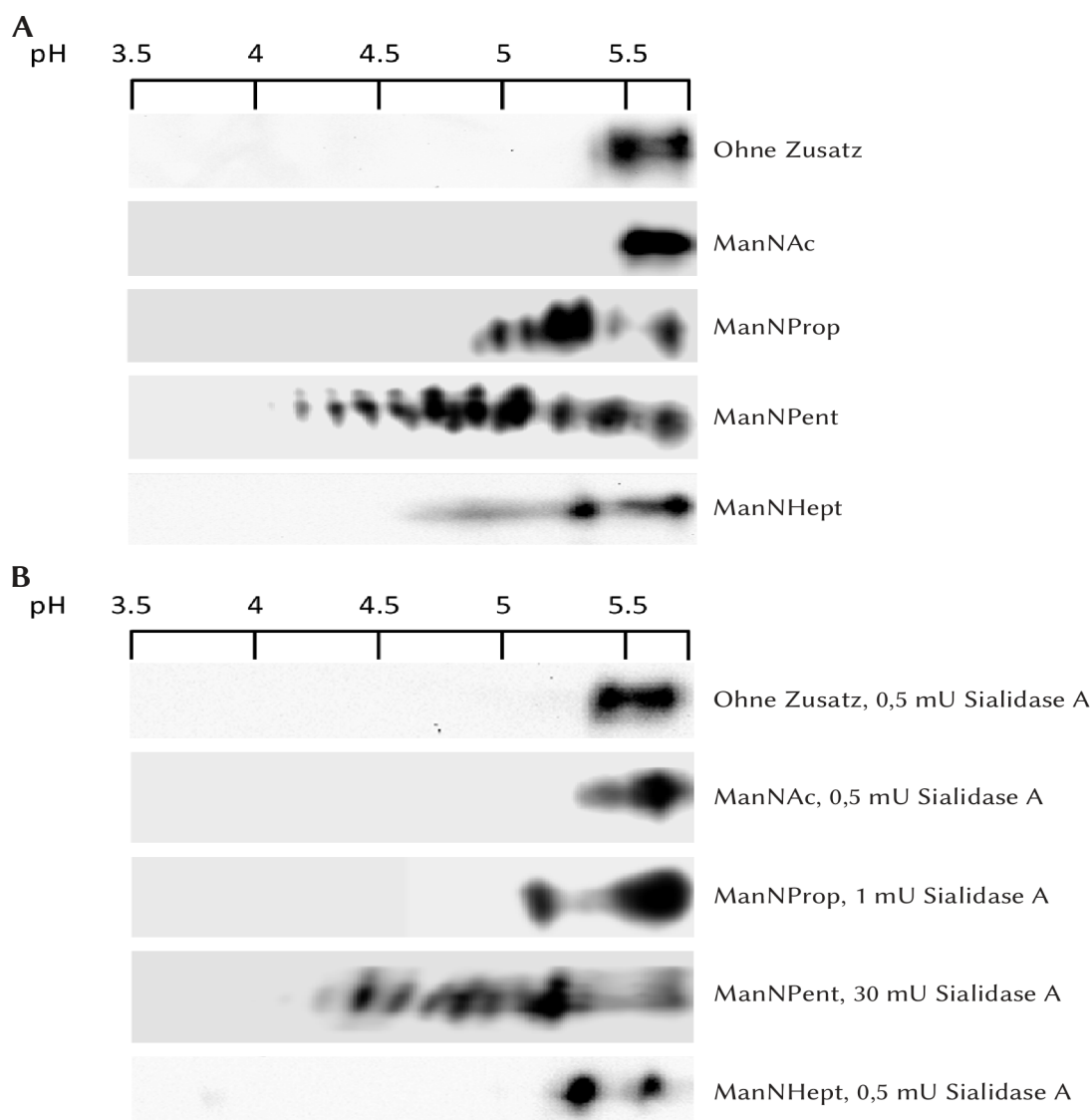


Abbildung 15: Isoelektrische Fokussierung von EPO-Proben nach A) 20-minütiger Sialidasebehandlung mit 0,5 mU Sialidase bzw. B) nach 60-minütiger Sialidasebehandlung mit den angegebenen Aktivitäten

5 Diskussion

Kohlenhydrate bilden den größten Anteil der auf der Erde vorkommenden, lebenden Biomasse. Sie haben neben der Rolle als Gerüst-, Reserve- und Nahrungsstoffe vielfältige Funktionen und sind Bestandteil sowohl von Nukleinsäuren als auch von Glykoproteinen und Glykolipiden, welche Gegenstand der Glykomik sind, die sich als eigenständige Richtung in jüngerer Zeit neben der Genomik und Proteomik zur Untersuchung von molekularen Zusammenhängen in lebenden Systemen etabliert hat. Die Glykokonjugate sind von entscheidender Bedeutung für die Zellbiologie und sind an Prozessen wie Zell-Zell-Erkennung, Differenzierung, Entwicklung aber auch an Wirt-Parasit-Interaktionen beteiligt. Die Variabilität des Proteoms wird durch die Glykosylierung erheblich erhöht. Glykoproteine und Glykolipide finden sich in Zellmembranen. Der Großteil von eukariotisch sezernierten Proteinen ist ebenfalls glykosyliert. In den Glykanen von Säugerzellen sind die Sialinsäuren, welche aufgrund ihrer endständigen Position und ihrer negativen Ladung für molekulare Interaktionen prädestiniert sind, eine essenzielle Komponente. Sialinsäuren sind auch für die Stabilität und Halblebenszeit vieler Glykoproteine verantwortlich. Die Veränderung der natürlichen Sialylierung durch artifizielle N-Acylmannosamine war Gegenstand dieser Arbeit. Von Interesse war dabei die Veränderung der Resistenz derart veränderter Glykane gegenüber Sialidase, die hier an EPO, einem der bedeutendsten therapeutischen Glykoproteine, durchgeführt und demonstriert wurde. Sialidasen bewirken die Desialylierung von Glykanen, die dann vom Asialoglykoproteinrezeptor erkannt und abgebaut werden. Ausgehend von dem Wissen über den Asialoglykoproteinrezeptor würde eine erhöhte Resistenz gegenüber Sialidase zu einer längeren Halbwertszeit von Glykoproteinen wie EPO im Blutkreislauf führen. Die Modifikation der Sialylierung der Glykane durch nicht-natürliche N-Acylmannosamine, die letztlich zu einer verlängerten Verweildauer von EPO in der Blutbahn führt, wäre von großem Wert für die Lebensqualität der damit behandelten Patienten. Behandlungsdosen und -häufigkeit ließen sich reduzieren, was zudem die Verringerung von Nebenwirkungen und Behandlungskosten zur Folge hätte. Weiterhin könnte eine erhöhte Sialylierung der Glykane durch die Umgehung der Feedbackhemmung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase, die Stabilität des Proteins erhöhen.

5.1 Reaktion der Zellkulturen auf die zugesetzten N-Acylmannosamine

CHO-S-Zellen wurden in Zellkultur mit verschiedenen Mannosaminanaloga versetzt, die sich von der natürlichen Sialinsäurevorstufe N-Acetylmannosamin durch die Länge der

Acylseitenkette unterscheiden. CHO-S-Zellen, deren Medium mit 10 mM ManHept versetzt wurde, stagnierten im Wachstum und starben schließlich ab, wohingegen sich die mit ManNProp und ManNPent versetzten Zellkulturen, wie unbehandelte oder mit ManNac versetzte Kulturen verhielten. Erst bei Konzentrationen unter 2,5 mM sind die Zellen in der Lage zu wachsen. ManNHept ist im Vergleich zu ManNac, ManNProp und ManNPent stark hydrophob und bildet bei höheren Konzentrationen in Wasser ein Gemisch aus einer wasserreichen Phase mit wenig ManNHept und einer wasserarmen Phase mit hoher ManNHept-Konzentration. Daher ist anzunehmen, dass ManHept möglicherweise aufgrund der hydrophoben Heptanoylseitenkette membranschädigend wirkt.

5.2 Nachweis neuartiger Sialinsäuren in mit N-Acylmannosaminen behandelten Zellkulturen

5.2.1 Gesamtsialylierungsgrad der Glykane von EPO-StreptagII

Die Sialylierung des EPOs aus mit den Sialinsäurevorläufern versorgten Zellkulturen erreicht nicht die maximal mögliche Sialylierung d. h. keines der Glykane weist eine vollständige Sialylierung auf und es gibt auch einzelne nicht sialylierten Glykane. Die Gesamtsialylierung entspricht derjenigen, welche für EPO aus nichtsupplementierten CHO-Zellen beschrieben wurde (Rice et al., 1992; Hokke et al., 1995). Anhand der 2D-Gelelektrophorese lässt sich die Glykanstruktur und der Grad der Sialylierung nicht genau beschreiben. Zieht man die Ergebnisse der MALDI-TOF-Massenspektrometrie in Betracht, kann davon ausgegangen werden, dass die theoretisch mögliche komplette Sialylierung nicht erreicht wird, denn in den Spektren der MALDI-TOF-Massenspektrometrie lassen sich neben tetraantennären auch triantennäre Glykane erkennen. Sowohl die tetraantennären als auch die triantennären Strukturen sind nie vollständig sialyliert. Die heterogene Sialylierung der Glykane führt aufgrund der negativen Ladungen der Sialinsäuren zu entsprechend bezüglich der pI unterscheidbaren Klassen von EPO, die sich in der isoelektrischen Fokussierung als diskrete Spots darstellen lassen. Die Verteilung der Spots zeigt dabei keine Unterschiede bezüglich der verwendeten Mannosaminderivate (Abb. 14). Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Sialylierungsgrad vergleichbar ist und keinen Einfluss auf den Verlauf der Experimente mit Sialidase A hat.

5.2.2 N-Propanoylneuraminsäure und N-Pentanoylneuraminsäure

Der Einbau und die Verstoffwechslung der Mannosaminderivate zu den dazugehörigen Sialinsäuren wurden durch eine MALDI-TOF-Massenspektrometrie überprüft. N-

Propanoylneuraminsäure und N-Pentanoylneuraminsäure konnten dabei erfolgreich in den Glykanen von EPO-StreptagII nachgewiesen werden, nachdem EPO-StreptagII exprimierende CHO-S-Zellkulturen mit den entsprechenden Vorläufern ManNProp und ManNPent supplementiert wurden. Daraus kann man ableiten, dass sich diese Methode des „Glykoengineering“, also das Ersetzen der natürlichen N-Acetylneuraminsäure durch unnatürliche N-Acylneuraminsäuren über die Supplementierung mit Mannosaminen, welche andere Acylgruppen als die Acetylgruppe enthalten, auf zahlreiche Säugerzelllinien übertragen lässt. N-Acetylneuraminsäure wurde im Fall der Supplementierung mit ManNProp vollständig von der sich daraus ableitenden N-Propanoyle Säure ersetzt. Bei der Verwendung von ManNPent als Präkursor ließ sich jedoch ein vereinzelter Einbau von N-Acetylneuraminsäure im Spektrum nachweisen. Damit sind die Einbauraten dieser beiden unphysiologischen Vorläufermoleküle im Vergleich zu Untersuchungen anderer Autoren vergleichbar, die maximale Einbauraten von ca. 85–92 % (Collins et al., 2000; Keppler et al., 2001; Gröbe, 2008) beschrieben. Die etwas geringere Einbaurate von ManNPent im Vergleich zu ManNProp lässt sich mit der längeren Acylgruppe erklären und entspricht den Resultaten anderer Veröffentlichungen (Jacobs et al., 2001; Keppler et al., 2001).

5.2.3 N-Heptanoylneuraminsäure

Die mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysierten Glykane von EPO aus den mit 2,5 mM ManNHept versetzten Zellkulturen zeigten keine Integration von Neu5Hept und verhielten sich auch im Sialidaseassay wie die unbehandelte Kontrolle. Sterische Inkompatibilität der im Vergleich zu ManNProp und ManNPent längeren, lipophileren Heptanoylkette zu den Enzymen der Sialinsäuresynthese könnte der Grund für die fehlende Umwandlung in Neu5Hept sein. Dies stimmt mit Ergebnissen von Jacobs *et al.* überein, die eine Limitierung der Integration von N-Acylmannosaminen feststellten, wenn deren Acylgruppe mehr als 5 C-Atome aufweist, welche sie auf eine verringerte ManNAc-6-kinase-Affinität der GNE zu den N-Acylmannosaminen mit längeren Acylgruppen zurückführten (Jacobs et al., 2001). Dabei scheint die Phosphorylierung der Mannosaminderivate mit längerer Acylseitenkette durch die MannAc-6-kinase-Einheit der GNE gehemmt zu sein, welche zum Teil durch die GlcNAc-Kinase übernommen wird (Hinderlich et al. 2005). Auch die Affinität der Sialyltransferasen zu Mannosaminanaloge mit längerer Acylseitenkette dürfte geringer sein (Horstkorte et al., 2004; Horstkorte et al., 2004; Bork et al., 2007). Zudem dürfte die Verdrängung von ManNHept durch das mit ihm in Konkurrenz stehende ManNAc schon allein aufgrund der im Vergleich zu ManNPent und ManNProp viel niedrigeren

Einsatzkonzentration größer sein. Höhere Konzentrationen konnten hier, bedingt durch die toxische Wirkung von ManNHept nicht ausgetestet werden. Hier könnte durch die Verwendung von peracetyliertem ManNHept versucht werden, die Aufnahme in die Zellen zu verbessern, da durch die Peracetylierung der bipolare Charakter des Moleküls überwunden werden kann. Peracetylierte Sialinsäurevorläufer können aufgrund ihres hydrophoben Charakters besser die Zellmembran passieren und somit in wesentlich geringerer Konzentration eingesetzt werden (Sarkar et al., 1995; Collins et al., 2000).

5.3 Resistenz der neuartigen Sialinsäuren gegenüber Sialidase und deren Bedeutung für therapeutische Glykoproteine

EPO besitzt ein O-Glykan und drei N-Glykane, die aufgrund der Mikroheterogenität nicht nur unterschiedliche Antennaritäten haben, sondern auch unterschiedlich stark sialyliert sein können, d. h. es gibt nicht sialylierte, mono-, di-, tri- und tetrasialylierte Glykane. Dadurch finden sich in einer EPO-Probe nach Anzahl der Sialylierungen unterscheidbare Molekülpopulationen, die sich durch isoelektrische Fokussierung voneinander trennen lassen, da jede am Molekül gebundene Sialinsäure eine zusätzliche negative Ladung mit ins Molekül bringt und somit zu einer Verschiebung des pI führt. Das hat zur Folge dass Glykoproteine wie EPO mehrere diskrete pI haben, welche in einer 2D-Gelelektrophorese mit anschließendem Westernblot als ein charakteristisches Bandenmuster sichtbar gemacht werden können. Es konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den pI von EPO aus nicht supplementierten und mit Mannosaminanaloga supplementierten Zellkulturen gefunden werden, welche im Bereich von pH 4–5,8 liegen. Die Sialylierungsgrad der Glykane ist somit variabel und entspricht den in der MALDI-TOF-Massenspektrometrie gefundenen Ergebnissen. Bei der Behandlung mit Sialidase A wurde die Verringerung der Anzahl und die Verschiebung der pI in Richtung höherer pH-Werte, was einer zunehmenden Desialylierung entspricht, verglichen. Hier entspricht ein einzelner Spot bei pH 5,8 der vollständig desialylierten EPO-Population. Obwohl die Glykane von EPO nicht vollständig sialyliert sind, führten die beiden Mannosaminderivate ManNProp und ManNPent zu einer deutlichen Verzögerung der Abspaltung der daraus resultierenden Sialinsäuren Neu5Prop und Neu5Pent durch die Sialidase. Dabei bewirkte das Analogon ManNProp im Vergleich zur unbehandelten bzw. mit ManNAc behandelten Kontrolle eine nur geringfügige Erhöhung der Resistenz, während das Analogon ManNPent eine sehr große Erhöhung der Resistenz zur Folge hatte. Da es sich um eine qualitative Methode handelt, lässt sich das genaue Maß der Resistenz nicht feststellen. Proben aus nicht supplementierten oder mit ManNAc behandelten Zellkulturen waren schon nach 20 min Einwirkzeit bei einer Sialidaseaktivität von 0,5 mU vollständig

desialyliert. Mit ManNProp supplementierte Proben benötigten 1 mU Sialidaseaktivität und 60 Minuten bis zur Desialylierung während mit ManNPent versetzte Proben selbst bei einer Aktivität von 30 mU nach einer Stunde noch mehrere Spots aufwiesen. ManNPent bewirkte trotz der etwas geringeren Einbaurate eine fast vollständige Resistenz gegenüber der verwendeten Sialidase A. Die Verlängerung der Acylgruppe dürfte hierbei der entscheidende Faktor für die höhere Resistenz gegenüber der Sialidase sein. Das deckt sich mit Ergebnissen von Lieke et al., die eine mit der Acylseitenkettenlänge zunehmende Hemmung der Desialylierung von membrangebundenen Glykanen durch die bakterielle Sialidase C fanden. Sie fanden weiterhin eine erhöhte Resistenz von 86-HG-39-Zellen gegen die Invasion des Erregers der Chagaskrankheit, *Trypanosoma cruzi*, wenn deren Oberflächenglykane mit Neu5Prop, Neu5But oder Neu5Pent sialyliert waren, und führen dies auf die Hemmung der Transsialidase des Erregers zurück, die für dessen Infektionsfähigkeit eine wichtige Rolle spielt (Lieke et al., 2011). Obwohl die Transsialidasen von *Trypanosoma* und bakterielle Sialidasen eine unterschiedliche Funktion haben, sind deren katalytische Zentren konserviert und weisen eine hohe Ähnlichkeit auf (Buschiazzo et al., 2000; Lieke et al., 2011). Durch die veränderte Acylgruppe könnten die Sialinsäurederivate von der katalytischen Domäne suboptimal gebunden werden, wodurch die Affinität der Kohlenhydrat bindenden Domäne verringert wird. Dies legen auch Studien anderer Autoren nahe, welche sich mit der Modellierung von Sialinsäure-bindenden Strukturen, wie dem Hämagglutinin von Influenzaviren (Keppler et al., 1998) und dem murinen Polyomavirus (Herrmann et al., 1997) befassen. Die hier dargestellten Ergebnisse sind sowohl für die Produktion als auch für die Verwendung von therapeutischen Glykoproteinen wie EPO von Bedeutung. Einerseits kann durch die Erhöhung der Sialidaseresistenz durch ManNPent bzw. in geringerem Umfang auch durch ManNProp die Zirkulationsdauer im Blut verbessert werden. Auch wenn nur wenig über Sialidasen im Serum bekannt ist, konnte gezeigt werden, dass sialylierte Glykoproteine desialyliert werden und vom Asialoglykoproteinrezeptor gebunden und aus dem Blutstrom entfernt werden (Weiss und Ashwell, 1989). Andererseits werden Sialidasen schon beim Produktionsprozess aus beschädigten und absterbenden Zellen freigesetzt (Munzert et al., 1997), so dass auch hier eine Erhöhung der Sialidaseresistenz nutzbringend ist.

5.4 Ausblick

Die hier dargestellten Ergebnisse der Modifizierung der Sialylierung wurden *in vitro* gewonnen und lassen sich in Bezug auf medizinische Anwendungen nicht direkt auf das humane System übertragen. Hierfür muss die Resistenz der veränderten Glykane gegenüber

Sialidasen *in vivo* am Tiermodell und in klinischen Studien überprüft werden. Weiterhin muss in Tierversuchen ausgeschlossen werden, dass die mit den Sialinsäurederivaten ausgestatteten Glykane toxisch sind oder eine antigene Wirkung haben. Zumindest Neu5Prop scheint nicht oder nur sehr schwach immunogen zu sein, da N-propanoyliertes Gruppe-B-Meningokokkenpolysaccharid keine Immunreaktion auslöst (Pon et al., 1997). Zudem beeinflussen die Sialinsäuren die Affinität von EPO zu seinem Rezeptor EPO-R. Die Bindung von EPO an seinen Rezeptor wird durch die unter physiologischen Bedingungen negativ geladenen Sialinsäuren abgeschwächt, da der Rezeptor an der Bindestelle ebenfalls negative Ladungen trägt, wodurch die minimale effektive Konzentration für sialylierte EPO-Spezies mit jeder zusätzlichen Sialylierung steigt. Dennoch wird die minimale effektive Konzentration im Falle der sialylierten EPO-Spezies verzögert unterschritten, weil diese langsamer durch den EPO-Rezeptor und Asialoglykoproteinrezeptoren internalisiert werden. Die verringerte Affinität zum Rezeptor verringert jedoch nicht Dauer und Größenordnung der STAT5-Phosphorylierung, die sich an die Rezeptorbindung anschließt (Elliott et al., 2004). Es sollte genauer untersucht werden inwiefern, sich die sterischen Änderungen, welche die neuartigen Sialinsäuren mit sich bringen, auf die Bindung von EPO an seinen Rezeptor und die nachfolgenden Signaltransduktionswege auswirken.

6 Zusammenfassung

Die Anzahl für therapeutische Zwecke zugelassener rekombinanter Glykoproteine hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Diese Glykoproteine werden üblicherweise in Säugerzelllinien hergestellt, um die säugerspezifische Glykosylierung zu erhalten. Die Berücksichtigung der Spezifität der Glykosylierung ist sehr wichtig, da sie einen großen Einfluss auf die pharmazeutischen Eigenschaften rekombinanter Glykoproteine hat. Die äußere Position in den komplexen Glykanseitenketten der Proteine wird im Säuger zumeist von Sialinsäuren besetzt. Ihre Anwesenheit verlängert die Halblebenszeit von Serumproteinen, welche ansonsten anhand der exponierten Galaktose von Asialoglykoproteinrezeptoren erkannt und internalisiert werden. Die Sialinsäuren therapeutischer Glykoproteine werden sowohl bei der Produktion als auch im Blutkreislauf von Sialidasen abgespalten, was zum einen zu einer Verringerung der Produktionsqualität und zum anderen zu einer Verkürzung der Halblebenszeit im Patienten führt. In der Biosynthese der Sialinsäuren kann der natürliche Vorläufer Acetylmannosamin, bedingt durch die geringe Spezifität der ManNAc-Kinase, durch andere N-Acylmannosamine ersetzt werden, was zur Bildung der entsprechenden N-Acylneuraminsäuren mit neuen Eigenschaften führt. In dieser Arbeit wurden die Glykane von in CHO-S-Zellen exprimiertem EPO durch Zusatz von 10 mM N-Propanoylmannosamin bzw. N-Pentanoylmannosamin zum Zellkulturmedium modifiziert. Die resultierende Sialylierung mit N-Propanoylneuraminsäure und N-Pentanoylneuraminsäure konnte durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Die Sialidaseresistenz der neuartigen Sialylierung wurde anschließend in einem Verdau mit Sialidase A, der mithilfe einer 2D-Gelelektrophorese analysiert wurde, untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass ManNProp und insbesondere ManNPent zu einer Erhöhung der Resistenz der Sialylierung gegenüber Sialidase A führen. Diese Vorläufermoleküle könnten sowohl dazu genutzt werden, den Produktionsprozess therapeutischer Glykoproteine wie EPO zu optimieren, als auch die Halblebenszeit im Blutstrom zu verlängern. Dadurch ließen sich die Behandlungsdosen verringern bzw. die Behandlungsintervalle von Patienten verlängern, wodurch Therapiekosten gesenkt und die Lebensqualität erhöht werden können. Im Gegensatz zu ManNProp und ManNPent erwies sich das ebenfalls verwendete ManNHept als zelltoxisch und wurde nicht in die Glykane von EPO integriert.

7 Literatur

- Akimoto T, Kusano E, Inaba T, Imura O, Takahashi H, Ikeda H, Ito C, Ando Y, Ozawa K, Asano Y (2000) Erythropoietin Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis by a Phosphatidylinositol 3 Kinase-dependent Pathway. *Kidney Int* **58**: 269–282.
- Ammarguellet F, Gogusev J, Drüeke T B (1996) Direct Effect of Erythropoietin on Rat Vascular Smooth-muscle Cell via a Putative Erythropoietin Receptor. *Nephrol Dial Transplant* **11**: 687–692.
- Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N (1999) On the Frequency of Protein Glycosylation, as Deduced from Analysis of the SWISS-PROT Database. *Biochim Biophys Acta* **1473**: 4–8.
- Ashwell G, Harford J (1982) Carbohydrate-specific Receptors of the Liver. *Annu Rev Biochem* **51**: 531–554.
- Bachmann S, Le Hir M, Eckardt K U (1993) Co-localization of Erythropoietin mRNA and Ecto-5'-nucleotidase Immunoreactivity in Peritubular Cells of Rat Renal Cortex Indicates That Fibroblasts Produce Erythropoietin. *J Histochem Cytochem* **41**: 335–341.
- Bahlmann F H, De Groot K, Spandau J M, Landry A L, Hertel B, Duckert T, Boehm S M, Menne J, Haller Hermann, Fliser D (2004) Erythropoietin Regulates Endothelial Progenitor Cells. *Blood* **103**: 921–926.
- Bakker H, Rouwendal G J A, Karnoup A S, Florack D E A, Stoopen G M, Helder J P F G, van Ree R, van Die I, Bosch D (2006) An Antibody Produced in Tobacco Expressing a Hybrid Beta-1,4-galactosyltransferase Is Essentially Devoid of Plant Carbohydrate Epitopes. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 7577–7582.
- Bardor M, Nguyen D H, Diaz S, Varki A (2005) Mechanism of Uptake and Incorporation of the Non-human Sialic Acid N-glycolylneuraminic Acid into Human Cells. *J Biol Chem* **280**: 4228–4237.
- Beckman D L, Lin L L, Quinones M E, Longmore (1999) Activation of the Erythropoietin Receptor Is Not Required for Internalization of Bound Erythropoietin. *Blood* **94**: 2667–2675.
- Birnboim H C, Doly J (1979) A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513–1523.
- Blix F G, Gottschalk A, Klenk E (1957) Proposed Nomenclature in the Field of Neuraminic and Sialic Acids. *Nature* **179**: 1088.
- Bork K, Reutter W, Weidemann W, Horstkorte R (2007) Enhanced Sialylation of EPO by

- Overexpression of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManAc Kinase Containing a Sialuria Mutation in CHO Cells. *FEBS Lett* **581**: 4195–4198.
- Borys M C, Linzer D I, Papoutsakis E T (1993) Culture pH Affects Expression Rates and Glycosylation of Recombinant Mouse Placental Lactogen Proteins by Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells. *Biotechnology (N.Y.)* **11**: 720–724.
- Brockhausen I (1999) Pathways of O-glycan Biosynthesis in Cancer Cells. *Biochim Biophys Acta* **1473**: 67–95.
- Brockhausen I, Dowler T, Paulsen H (2009) Site Directed Processing: Role of Amino Acid Sequences and Glycosylation of Acceptor Glycopeptides in the Assembly of Extended Mucin Type O-glycan Core 2. *Biochim Biophys Acta* **1790**: 1244–1257.
- Brooks J E (1987) Properties and Uses of Restriction Endonucleases. *Meth Enzymol* **152**: 113–129.
- Buschiazzo A, Tavares G A, Campetella O, Spinelli Silvia, Cremona M L, París G, Amaya M F, Frasch A C C, Alzari P (2000) Structural Basis of Sialyltransferase Activity in Trypanosomal Sialidases. *EMBO J* **19**: 16–24.
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri G M, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L Righetti P G (2004) Blue Silver: a Very Sensitive Colloidal Coomassie G-250 Staining for Proteome Analysis. *Electrophoresis* **25**: 1327–1333.
- Cantell K, Hirvonen S, Sareneva T, Pirhonen J, Julkunen I (1992) Differential Inactivation of Interferons by a Protease from Human Granulocytes. *J Interferon Res* **12** (3): 177–183.
- Carlini R G, Reyes A A, Rothstein M (1995) Recombinant Human Erythropoietin Stimulates Angiogenesis in Vitro. *Kidney Int* **47** (3): 740–745.
- Ceaglio N, Etcheverrigaray M, Kratje R, Oggero M (2008) Novel Long-lasting Interferon Alpha Derivatives Designed by Glycoengineering. *Biochimie* **90** (3): 437–449.
- Ceaglio N, Etcheverrigaray M, Kratje R, Oggero M (2010) Influence of Carbohydrates on the Stability and Structure of a Hyperglycosylated Human Interferon Alpha Mutein. *Biochimie* **92** (8): 971–978.
- Chandrasekan A, Srinivasan A, Raman R, Viswanathan K, Raguram S, Tumpey T M (2008) Glycan Topology Determines Human Adaptation of Avian H5N1 Virus Hemagglutinin. *Nat Biotechnol* **26** (1): 107–113.
- Colli W (1993) Trans-sialidase: a Unique Enzyme Activity Discovered in the Protozoan Trypanosoma Cruzi. *FASEB J* **7** (13): 1257–1264.
- Collins B E, Fralich T J, Itonori S, Ichikawa Y, Schnaar R L (2000) Conversion of Cellular Sialic Acid Expression from N-acetyl- to N-glycolylneuraminic Acid Using a Synthetic

- Precursor, N-glycolylmannosamine Pentaacetate: Inhibition of Myelin-associated Glycoprotein Binding to Neural Cells. *Glycobiology* **10** (1): 11–20.
- Constantinescu S N, Ghaffari S, Lodish H F (1999) The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction. *Trends Endocrinol Metab* **10** (1): 18–23.
- D'Andrea A D, Lodish H F, Wong GG (1989) Expression Cloning of the Murine Erythropoietin Receptor. *Cell* **57** (2): 277–285.
- De Maria R, Eramo A, Domenichelli C, Bonci D, Grignani F, Srinivasula S M, Alnemri E S, Testa U, Peschle C (1999) Negative Regulation of Erythropoiesis by Caspase-mediated Cleavage of GATA-1. *Nature* **401** (6752): 489–493.
- Dordal M S, Wang F F, Goldwasser E (1985) The Role of Carbohydrate in Erythropoietin Action. *Endocrinology* **116** (6): 2293–2299.
- Doucey M A, Hess D, Cacan R, Hofsteenge J. (1998) Protein C-mannosylation Is Enzyme-catalysed and Uses Dolichyl-phosphate-mannose as a Precursor. *Mol Biol Cell* **9** (2): 291–300
- Eckhardt M, Mühlenhoff M, Bethe A, Gerardy-Schahn R (1996) Expression Cloning of the Golgi CMP-sialic Acid Transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** (15): 7572–7576
- Egrie J C, Browne J K (2001) Development and Characterization of Novel Erythropoiesis Stimulating Protein (NESP). *Br J Cancer* **84** Suppl 1: 3–10
- Egrie J C, Dwyer E, Browne J K, Hitz A, Lykos M A (2003) Darbepoetin Alfa Has a Longer Circulating Half-life and Greater in Vivo Potency Than Recombinant Human Erythropoietin. *Exp Hematol* **31** (4): 290–299.
- Elliot S, Egrie J, Browne J, Lorenzini T, Busse L, Rogers N, Ponting I (2004) Control of rHuEPO Biological Activity: The Role of Carbohydrate. *Exp Hematol* **32** (12): 1146–1155.
- Elliot S, Lorenzini T, Asher S, Aoki K, Brankow D, Buck L, Busse L, Chang D, Fuller J, Grant J, Hernday N, Hokum M, Hu S, Knudten A, Levin N, Komorowski R, Martin F, Navarro R, Osslund T, Rogers G, Rogers N, Trail G, Egrie J (2003) Enhancement of Therapeutic Protein in Vivo Activities Through Glycoengineering. *Nat Biotechnol* **21** (4): 349–421.
- Erslev A (1953) Humoral Regulation of Red Cell Production. *Blood* **8** (4): 349–357.
- Eschbach J W, Egrie J C, Downing M R, Browne J K, Adamson J W (1987) Correction of the Anemia of End-stage Renal Disease with Recombinant Human Erythropoietin. Results of a Combined Phase I and II Clinical Trial. *N Engl. J Med* **316** (2): 73–78.
- Fandrey J, Bunn H F (1993) In Vivo and in Vitro Regulation of Erythropoietin mRNA: Measurement by Competitive Polymerase Chain Reaction. *Blood* **81** (3): 617–623.

- Feizi T, Mulloy B (2003) Carbohydrates and Glycoconjugates. Glycomics: The New Era of Carbohydrate Biology. *Curr Opin Struct Biol* **13** (5): 602–604.
- Fernandes A I, Gregoriadis G (1996) Synthesis, Characterization and Properties of Sialylated Catalase. *Biochim Biophys Acta* **1293** (1): 90–96.
- Fernandes A I, Gregoriadis G (1997) Polysialylated Asparaginase: Preparation, Activity and Pharmacokinetics. *Biochim Biophys Acta* **1341** (1): 26–34.
- Finne J, Finne U, Deagostini-Bazin H, Goridis C (1983) Occurrence of Alpha 2-8 Linked Polysialosyl Units in a Neural Cell Adhesion Molecule. *Biochem Biophys Res Commun* **112** (2): 482–487.
- Frenkel Z, Gregory W, Kornfeld S, Lederkremer G Z (2003) Endoplasmic Reticulum-associated Degradation of Mammalian Glycoproteins Involves Sugar Chain Trimming to Man6-5GlcNAc2. *Journal Biol Chem* **278** (36): 34119–34124.
- Fukuda M N, Sasaki H, Lopez L, Fukuda M (1989) Survival of Recombinant Erythropoietin in the Circulation: The Role of Carbohydrates. *Blood* **73** (1): 84–89.
- Gavel Y, von Heijne G (1990) Sequence Differences Between Glycosylated and Non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser Acceptor Sites: Implications for Protein Engineering. *Protein Eng* **3** (5): 433–442.
- Gawlitzeck M, Estacio M, Fürch T, Kiss R (2009) Identification of Cell Culture Conditions to Control N-glycosylation Site-occupancy of Recombinant Glycoproteins Expressed in CHO Cells. *Biotechnol Bioeng* **103** (6): 1164–1175.
- Gogusev J, Zhu D L, Hérembert, Ammarguella F, Marche P, Druke T (1994) Effect of Erythropoietin on DNA Synthesis, Proto-oncogene Expression and Phospholipase C Activity in Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochem Biophys Res Commun* **199** (2): 977–983.
- Goochee C F, Monica T (1990) Environmental Effects on Protein Glycosylation. *Biotechnology (N.Y.)* **8** (5): 421–427.
- Gregoriadis G, Fernandes A, Mital M, McCormack B (2000) Polysialic Acids: Potential in Improving the Stability and Pharmacokinetics of Proteins and Other Therapeutics. *Cell Mol Life Sci* **57** (13-14): 1964–1969.
- Gregory C J (1976) Erythropoietin Sensitivity as a Differentiation Marker in the Hemopoietic System: Studies of Three Erythropoietic Colony Responses in Culture. *J Cell Physiol* **89** (2): 289–301.
- Gregory C J, Eaves A C (1977) Human Marrow Cells Capable of Erythropoietic Differentiation in Vitro: Definition of Three Erythroid Colony Responses. *Blood* **49** (6) : 855–864.

- Gröbe D: Biochemische Modifikation von Glykan-Strukturen durch nicht natürliche Monosaccharide und ihr Einfluss auf die Sialidase-Resistenz. Freie Universität Berlin, Berlin, 2008
- Grünholz H J, Harms E, Opetz M, Reutter W, Cerný M (1981) Inhibition of in Vitro Biosynthesis of N-acetylneuraminic Acid by N-acyl- and N-alkyl-2-amino-2-deoxyhexoses. *Carbohydr Res* **96** (2): 259–270
- Hamilton S R, Gerngross T U (2007) Glycosylation Engineering in Yeast: The Advent of Fully Humanized Yeast. *Curr Opin Biotechnol* **18** (5): 387–392.
- Hanlon P R, Fu P, Wright G L, Steenbergen C, Arcasoy M O, Murphy E (2005) Mechanisms of Erythropoietin-mediated Cardioprotection During Ischemia-reperfusion Injury: Role of Protein Kinase C and Phosphatidylinositol 3-kinase Signaling. *FASEB J* **19** (10): 1323–1325.
- Harduin-Lepers A, Recchi M A, Delannoy P (1995) 1994, the Year of Sialyltransferases. *Glycobiology* **5** (8): 741–758.
- Harduin-Lepers A, Mollicone R, Delannoy P, Oriol R, (2005) The Animal Sialyltransferases and Sialyltransferase-related Genes: a Phylogenetic Approach. *Glycobiology* **15** (8): 805–817.
- Hart G W, Akimoto Y: The O-GlcNAc Modification. In: Varki A, Cummings R D, Esko J D, Freeze H H, Stanley P, Bertozzi C R, Hart G W, Etzler M E, (ed):Essentials of Glycobiology. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 18.
- Haynes P A (1998). Phosphoglycosylation: a New Structural Class of Glycosylation? *Glycobiology* **8** (1): 1–5.
- Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher A M, Dimmeler S (2003) Erythropoietin Is a Potent Physiologic Stimulus for Endothelial Progenitor Cell Mobilization. *Blood* **102** (4): 1340–1346.
- Herrmann M, von der Lieth C W, Stehling P, Reutter W, Pawlita M (1997) Consequences of a Subtle Sialic Acid Modification on the Murine Polyomavirus Receptor. *J Virol* **71** (8): 5922–5931.
- Hinderlich S, Berger M, Keppler O T, Pawlita M, Reutter W (2001) Biosynthesis of N-acetylneuraminic Acid in Cells Lacking UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine Kinase. *Biol Chem* **382** (2): 291–297.
- Hinderlich S, Stäsche R, Zeitler R, Reutter W (1997) A Bifunctional Enzyme Catalyzes the First Two Steps in N-acetylneuraminic Acid Biosynthesis of Rat Liver. Purification and

- Characterization of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine Kinase. *J Biol Chem* **272** (39): 24313–24318.
- Hokke C H, Bergwerf A A, Van Dedem G W, Kamerling J P, Vliegthart J F (1995) Structural Analysis of the Sialylated N- and O-linked Carbohydrate Chains of Recombinant Human Erythropoietin Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells. Sialylation Patterns and Branch Location of Dimeric N-acetylglucosamine Units. *Eur J Biochem* **228** (3): 981–1008.
- Horstkorte R, Mühlenhoff M, Reutter W, Nöhring S, Zimmermann-Kordmann M, Gerardy-Schahn R (2004) Selective Inhibition of Polysialyltransferase ST8SiaII by Unnatural Sialic Acids. *Exp Cell Res* **298** (1): 268–274.
- Horstkorte R, Rau K, Reutter W, Nöhring S, Lucka L (2004) Increased Expression of the Selectin Ligand sialyl-Lewis(x) by Biochemical Engineering of Sialic Acids. *Exp Cell Res* **295** (2): 549–554.
- Irie A, Koyama S, Kozutsumi Y, Kawawasaki T, Suzuki A (1998) The Molecular Basis for the Absence of N-glycolylneuraminic Acid in Humans. *J Biol Chem* **273** (25): 15866–15871
- Iscove N N, Sieber F (1975) Erythroid Progenitors in Mouse Bone Marrow Detected by Macroscopic Colony Formation in Culture. *Exp Hematol* **3** (1): 32–43.
- Jacobs C L, Goon S, Yarema K J, Hinderlich S, Hang H C, Chai D H, Bertozzi C R (2001) Substrate Specificity of the Sialic Acid Biosynthetic Pathway. *Biochemistry* **40** (43): 12864–12874.
- Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill S D, Kaufman R J, Mufson A, Seehra J, Jones S S, Hewick R, Fritsch E F, (1985) Isolation and Characterization of Genomic and cDNA Clones of Human Erythropoietin. *Nature* **313** (6005): 806–810.
- Jacobs P P, Callewaert N (2009) N-glycosylation Engineering of Biopharmaceutical Expression Systems. *Curr Mol Med* **9** (7): 774–800.
- Jones J, Krag S S, Betenbaugh M J (2005) Controlling N-linked Glycan Site Occupancy. *Biochim Biophys Acta* **1726** (2): 121–137.
- Kaplan H A, Welply J K, Lennarz W J (1987) Oligosaccharyl Transferase: The Central Enzyme in the Pathway of Glycoprotein Assembly. *Biochim Biophys Acta* **906** (2): 161–173.
- Kasturi L, Chen H, Shakin-Eshleman S H (1997) Regulation of N-linked Core Glycosylation: Use of a Site-directed Mutagenesis Approach to Identify Asn-Xaa-Ser/Thr Sequons That Are Poor Oligosaccharide Acceptors. *Biochem J* **323** (Pt 2): 415–419.
- Kawano T, Koyama S, Takematsu H, Kozutsumi Y, Kawasaki H, Kawashima S, Kawasaki T, Suzuki A (1995) Molecular Cloning of Cytidine monophospho-N-acetylneuraminic

- Acid Hydroxylase. Regulation of Species- and Tissue-specific Expression of N-glycolylneuraminic Acid. *J Biol Chem* **270** (27): 16458–16463.
- Kayser H, Zeitler R, Kannicht C, Grunow D, Nuck R, Reutter W (1992) Biosynthesis of a Nonphysiological Sialic Acid in Different Rat Organs, Using N-propanoyl-D-hexosamines as Precursors. *J Biol Chem* **267** (24): 16934–16938.
- Kean E L (1970) Nuclear Cytidine 5'-monophosphosialic Acid Synthetase. *J Biol Chem* **245** (9): 2301–2308.
- Keppler O T, Herrmann M, von der Lieth C W, Stehling P, Reutter W, Pawlita M (1998) Elongation of the N-acyl Side Chain of Sialic Acids in MDCK II Cells Inhibits Influenza A Virus Infection. *Biochem Biophys Res Commun* **253** (2): 437–442
- Keppler O T, Horstkorte R, Pawlita M, Schmidt C, Reutter W (2001) Biochemical Engineering of the N-acyl Side Chain of Sialic Acid: Biological Implications. *Glycobiology* **11** (2): 11R–18R
- Keppler O T, Stehling P, Herrmann M, Kayser H, Grunow D, Reutter W, Pawlita M (1995) Biosynthetic Modulation of Sialic Acid-dependent Virus-receptor Interactions of Two Primate Polyoma Viruses. *J Biol Chem* **270** (3): 1308–1314.
- Klingmüller U (1997) The Role of Tyrosine Phosphorylation in Proliferation and Maturation of Erythroid Progenitor Cells. *Eur J Biochem* **249** (3): 637–647.
- Kornfeld R, Kornfeld S (1985) Assembly of Asparagine-linked Oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* **54**: 631–664.
- Kornfeld S, Kornfeld R, Neufeld E F, O'Brien P J (1964) The Feedback Control of Sugar Nucleotide Biosynthesis in Liver. *Proc Natl Acad Sci USA* **52**: 371–379.
- Koury M J, Bondurant M C (1990) Erythropoietin Retards DNA Breakdown and Prevents Programmed Death in Erythroid Progenitor Cells. *Science* **248** (4953): 378–381.
- Laemmli U K (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259): 680–685.
- Langer B G, Weisel J W, Dinauer P A, Nagaswami C, Bell W R (1988) Deglycosylation of Fibrinogen Accelerates Polymerization and Increases Lateral Aggregation of Fibrin Fibers. *J Biol Chem* **263** (29): 15056–15063.
- Li Y, Takemura G, Okada H, Miyata S, Maruyama R, Li L, Higuchi M, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H (2006) Reduction of Inflammatory Cytokine Expression and Oxidative Damage by Erythropoietin in Chronic Heart Failure. *Cardiovasc Res* **71** (4): 684–694.
- Lieke T, Gröbe D, Blanchard V, Grunow D, Tauber R, Zimmermann-Kordmann M, Jacobs T, Reutter W (2011) Invasion of Trypanosoma Cruzi into Host Cells Is Impaired by N-

- propionylmannosamine and Other N-acylmannosamines. *Glycoconj J* **28** (1): 31–37.
- Lin F K, Suggs S, Lin C H, Browne J K, Smalling R, Egrie J C, Chen K K, Fox G M, Martin F, Stabinsky Z (1985) Cloning and Expression of the Human Erythropoietin Gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **82** (22): 7580–7584.
- Lombardero M, Kovacs K, Scheithauer B W (2011) Erythropoietin: a Hormone with Multiple Functions. *Pathobiology* **78** (1): 41–53.
- Manzi A E, Diaz S, Varki A (1990) High-pressure Liquid Chromatography of Sialic Acids on a Pellicular Resin Anion-exchange Column with Pulsed Amperometric Detection: a Comparison with Six Other Systems. *Anal Biochem* **188** (1): 20–32.
- Marti H H, Wenger R H, Rivas L A, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M (1996) Erythropoietin Gene Expression in Human, Monkey and Murine Brain. *Eur J Neurosci* **8** (4): 666–676.
- Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Gallyas F, Tabira T, Sasaki R (1993) Functional Erythropoietin Receptor of the Cells with Neural Characteristics. Comparison with Receptor Properties of Erythroid Cells. *J Biol Chem* **268** (15): 11208–11216.
- Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R (1994) A Novel Site of Erythropoietin Production. Oxygen-dependent Production in Cultured Rat Astrocytes. *The J Biol Chem* **269** (30): 19488–19493.
- Marshall D, Haskard D O (2002) Clinical Overview of Leukocyte Adhesion and Migration: Where Are We Now? *Semin Immunol* **14** (2): 133–140.
- Maxwell P H, Wiesener M S, Chang G W, Clifford S C, Vaux E C, Cockman M E, Wykoff CC, Pugh C W, Maher E R, Ratcliffe P J (1999) The Tumour Suppressor Protein VHL Targets Hypoxia-inducible Factors for Oxygen-dependent Proteolysis. *Nature* **399** (6733): 271–275.
- Mehta D P, Etchison J R, Wu R, Freeze H H (1997). UDP-GlcNAc:Ser-protein N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase from *Dictyostelium Discoideum* Recognizes Serine-containing Peptides and Eukaryotic Cysteine Proteinases. *J Biol Chem* **272** (45): 28638–28645.
- Miki T, Miura T, Tanno M, Nishihara M, Naitoh K, Sato T, Takahashi A, Shimamoto K (2007) Impairment of Cardioprotective PI3K-Akt Signaling by Post-infarct Ventricular Remodeling Is Compensated by an ERK-mediated Pathway.” *Basic Res Cardiol* **102** (2): 163–170.
- Miyake T, Kung C K, Goldwasser E (1977) Purification of Human Erythropoietin. *J Biol Chem* **252** (15): 5558–5564.

- Morakkabati N, Gollnick F, Meyer R, Fandrey J, Jelkmann W (1996) Erythropoietin Induces Ca²⁺ Mobilization and Contraction in Rat Mesangial and Aortic Smooth Muscle Cultures. *Exp Hematol* **24** (2): 392–397.
- Mullis K B, Faloona F A (1987) Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-catalyzed Chain Reaction. *Meth Enzymol* **155**: 335–350.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51** Pt 1: 263–273.
- Munzert E, Heidemann R, Büntemeyer H, Lehmann J, Müthing J (1997) Production of Recombinant Human Antithrombin III on 20-L Bioreactor Scale: Correlation of Supernatant Neuraminidase Activity, Desialylation, and Decrease of Biological Activity of Recombinant Glycoprotein. *Biotechnol Bioeng* **56** (4): 441–448.
- Neusser M, Tepel M, Zidek W (1993) Erythropoietin Increases Cytosolic Free Calcium Concentration in Vascular Smooth Muscle Cells. *Cardiovasc Res* **27** (7): 1233–1236.
- Novak J, Tomana M, Kilian M, Coward L, Kulhavy R, Barnes S, Mestecky J (2000) Heterogeneity of O-glycosylation in the Hinge Region of Human IgA1. *Mol Immunol* **37** (17): 1047–1056.
- Oh-ehda M, Hasegawa M, Hattori K, Kubiniwa H, Kojima T, Orita T, Tomonou K, Yamazaki T, Ochi N (1990) O-linked Sugar Chain of Human Granulocyte Colony-stimulating Factor Protects It Against Polymerization and Denaturation Allowing It to Retain Its Biological Activity. *J Biol Chem* **265** (20): 11432–11435.
- Parodi A J (2000) Protein Glucosylation and Its Role in Protein Folding. *Annu Rev Biochem* **69**: 69–93.
- Paulick M G, Bertozzi C R (2008). The Glycosylphosphatidylinositol Anchor: a Complex Membrane-anchoring Structure for Proteins. *Biochemistry* **47** (27): 6991–7000.
- Perkins M E, Rocco L J (1988) Sialic Acid-dependent Binding of Plasmodium Falciparum Merozoite Surface Antigen, Pf200, to Human Erythrocytes. *J Immunol* **141** (9): 3190–3196.
- Pon R A, Lussier M, Yang Q L, Jennings H J (1997) N-Propionylated Group B Meningococcal Polysaccharide Mimics a Unique Bactericidal Capsular Epitope in Group B Neisseria Meningitidis. *J Exp Med* **185** (11): 1929–1938.
- Rademacher T W, Parekh R B, Dwek R A (1988) Glycobiology. *Annu Rev Biochem* **57**: 785–838
- Raju T S, Briggs J B, Chamow S M, Winkler M E, Jones A J (2001) Glycoengineering of Therapeutic Glycoproteins: In Vitro Galactosylation and Sialylation of Glycoproteins

- with Terminal N-acetylglucosamine and Galactose Residues. *Biochemistry* **40** (30): 8868–8876.
- Restelli V, Wang M, Huzel N, Ethir M, Perreault H, Butler M (2006) The Effect of Dissolved Oxygen on the Production and the Glycosylation Profile of Recombinant Human Erythropoietin Produced from CHO Cells. *Biotechnol Bioeng* **94** (3): 481–494.
- Reuter G, Gabius H J (1996) Sialic Acids Structure-analysis-metabolism-occurrence-recognition. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **377** (6): 325–342.
- Rice K G, Takahashi N, Namiki Y, Tran A D, Lisi P J, Lee Y C (1992) Quantitative Mapping of the N-linked Sialyloligosaccharides of Recombinant Erythropoietin: Combination of Direct High-performance Anion-exchange Chromatography and 2-aminopyridine Derivatization. *Anal Biochem* **206** (2): 278–287.
- Rudd P M, Elliott T, Cresswell P, Wilson I A, Dwek R A (2001) Glycosylation and the Immune System. *Science* **291** (5512): 2370–2376.
- Ruddock L W, Molinari M (2006) N-glycan Processing in ER Quality Control. *J Cell Sci* **119** (Pt 21): 4373–4380
- Ruscher K, Freyer D, Karsch M, Isaev N, Megow D, Sawitzki B, Priller J, Dirnagl U, Meisel A (2002) Erythropoietin Is a Paracrine Mediator of Ischemic Tolerance in the Brain: Evidence from an in Vitro Model. *J Neurosci* **22** (23): 10291–10301.
- Saiki R K, Scharf S, Faloona F, Mullis K B, Horn G T, Erlich H A, Arnheim N (1985) Enzymatic Amplification of Beta-globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* **230** (4732): 1350–1354
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T (ed): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY, 1989
- Sarkar A K, Fritz T A, Taylor W H, Esko J D (1995) Disaccharide Uptake and Priming in Animal Cells: Inhibition of Sialyl Lewis X by Acetylated Gal Beta 1-->4GlcNAc beta-O-naphthalenemethanol. *Proc Natl Acad Sci USA* **92** (8): 3323–3327
- Sawyer S T, Krantz S B, Goldwasser E (1987) Binding and Receptor-Mediated Endocytosis of Erythropoietin in Friend Virus-Infected Erythroid Cells. *J Biol Chem* **262** (12): 5554–5562.
- Schauer R (1985) Sialic Acids and Their Role as Biological Masks. *Trends Biochem Sci* **10** (9): 357–360.
- Schähs M, Strasser R, Stadlmann J, Kunert R, Rademacher T, Steinkellner H (2007) Production of a Monoclonal Antibody in Plants with a Humanized N-glycosylation Pattern. *Plant Biotechnol J* **5** (5): 657–663.

- Scheiffele P, Füllekrug J (2000) Glycosylation and Protein Transport. *Essays Biochem* **36**: 27–35
- Semenza G L (2004) Hydroxylation of HIF-1: Oxygen Sensing at the Molecular Level. *Physiology (Bethesda)* **19**: 176–182.
- Shental-Bechor D, Levy Y (2008) Effect of Glycosylation on Protein Folding: a Close Look at Thermodynamic Stabilization. *Proc Natl AcadSci USA* **105** (24): 8256–8261
- Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M, Hanai N, Shitara K (2003) The Absence of Fucose but Not the Presence of Galactose or Bisecting N-acetylglucosamine of Human IgG1 Complex-type Oligosaccharides Shows the Critical Role of Enhancing Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity. *J Biol Chem* **278** (5): 3466–3473.
- Smith H O, Wilcox K W (1970) A Restriction Enzyme from *Hemophilus Influenzae*. I. Purification and General Properties. *J Mol Biol* **51** (2): 379–391.
- Snider M D, Rogers O G (1984) Transmembrane Movement of Oligosaccharide-lipids During Glycoprotein Synthesis. *Cell* **36** (3): 753–761
- Socolovsky M, Fallon A E, Wang S, Brugnara C, Lodish H F (1999) Fetal Anemia and Apoptosis of Red Cell Progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} Mice: a Direct Role for Stat5 in Bcl-X(L) Induction. *Cell* **98** (2): 181–191.
- Son Y, Jeong Y T, Park S, Kim J H (2011) Enhanced Sialylation of Recombinant Human Erythropoietin in Chinese Hamster Ovary Cells by Combinatorial Engineering of Selected Genes. *Glycobiology* **21** (8): 1019–1028.
- Spiro R G (2002) Protein Glycosylation: Nature, Distribution, Enzymatic Formation, and Disease Implications of Glycopeptide Bonds. *Glycobiology* **12** (4): 43R–56R.
- Spivak J L, Hogans B B (1989) The in Vivo Metabolism of Recombinant Human Erythropoietin in the Rat. *Blood* **73** (1): 90–99.
- Stäsche R, Hinderlich S, Weise C, Effertz K, Lucka L, Moormann P, Reutter W (1997) A Bifunctional Enzyme Catalyzes the First Two Steps in N-acetylneuraminic Acid Biosynthesis of Rat Liver. Molecular Cloning and Functional Expression of UDP-N-acetyl-glucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine Kinase. *J Biol Chem* **272** (39): 24319–24324.
- Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland R E, Chamber T M, Kiso M, Ishida H, Kawoaka Y (2000) Sialic Acid Species as a Determinant of the Host Range of Influenza A Viruses. *J Virol* **74** (24): 11825–11831.
- Taguchi T, Seko A, Kitajima K, Muto Y, Inoue S, Khoo K H, Morris H R, Dell A, Inoue S (1994) Structural Studies of a Novel Type of Pentaantennary Large Glycan Unit in the

- Fertilization-associated Carbohydrate-rich Glycopeptide Isolated from the Fertilized Eggs of *Oryzias Latipes*. *J Biol Chem* **269** (12): 8762–8771.
- Tan C C, Eckhardt K U, Firth J D, Ratcliffe P J (1992) Feedback Modulation of Renal and Hepatic Erythropoietin mRNA in Response to Graded Anemia and Hypoxia. *Am J Physiol* **263** (3 Pt 2): F474–481.
- Tanner M (1995) The Enzymes of Sialic Acid Biosynthesis. *Bioorg Chem* **33** (3): 216–228.
- Towbin H, Staehelin T Gordon J (1979) Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and some Applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76** (9): 4350–4354.
- Tramontano A F, Muniyappa R, Black A D, Blendea M, Cohen I, Deng, Sowers J R, Cutaia M V, El-Sherif N (2003) Erythropoietin Protects Cardiac Myocytes from Hypoxia-induced Apoptosis Through an Akt-dependent Pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **308** (4): 990–994.
- Van den Steen P, Rudd P M, Dwek R A, Opdenakker G (1998) Concepts and Principles of O-linked Glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **33** (3): 151–208.
- Varki A (1992) Diversity in the Sialic Acids. *Glycobiology* **2** (1): 25–40.
- Varki A (2001) N-glycolylneuraminic Acid Deficiency in Humans. *Biochimie* **83** (7): 615–622.
- Varki A, Cummings R D, Jeffrey, Esko J D, Freeze H H, Stanley P, Bertozzi C R, Hart G W, Etzler M E, (ed):. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor (NY), 2009. Chapter 18
- Varki N M, Varki A (2007) Diversity in Cell Surface Sialic Acid Presentations: Implications for Biology and Disease. *Lab Invest* **87** (9): 851–857.
- Walsh G (2010) Biopharmaceutical Benchmarks 2010. *Nat Biotechnol* **28** (9): 917–924.
- Wang G L, Semanza G L (1993) Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1 and Regulation of DNA Binding Activity by Hypoxia. *J Biol Chem* **268** (29): 21513–21518.
- Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M (2004) Treatment of Stroke with Erythropoietin Enhances Neurogenesis and Angiogenesis and Improves Neurological Function in Rats. *Stroke* **35** (7): 1732–1737.
- Wang X, Gu J, Ihara H, Mijoshi E, Honke K, Taniguchi N (2006) Core Fucosylation Regulates Epidermal Growth Factor Receptor-mediated Intracellular Signaling. *J Biol Chem* **281** (5): 2572–2577.
- Weiss P Ashwell G (1989) The Asialoglycoprotein Receptor: Properties and Modulation by Ligand. *Prog Clin Biol Res* **300**: 169–184.
- Wells L, Vosseller K, Hart G W (2001) Glycosylation of Nucleocytoplasmic Proteins: Signal

- Transduction and O-GlcNAc. *Science* **291** (5512): 2376–2378.
- Werner A, Horstkorte R, Glanz D, Biskup K, Blanchard V, Berger M, Bork K (2012) Glycoengineering the N-acyl Side Chain of Sialic Acid of Human Erythropoietin Affects Its Resistance to Sialidase. *Biol Chem* **393** (8): 777–783.
- Winearls C G, Oliver D O, Pippard M J, Reid C, Downing M R, Cotes P M (1986) Effect of Human Erythropoietin Derived from Recombinant DNA on the Anaemia of Patients Maintained by Chronic Haemodialysis. *Lancet* **2** (8517): 1175–1178.
- Witthuhn B A, Quelle F W, Silvennoinen, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle J N (1993) JAK2 Associates with the Erythropoietin Receptor and Is Tyrosine Phosphorylated and Activated Following Stimulation with Erythropoietin. *Cell* **74** (2): 227–236.
- Wittwer A J, Howard S C (1990) Glycosylation at Asn-184 Inhibits the Conversion of Single-chain to Two-chain Tissue-type Plasminogen Activator by Plasmin. *Biochemistry* **29** (17): 4175–4180.
- Xu B, Dong G, Liu H, Wang Y, Wu H, Jing H (2005) Recombinant Human Erythropoietin Pretreatment Attenuates Myocardial Infarct Size: a Possible Mechanism Involves Heat Shock Protein 70 and Attenuation of Nuclear factor-kappaB. *Ann Clin Lab Sci* **35** (2): 161–168.
- Yamane-Ohnuki N, Kinoshita S, Inoue-Urakubo M, Kusunoki M, Iida S, Nakano R, Wakitani M, Niwa R, Sakurada M, Uchida K, Shitara K, Satoh M (2004) Establishment of FUT8 Knockout Chinese Hamster Ovary Cells: An Ideal Host Cell Line for Producing Completely Defucosylated Antibodies with Enhanced Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity. *Biotechnol Bioeng* **87** (5): 614–622.
- Yang M, Butler M (2000) Effects of Ammonia on CHO Cell Growth, Erythropoietin Production, and Glycosylation. *Biotechnol Bioeng* **68** (4): 370–380.
- Zhang Y, Iwasa T, Tsuda M, Kobata A, Takasaki S (1997) A Novel Monoantennary Complex-type Sugar Chain Found in Octopus Rhodopsin: Occurrence of the Gal beta1-->4Fuc Group Linked to the Proximal N-acetylglucosamine Residue of the Trimannosyl Core. *Glycobiology* **7** (8): 1153–1158

8 Thesen

1. Ziel der Arbeit war es, die Sialylierung von Erythropoietin durch Mannosaminderivate zu modifizieren und die Stabilität dieser Sialylierung durch einen Sialidaseassay zu überprüfen.
2. Die Sialylierung des rekombinant in CHO-S-Zellen exprimierten Erythropoietins sollte durch Zusatz der Mannosaminanaloge N-Propanoylmannosamin, N-Pentanoylmannosamin und N-Heptanoylmannosamin zum Zellkulturmedium verändert werden.
3. Das Zellwachstum wurde von N-Propanoyl- und N-Pentanoylmannosamin bei einer Konzentration von 10 mM nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu erwies sich Heptanoylmannosamin bei Konzentrationen über 2,5 mM als zelltoxisch.
4. Der Einbau der Sialinsäuren N-Propanoyl- und N-Pentanoylneuraminsäure in die Glykane EPOs konnte massenspektrometrisch mit MALDI-TOF nachgewiesen werden. Es stellte sich heraus, dass die native N-Acetylneuraminsäure größtenteils von diesen Sialinsäuren verdrängt wurde. Heptanoylneuraminsäure wurde dagegen nicht in die Glykane von EPO integriert.
5. Aufgrund der negativen Ladung der Sialinsäuren hat EPO in Abhängigkeit des Sialylierungsgrades mehrere Molekülklassen unterschiedlicher pI, die sich durch eine 2D-Gelelektrophorese sichtbar machen lassen und typischerweise in einem Bereich von pH 4–5,8 als diskrete Spots auftreten, wobei die Sialylierung mit zunehmenden pH-Wert abnimmt. Wird EPO vollständig desialyliert, tritt nur noch ein Spot im Bereich von pH 5,8 auf. Im Vergleich zu N-Acetylneuraminsäure zeigen die mit N-Propanoylneuraminsäure und insbesondere mit N-Pentanoylneuraminsäure sialylierten Glykane eine erhöhte Resistenz gegen die Abspaltung durch Sialidase A.
6. N-Propanoyl- und N-Pentanoylmannosamin könnten dazu genutzt werden die Qualität der Sialylierung von EPO schon beim Produktionsprozess zu verbessern, da hier die Glykane durch Sialidasen, die aus abgestorbenen Zellen freigesetzt werden desialyliert werden. Durch eine erhöhte Halblebenszeit im Blutstrom können die Behandlungsdosen herabgesetzt werden bzw. die Behandlungsintervalle verlängert werden, was zur Senkung der Therapiekosten und zur Steigerung der Lebensqualität der Patienten führt.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten	
Name	Anselm Cornelius Werner
Geburtsdatum	7.6.1976
Geburtsort	Burg bei Magdeburg
Familienstand	Verheiratet, 2 Kinder
Schulbildung	
1983-1991	Polytechnische Oberschule Hermann Matern in Burg
1991-1995	Gymnasium Burg in Burg
Studium	
1995-2004	Studium der Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
1998-1999	Studium der Biologie an der Universidad Autónoma del País Vasco, Bilbao (Spanien) im Rahmen des Erasmus Austauschprojekts
5.2004	Abschluss des Studiums der Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena als Diplom-Biologe Thema der Diplomarbeit: Untersuchungen zur heterologen Expression eines Hydrophobins aus <i>Tricholoma terreum</i> im <i>Schizophyllum commune</i> ; Note 1,6
10.2007-11.2008	Studienergänzung Molekularbiologie bei der Firma Eurogene GmbH in Leipzig gefördert durch die Otto Benecke Stiftung e.V.
Seit 4.2009	Beginn der Promotion im Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät an der Martin-Luther-Universität in Halle unter der Betreuung von Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte
Berufliche Tätigkeiten	
10.2003-9.2004	Wissenschaftliche Hilfskraft am Max-Planck-Institut für Biogeochemie in Jena
10.2005-5.2007	Eigenständiges Projekt in Chile (VII. Región) zur Varroaresistenz in Honigbienen
6.2006-9.2006	Praktikum beim Institut für Marktökologie in Chile;

Tabellarischer Lebenslauf

	Tätigkeit als Inspektor und Aufarbeitung von Kundendaten
10.2008-3.2009	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Bakteriologie und Mykologie an der veterinärmedizinischen Fakultät Universität Leipzig
Seit 4.2009	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät an der Martin-Luther-Universität in Halle (Saale)

Leipzig, den 23. 2. 2013

Anselm Werner

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und alle wörtlichen oder sinngemäß übernommenen Textstellen als solche kenntlich gemacht habe. Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für die Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Leipzig, den 23.2. 2013

Anselm Werner

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich habe nur diesen einen Antrag auf Eröffnung des Promotionsverfahrens eingereicht und kein anderes Promotionsverfahren an einer anderen Universität oder Hochschule im In- und Ausland beantragt bzw. zu laufen habe.

Leipzig, den 23.2. 2013

Anselm Werner

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit, die fachliche und freundliche Unterstützung und sein stetes Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Besonderer Dank gilt Dr. Kaya Bork für die gute Betreuung, Diskussionsbereitschaft, stete Hilfsbereitschaft und motivierende Worte während der gesamten Zeit.

Dr. Markus Berger und seiner Arbeitsgruppe vom Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie der Charité Berlin danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen der Glykane sowie Dr. Dagobert Glanz für die Synthese der Mannosaminderivate.

Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Horstkorte für die nette Atmosphäre und für ihre Hilfsbereitschaft bei der Lösung größerer und kleinerer Probleme im Labor bedanken.

Peter, Enrico und Thorsten danke ich für gemeinsame inspirierende und kurzweilige Spaziergänge zur Mensa und ins HWG-Bistro.

Ulrike und Johannes danke ich für das Korrekturlesen.

Mein ganz besonderer Dank gilt jedoch meiner lieben Frau Marta für ihre Unterstützung und Geduld während der gesamten Promotionszeit.