

Evaluierung der Analysestrategie von Polysialinsäurekettenlängen mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Farzali Huseynov
aus Sumqayit (AZE)

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: PD Dr. Galuska

Gutachter: Prof. Dr. Borggrefe

Tag der Disputation: 06.11.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Sialinsäuren	1
1.1.1 Vorkommen und Funktion	2
1.1.2 Polysialinsäure.....	4
1.1.3 Extrazelluläre neutrophile Fallen	7
1.1.4 Polysialyltransferasen	8
1.2 Methoden zur Detektion von Sialin- und Polysialinsäuren	9
1.2.1 Bestimmung von Sialinsäuren.....	10
1.2.2 Detektion und Quantifizierung von Oligo-/Polysialinsäuren	11
1.3 Chromatographie	12
1.3.1 Der Trennungsprozess.....	13
1.3.2 Das Chromatogramm.....	13
1.4 Hochdruckflüssigkeitschromatographie	14
1.4.1 Aufbau einer HPLC-Anlage	15
1.4.2 Trägermaterial und Trennmechanismen.....	18
2. Zielsetzung	21
3. Material und Methoden	22
3.1. Materialien.....	22
3.2. Methoden	23
3.2.1 Technische Verfahren	23
3.2.2 Chemische Methoden und Analysetechniken.....	26
3.2.3 Aufarbeitung der Gewebeprobe	29
4. Ergebnisse.....	31
4.1. Analyse von Gewebeprobe.....	31
4.2. Fraktionierung von definierten Kettenlängenbereichen	33
4.3. Quantifizierung der fraktionierten Polysialinsäuren	35
4.4. Vergleich der DMB-Markierung von reduzierter und nativer Polysialinsäuren	38

4.5. Charakterisierung der Abspaltung und DMB-Markierung von Sialinsäuren bei Glykoproteinen.....	44
4.5.1 Derivatisierung mit Hydrolyse.....	45
4.5.2 Derivatisierung ohne Hydrolyse.....	46
5. Diskussion	50
6. Zusammenfassung	60
7. Summary	61
8. Abkürzungsverzeichnis	62
9. Abbildungs- /Tabellenverzeichnis.....	63
10. Literaturverzeichnis.....	65
11. Eidesstattliche Erklärung.....	78
12. Danksagung.....	79
13. Lebenslauf	80

1. Einleitung

1.1 Sialinsäuren

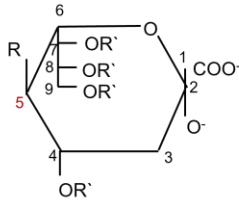
Die ersten Hinweise für die Existenz von Sialinsäure wurden im Jahr 1927 durch Landsteiner, Levene und Walz entdeckt (Walz 1927) (Levene und Landsteiner 1927). Durch weitere Studien, vor allem zwischen 1935 und 1970, konnten die chemischen und konformativen Strukturen von Sialinsäuren bestätigt, sowie weiterführend erforscht werden (Sato und Kitajima 2013a). Insbesondere die Arbeiten von Gunnar Blix, Ernst Klenk und Alfred Gottschalk gelten als wegweisend (Schauer und Kamerling 2018). Begriffshistorisch kommt das Wort Sialinsäure aus dem griechischen und leitet sich von "sialos" ab, was übersetzt auf Deutsch "Speichel" bedeutet (Wang und Brand-Miller 2003).

Grundlegend besteht die Sialinsäure aus einem 9-Kohlenstoff-Grundgerüst (Bornhöfft et al. 2018) und ist der Oberbegriff für die Familie der N- und O-substituierten Derivate der Neuraminsäure (Wang 2009). Die Sialinsäure-Familie umfasst derzeit über 50 natürlich vorkommende Mitglieder (Olaru et al. 2020). Sie sind in der Natur weit verbreitet und kommen in einigen Bakterien, Viren, Protozoen, Pilzen sowie in Tieren der Deuterostom-Linie und in niederen Wirbeltieren vor (Ghosh 2020). Sialinsäuren treten in den meisten Fällen als Monosialylreste, an der nicht reduzierten Endposition der Glykanketten von Glykoproteinen und Glykolipiden, auf (Huizing et al. 2021). Glykokonjugate gebundenen Sialinsäuren zeigen sich in der α -anomeren Form, während die freien Formen hauptsächlich β -anomere Ringstrukturen aufweisen (Kamerling und Gerwig 2006). Alle Sialinsäuren haben an der ersten Kohlenstoff-Position ein Carboxylat, welches bei physiologischem pH-Wert typischerweise ionisiert ist (Varki 1997).

In der Natur zeichnen sich Sialinsäuren durch eine große chemische Vielfalt aus. Während Variationen an C-5-Körpern die Sia-Kernstrukturen definieren, erzeugen Modifikationen an C-4, C-7, C-8 und/oder C-9-Kohlenstoff-Position weitere Varianten in der Sialinsäure-Familie (Schnaar et al. 2014). Die drei wichtigsten Sialinsäuren, die in der Natur frei vorkommen, sind: N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) und Desaminoneuraminsäure (KDN: 2-Keto-3-desoxy-D-glycero-D-galactono-Nonosäure) (Abbildung 1) (Sato 2004). Neu5Ac bildet die vorherrschende Form in Säugerzellen (Jakobsson et al. 2015). Neu5Gc wird infolge der Hydroxylierung am C5-Körper der N-Acetylneuraminsäure gebildet (Barnard et al. 2020). Der Prozess wird grundsätzlich durch die cytidine-5'-monophosphate (CMP) -Neu5Ac-Hydroxylase katalysiert, die bei Menschen inaktiv sind (Yang et al. 2022). Im Vergleich zu Neu5Ac enthält

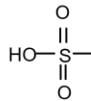
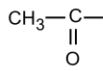
KDN in der C-5 Position, anstelle der Acetamidgruppe, eine Hydroxylgruppe (Kitajima et al. 2015).

A. Grundgerüst der Sialinsäuren

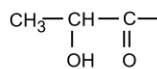


B. Modifizierungen

Acylierung Sulfatierung



Methylierung Lactylierung



C. Arten der Sialinsäuren

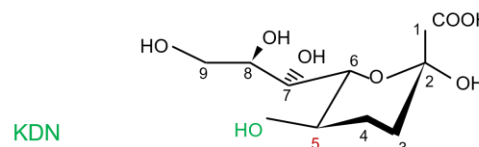
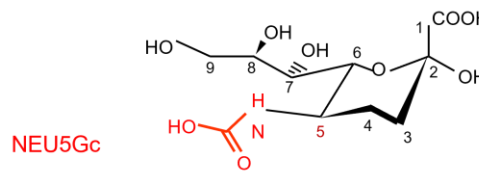
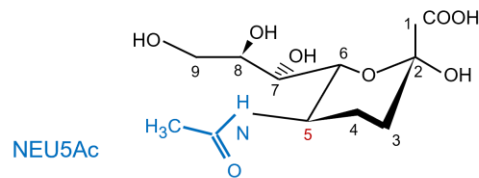


Abbildung 1: Struktur der Sialinsäuren

(A) Sialinsäuren bestehen aus einem 9-Kohlenstoff-Grundgerüst. (B) Sie können durch chemische Veränderungen an C1, C4, C7, C8 oder C9-Positionen in verschiedenen Variationen vorkommen (hier in Valenzstrichformel dargestellt). (C) Die Neu5Ac, Neu5Gc und KDN sind die drei in der Natur am häufigsten vorkommenden Sialinsäurearten. Das Grundgerüst ist in Haworth-Schreibweise und die Neu5Ac, Neu5Gc und KDN in Sesselform abgebildet. Eigendarstellung, angelehnt an Sato et al. (Sato und Kitajima 2013a).

1.1.1 Vorkommen und Funktion

Die Existenz von Sialinsäuren ist in der Natur weit verbreitet und erstreckt sich von Bakterien bis hin zum Menschen (Fliniaux et al. 2022). Ihr Vorkommen ist in der Abstammungslinie der Neumünder stärker ausgeprägt als in anderen Gruppen wie Bakterien oder Viren (Schnaar et al. 2014). In Pflanzen dagegen können keine Sialinsäuren nachgewiesen werden (Spichtig et al. 2010). Als endständige Einheiten von Glykokonjugate sind Sialinsäuren beim Menschen ubiquitär verteilt (Zhang et al. 2019). So kommen sie beispielweise in vielen menschlichen Körperflüssigkeiten wie Speichel, Magensaft (Jahan et al. 2016), Serum, Urin, Tränen, Liquor (Ji et al. 2017) und in Muttermilch vor (Wang und Brand-Miller 2003). Die höchste Neu5Ac-Konzentration ist bei Menschen im Gehirn vorhanden. In der neuronalen Zellmembran ist beispielweise eine in etwa 20-fach höhere Sialinsäurekonzentration als in anderen Zellmembranen enthalten (Wang 2009).

Einleitung

Im Jahr 1986 gelang es der Gruppe von Inoue et al. erstmalig KDN in Spermien von Fischeiern nachzuweisen (Nadano et al. 1986). Ihr Vorkommen scheint jedoch auf Wirbeltiere beschränkt zu sein (Tiralongo und Martinez-Duncker 2013). Bei Menschen beträgt das KDN-Expressionsniveau ungefähr 0,01 mol% von Neu5Ac (Inoue et al. 2010). Neu5Gc wird weitestgehend in Säugetieren exprimiert (Kitajima et al. 2015) und sind insbesondere in einigen Milchprodukten und im roten Fleisch enthalten (Wang 2012). Im Gegensatz dazu ist die Synthese von Neu5Gc bei Menschen nicht möglich (Jahan et al. 2016). Trotz allem wurden auf humaner Epithelien und in Gefäßendothelien eine geringe Menge an Neu5Gc nachgewiesen (Diaz et al. 2009). Die Studien belegen zudem, dass Menschen Antikörper gegen Neu5Gc enthalten (Dhar et al. 2019). Nach aktuellem Kenntnisstand wird davon ausgegangen, dass die entstehenden Antigen-Antikörper-Interaktionen zu chronischen Entzündungen, Tumorbildung sowie zur Abstoßung von Xenotransplantaten beitragen (Samraj et al. 2015). KDN wurde auch in einer erhöhten Konzentration in einer Reihe humaner Malignitäten, wie z.B. Eierstock-, Hals-, Brust- und Lungenkrebs, sowie Gebärmutter- und Leberkrebs nachgewiesen (Ji et al. 2017). Der Einsatz von Sialinsäuren, als Biomarker für einige Krebsarten, ist aufgrund der genannten Aspekte ein wichtiger Ansatz der heutigen Forschung (Kitajima et al. 2015). Laut Pasek et al. ist ein erneutes Auftreten von Krebszellen und Metastasen, durch die Analyse von Sialinsäuren, zeitlich früher erkennbar als klinische oder radiologische Diagnostik (Passek et al. 2021).

Aufgrund ihrer negativen Ladung und ihrer terminalen Position üben Sialinsäuren viele wichtige biologische Funktionen aus, die von der Embryogenese über die neuronale Plastizität bis hin zu den Interaktionen mit Krankheitserregern reichen (Castilho 2015). Sie vermitteln u.a. Zell-Zell-Wechselwirkungen (Ghosh 2020), Zellproliferation und -differenzierung (Ji et al. 2017) und nehmen eine entscheidende Rolle in der Immunologie, Tumorwachstum und Metastasierung sowie in der Reproduktions- und in der Neurobiologie (Huang et al. 2014) ein. Durch die Regulierung der Sekundär- und Tertiärstruktur von Glykoproteinen üben sie einen positiven Einfluss auf die Halbwertszeit von Glykoproteinen im Blut aus (Nie et al. 2012). Zudem beeinflussen Sialinsäuren die Stabilität und die Funktionen von Hormonen und Enzymen, wie beispielweise das follikelstimulierende Hormon (FSH) und das humane Choriongonadotropin (hCG) (Ghosh 2020).

Die besondere Stellung der Sialinsäure nimmt im Bereich der heutigen Schulmedizin zunehmend eine relevante Rolle ein. Es ist bereits bekannt, dass eine Entfernung der Sialinsäuren von Erythrozyten zur Verkürzung ihrer Lebensdauer, von ursprünglich etwa 120 Tagen, auf nur wenige Stunden führen kann (Schauer und Kamerling 2018). Im Fachbereich der Kardiologie konnte nachgewiesen werden, dass Sialinsäure an der Pathogenese von koronare Herzerkrankungen beteiligt ist (Zhang et al. 2018). Die Studien

von Li et al. zeigen eine relevante Korrelation zwischen der Konzentration von Neu5Ac im Serum und dem Ausmaß von Koronarläsionen bei Herzinfarkt auf (Li et al. 2020). In diesem Zusammenhang wird auch ein erhöhtes Plasmaspiegel mit Vorhofflimmern assoziiert (Hu et al. 2020). Sialinsäuren dienen als Rezeptormolekül für die Bindung u.a. von Influenza A und C, Clostridium botulinum sowie Helicobacter pylori an die menschliche Zelle (Rossmann und Rao 2012). Die jüngsten Studien um Schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus Typ 2 (engl. SARS-CoV-2), zeigen zudem, dass eine erhöhte Sialinsäurekonzentration mit gastrointestinalen Komplikationen bei SARS-CoV-2-Infektion einhergehen (Haroun et al. 2022) (Engin et al. 2020). Aktuell wird die Rolle der Sialinsäure, als Rezeptoren für das SARS-CoV-2 und mögliche Ansatzpunkte für Therapiemaßnahmen erforscht (Tortorici et al. 2019).

1.1.2 Polysialinsäure

Sialinsäuren können im Gegensatz zu vielen anderen Zuckern eine homopolymere Struktur an Glykoproteinen bilden, welche einerseits zu ihrer strukturellen Diversität beiträgt und darüber hinaus weitere Funktionen im Organismus beeinflusst (Janas und Janas 2011). Im Jahr 1957 gelang es Guy Barry und Walther Goebel zum ersten Mal Polysialinsäuren (PolySia) auf der Kapseloberfläche von *Escherichia coli* (*E. coli*) nachzuweisen (Barry 1958). Die Entdeckung der Polysialinsäuren auf Zelloberflächen von Wirbeltieren erfolgte etwa 20 Jahre später durch Innoue und Iwasaki (Tiralongo und Martinez-Duncker 2013). Aufgrund der Anzahl der vorliegenden N-Acetylneuraminsäure-Einheiten werden Polysialinsäuren grundsätzlich in Di- (2); Oligo- (3-7) und Polysialinsäuren (größer als 8 Monomereinheiten) eingeteilt (Jakobsson et al. 2015) (Sato und Kitajima 2013a). Nach aktuellem Kenntnisstand tragen sowohl die Anzahl einzelner Monomere als auch ihre chemischen Verknüpfungen untereinander, als entscheidende Faktoren für das jeweilige Vorkommen und deren Funktionen bei. So wurde im Fall der Seeigelspermien nachgewiesen, dass während α 2,9-gebundene Polysialinsäuren die Beweglichkeit der Spermien beeinflusst, die α 2,5-Oglycolyl-gebundenen Polysialinsäuren hingegen die Akrosom-Reaktion steigern können (Galuska et al. 2012) (Castilho 2015). Bisher wurden α 2,4-Verknüpfungen, α 2,8-Verknüpfungen, α 2,9-Verknüpfungen, abwechselnd α 2,8/ α 2,9-Verknüpfungen und α 2,5-Oglycolyl-Verknüpfungen beschrieben (Galuska et al. 2012). Bei Menschen werden keine PolySia-Ketten durch die Sialinsäuren, Neu5Gc und KDN, gebildet (Wang 2012).

1.1.3 Extrazelluläre neutrophile Fallen

Neutrophile Granulozyten wurden erstmals von Elie Metchnikoff entdeckt (Segal 2005) und sind terminal differenzierte Zellen mit einer kurzen Lebensdauer. Sie gehören zu der ersten Verteidigungslinie gegen eindringende Krankheitserreger (Döring et al. 2017) und werden als erste Immunzellen aus dem Blutkreislauf an einem Entzündungsort rekrutiert (Ma und Kubes 2008). Die Bekämpfung der eindringenden Pathogene wird u.a. durch das Freisetzen von antimikrobiellen und lytischen Enzymen sowie durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und Phagozytose ermöglicht (Saffarzadeh et al. 2012). Ein weiterer Mechanismus der Neutrophilen-Wirkung ist die Bildung von NET (Zawrotniak und Rapala-Kozik 2013). Der Prozess der NET-Bildung wird als NETosis bezeichnet (Döring et al. 2017) und ist bereits bei Fischen beschrieben worden (Zlatina et al. 2018). NETs werden gewöhnlich durch den Zelltod freigesetzt und können durch Entzündungsreize wie Interleukin-8; Lipopolysaccharid oder Phorbolmyristataacetat stimuliert werden (Saffarzadeh et al. 2012). Hierbei kommt es infolge des Zusammenbruchs des Zellkerns zum Vermischen von Kern und Zytoplasma und schließlich zur Freisetzung der Strukturen, durch das Reißen der Plasmamembran (Fuchs et al. 2007). NETosis unterscheidet sich morphologisch von anderen klassischen Zelltodprozessen wie z.B. Apoptose und Nekrose (Köckritz-Blickwede und Nizet 2009). NETs bestehen neben der Desoxyribonukleinsäure (DNA) auch aus einer großen Gruppe von Histonproteinen wie H1, H2A, H2B, H3 und H4, die etwa 70% aller mit NET verbundenen Proteine ausmachen (Zuo et al. 2020) (Dąbrowska et al. 2016). Diese erleichtern die Adhäsion von mikrobiellen und viralen Pathogenen (Döring et al. 2017) und können bakterizide Aktivitäten ausüben (Brinkmann und Zychlinsky 2012). Ein Mol Histone tötet 100-mal mehr Bakterien als andere antimikrobielle Substanzen, wie z.B. Defensine (Brinkmann und Zychlinsky 2012). Aufgrund der Eigenschaft, Bakterien binden und töten zu können, werden NETs als ein wichtiges Element des angeborenen Immunsystems angesehen (Masuda et al. 2016). Darüber hinaus üben NET einen bedeutenden Einfluss auf die Gerinnung aus und können Entzündungsreaktionen positiv beeinflussen (Grasso et al. 2018). Unabhängig ihrer antimikrobiellen Funktion, sind sie auch an vielen nichtinfektiösen Krankheiten, Autoimmun- und Entzündungsreaktionen beteiligt, darunter chronische Lungenerkrankungen, Sepsis (Huang et al. 2022) und vaskuläre Erkrankungen (Zawrotniak und Rapala-Kozik 2013) (Hong et al. 2022). Aus der Arbeit von Charles T. Esmon geht hervor, dass ein Histongemisch, insbesondere H3 und H4, für Endothelzellen toxisch ist und das Aktivierte-Protein-C eine positive Wirkung auf die Reduktion der Zytotoxizität ausüben kann (Xu et al. 2009). Galuska et al. konnten nachweisen, dass sich Polysialinsäuren in kettenlängenabhängiger Weise (mehr als 20 Sialinsäureresten) an Histone binden und deren Zytotoxizität eindämmen können (Galuska et al. 2017a).

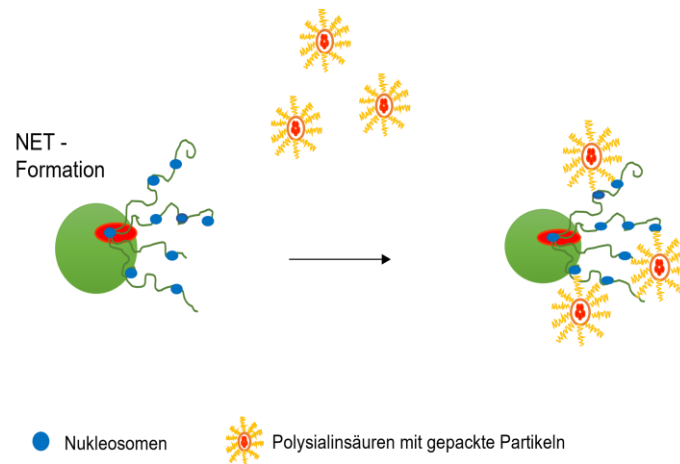


Abbildung 4: Auswirkung der Polysialinsäuren auf NET

Die abgebildete Darstellung zeigt die Anknüpfung von polysialierten Partikel an die Nukleosomen der NET-Formation (= Komplex aus DNA und Histonen). Eigendarstellung, angelehnt an Galuska et al. (Galuska et al. 2017a).

1.1.4 Polysialyltransferasen

Polysialinsäuren werden in Säugetieren durch die zwei Sialyltransferasen: ST8SialI und ST8SialIV katalysiert (Janas und Janas 2011). Als Typ II Transmembranproteine bilden diese eine Unterfamilie der Glykosyltransferasen und gehören zur GT29-Familie (Chen und Varki 2010). Diese umfasst aktuell 20 Sialyltransferasen (Harduin-Lepers et al. 2001) und wird anhand des Akzeptormoleküls in vier Kategorien eingeteilt (Schnaar et al. 2014): ST3-Gal; ST6-Gal; ST6GalNAc und ST8Sia (Schauer und Kamerling 2018). Im Vergleich zu anderen Glykosyltransferasearten zeichnen sich diese durch eine hohe Akzeptorspezifität aus (Rollenhagen et al. 2013). Diese Eigenschaft weisen auch einzelne Enzyme derselben Gruppe auf (Li und Chen 2012).

Die Transmembranproteine des Typ II bestehen grundsätzlich aus einem im Zytoplasma und einem im Lumen des Golgi-Apparat liegenden Anteil. Ersteres besteht aus einer kurzen zytosolischen Domäne und wird über eine Transmembrandomäne mit der im Lumen liegenden Stammregion verbunden. Die Stammregion variiert in der Länge entsprechend der Anzahl der Aminosäuren und trägt die Carboxylgruppe als katalytischen Anteil (Abbildung 5) (Li und Chen 2012) (Wang 2009). Im Gegensatz dazu ist der im Zytoplasma liegende Aminoanteil an der Enzymaktivität nicht direkt beteiligt (Harduin-Lepers et al. 2001). Die Forschungsgruppe von Angata et al. konnte zeigen, dass beide Enzyme, bevorzugt an der sechsten N-Glykosylierungsstelle von NCAM binden. Außerdem wurde festgestellt, dass ST8SialII – im Gegensatz zu ST8Sia-IV – an der fünften N-Glykosylierungsstelle, effizienter katalysiert (Angata et al. 1998). ST8SialII und ST8Sia IV zeichnen

sich u.a. durch die Bildung von α 2,8-gebundenen Sialylketten aus (Bhide und Colley 2017) und weisen auf Ebene der Aminosäuresequenz eine 59-prozentige Homologie zueinander auf (Angata et al. 1998) (Nakata und Troy 2005b). Sie können sowohl eigenständig als auch in Zusammenarbeit Polysialinsäuren synthetisieren (Nakata und Troy 2005b). Ferner sind diese in der Lage sich selbst zu polysialisieren (Galuska et al. 2017b). Ihre Bildung weist, während der postnatalen Entwicklung, eine Zeit- und gewebespezifische Divergenz auf (Wang 2009) (Galuska et al. 2008). So ist die Expression von ST8SialI in embryonalen und perinatalen Stadien am höchsten (Al-Saraireh et al. 2013) und bleibt, im Vergleich zu ST8SialIV -Enzymen, während der postnatalen Phase, im niedrigeren Niveau stabil (Curto et al. 2019).

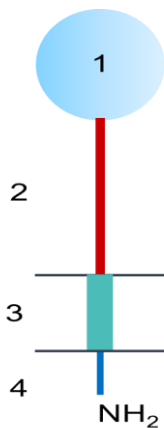


Abbildung 5: Strukturelle Aufbau der Transmembranproteine vom Typ II

Sialyltransferasen sind Membranproteine vom Typ II mit kurzen Aminoterminalen (-NH₂) zytoplasmatischen Schwänzen (4). Dieser wird mit einer kurzen Transmembran-Region (3) mit der Stammregion (2) verbunden. Die katalytische Domäne (1) ist dem Golgi-Lumen zugewandt und an der Stammregion gebunden. Eigendarstellung, angelehnt an Bhide et al. (Bhide und Colley 2017).

1.2 Methoden zur Detektion von Sialin- und Polysialinsäuren

In den letzten Jahrzehnten wurden bereits verschiedene Strategien zur Analyse von Sialin- und Polysialinsäuren entwickelt und weiter optimiert. Technologischer Fortschritt und neueste wissenschaftliche Erkenntnisse der Biochemie sind für die Identifizierung und Quantifizierung von Sialinsäuren von besonderer Bedeutung. Grundsätzlich können Sialinsäuren sowohl durch eine vorherige Trennung der Glykokonjugate, als auch ungetrennt analysiert werden (Spichtig et al. 2010). Die jeweiligen Vor- und Nachteile dieser Vorgehensweise werden im Verlauf des aktuellen Kapitels thematisiert. So sind derzeit für die Quantifizierung von Sialinsäuren folgende Testverfahren bekannt: Die kolorimetrische und fluorometrische Methode sowie enzymatische und chromatographisch/massenspektrometrische Verfahren (Cheeseman et al. 2021). Unter diesen Methoden werden die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und Massenspektrometrie (MS) am häufigsten angewandt (Zhou et al. 2020).

1.2.1 Bestimmung von Sialinsäuren

Die kolorimetrischen Testverfahren umfassen u.a. die Thiobarbitursäure (TBA) und Diphenolreaktion, welche als Erste für die Bestimmung von Sialinsäuren eingesetzt wurden (Kitajima et al. 2015). Hierzu wird in der Diphenolreaktion unter Verwendung von Orcinol und Eisen (III)-Ionen oder Resorcin und Kupfer (II)-Ionen Sialinsäure reagiert und der resultierende Chromophor (Farbstoff) spektrophotometrisch gemessen (M. Crook 1993). Die Resorcin Methode wurde von Svennerholm entwickelt (M. Crook et al. 1993) und ist für die Quantifizierung von KDN nicht geeignet. Im Gegensatz dazu können Neu5Ac und Neu5Gc, sowohl in gebundener als auch in ungebundener Form, nachgewiesen werden (Kitajima et al. 2015).

Das Periodsäure/Thiobarbitursäure-Verfahren wurde im Jahr 1959, etwa zur selben Zeit von Warren und Aminoff, unabhängig voneinander beschrieben (Schauer und Kamerling 2018) (Aminoff 1961). Es ermöglicht die Bestimmung von KDN, sowohl in freier als auch in gebundener Form, während die Neu5Ac und Neu5Gc nur in freier Form analysiert werden können (Kitajima et al. 2015). Dieses Verfahren ist durch seine hohe Spezifität und der hohen Reproduktionseigenschaft gekennzeichnet (Warren 1959) (Schauer und Kamerling 2018). In dieser findet eine Oxidation der Hydroxylgruppen an den Positionen der C7, C8 und C9 der Sialinsäure statt (Matsuno und Suzuki 2008). Die hierdurch gebildete Aldehydgruppe am C7-Körper wird anschließend mit TBA markiert und anschließend gemessen (Tiralongo und Martinez-Duncker 2013). Der Oxidationsprozess ist ein entscheidender Schritt in diesem Verfahren und setzt eine unveränderte Hydroxylgruppe voraus.

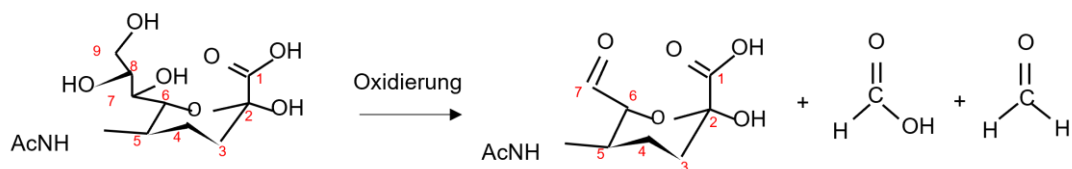


Abbildung 6: Oxidierung von Neu5Ac

Die Oxidation von Neu5Ac (in Sesselform dargestellt) führt zur Bildung von C7(Neu5Ac), Ameisensäure (CH_2O_2) und Formaldehyd (CH_2O) (in Valenzstrichformel). Eigendarstellung, angelehnt an J. Tiralongo et al. (Joe Tiralongo und Ivan Martinez-Duncker 2013).

Sowohl die kolorimetrische als auch die fluorometrische Methode sind durch ihre einfache Handhabung positiv gekennzeichnet. Letzteres ist etwa 500-mal empfindlicher als das kolorimetrische Verfahren, benötigt hingegen eine längere Analysezeit (Cheeseman

et al. 2021). Laut Galuska et al. lassen sich die Nachteile der beschriebenen kolorimetrischen Verfahren gegenüber Fluoreszenz basierenden Strategien wie folgt zusammenfassen:

1. Die Reaktionen sind nicht spezifisch für Sialinsäuren, weshalb unter Umständen ein Reinigungsschritt notwendig ist, um Messfehler zu vermeiden.
2. Modifikationen von Neuraminsäuren beeinflussen meist die chemische Reaktion.
3. Analyse erlaubt oft keine Unterscheidung zwischen verschiedenen Sialinsäuren.

Diese Nachteile können durch eine vorherige chromatographische Fraktionierung des Sia-Pools verringert werden (Tiralongo und Martinez-Duncker 2013).

1.2.2 Detektion und Quantifizierung von Oligo-/Polysialinsäuren

Für die Bestimmung von Oligo-/Polysialinsäuren stehen verschiedene Techniken, wie z.B. die Methylierungsanalyse, Kernspinresonanzspektroskopie (Sato und Kitajima 2019), Mildsäurehydrolyse kombiniert mit Dünnschichtchromatographie, fluorometrische C7/C9-Analyse sowie das Western Blotting mit spezifischen Antikörpern und Enzymen, zur Verfügung. Laut Galuska et al. können nur die DMB/HPLC-FD-Analyse, die fluorometrische C7/C9-Detektion und das Western Blotting auf kleine Mengen, das heißt weniger als 1 µg von Poly- oder Oligosialinsäuren aus biologischem Material, angewendet werden (Galuska et al. 2007). Mit Ausnahme des Western Blottings, werden für das Analyseverfahren grundsätzlich auf chromatographische Trenntechniken basierend auf der vorhergehenden Freisetzung von Sialinsäuren, von den jeweiligen Glykokonjugaten benötigt (Hurum und Rohrer 2012). Hierfür wird entweder eine enzymatische- oder saure Hydrolyse verwendet (Spichtig et al. 2010). Es ist hierbei hervorzuheben, dass die enzymatische Spaltung aufgrund ihrer hohen Spaltungsspezifität eingeschränkt ist (Hurum und Rohrer 2012) und selbst bei optimalen Reaktionsbedingungen zu einer Freisetzung von etwa 70 % der Sialinsäuren neigt (Shuuji Hara et al. 1987). Die Analyse von Sialinsäuren mit einschließlich der Derivatisierung von 1,2-Diamino-4,5-Methylendioxybenzol (DMB) und chromatischer Trennung mittels HPLC gehört seit ihrer Beschreibung im Jahr 1987, durch die Gruppe von Masaru Nakamura, zu den wichtigsten Analyseverfahren von Sialinsäuren. DMB reagiert spezifisch mit α -Ketosäuren und kann hierdurch nicht nur Sialinsäuren, sondern auch typische α -Ketosäuren wie Pyruvat und α -Ketoglutarat nachweisen, weshalb eine chromatographische Trennung notwendig ist (Kitajima et al. 2015). Hinsichtlich der oben beschriebenen Derivatisierung von α -Ketosäuren zeichnet sich diese durch eine hohe Reaktivität, Selektivität und Sensitivität aus (Nakamura et al. 1987). Eine besondere Anwendung der Polysialinsäureanalyse mittels DMB-Markierung ist die sogenannte fluorometrische C7/C9-Methode nach Sato. Durch eine Oxidationsreaktion erfolgt eine Umwandlung der terminalen C9-Sialinmoleküle zu einem C7-Körper.

Die internen $\alpha,2,8$ -Verknüpfungen sind aufgrund fehlender Hydroxylgruppen von der Oxidationsreaktion nicht betroffen (Sato und Kitajima 2019). Die molekularen Verhältnisse der einzelnen C7 und C9 Körper werden nach der Hydrolyse und DMB-Markierung interpretiert (Simon et al. 2013).

1.3 Chromatographie

Die Chromatographie wurde erstmals 1903 von dem russischen Botaniker Michael Tswett beschrieben und setzt sich aus den griechischen Wörtern "chromos" (Farben) und "graphien" (schreiben) zusammen (LoBrutto und Kazakevich 2007). Ihre praktische Anwendung findet sich sowohl in der präparativen als auch der analytischen Anwendung wieder, wie z.B. der Trennung, Identifizierung oder der Bestimmung von Komponenten einer Mischung. Die präparative Chromatographie ist besonders für die pharmazeutischen Industrie von Relevanz (Harris et al. 2014). Die Chromatographie wird heutzutage in verschiedenen Klassen eingeteilt. Eine entsprechende Klassifizierung kann sowohl durch die Eigenschaften der stationären oder mobilen Phase des Trennungsprozesses, als auch nach der jeweiligen Arbeitstechnik erfolgen (Reich und Schibli 2007). So kann z.B. die mobile Phase ein Gas, eine Flüssigkeit oder ein überkritisches Fluid sein, während die stationäre Phase entweder ein Feststoff oder in Form einer Flüssigkeit vorkommt (Skoog et al. 2018). Nach einem wichtigem Grundsatz sind die stationäre und die mobile Phase in keinem System miteinander mischbar (aprentas 2017). Die Flüssigchromatographie wird in Flachbettverfahren und in Säulenchromatographie unterteilt (Gey 2015).

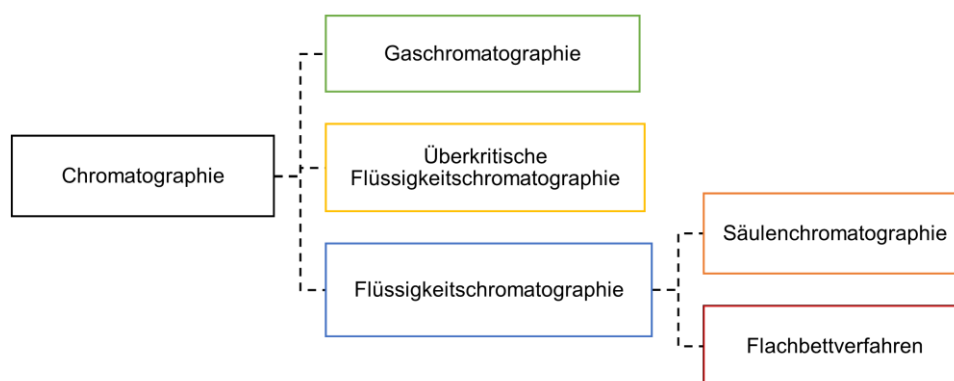


Abbildung 7: Einteilung der Chromatographie nach Aggregatzustand

Einteilung nach Aggregatzustand der mobilen Phase. Dabei wird zwischen flüssig, gasförmig und überkritisches Fluid unterschieden. Des Weiteren ist die grobe Einteilung der Flüssigkeitschromatographie in ein Säulen- und Flachbettverfahren dargestellt.

1.3.1 Der Trennungsprozess

Die chromatische Trennung setzt sich aus einer stationären und einer mobilen Phase zusammen. Im Rahmen des Trennprozesses bewegt sich die mobile über die stationäre Phase und es kommt zu einer Retention der zur analysierenden Stoffe (Ettre 1993). Die Verteilung der Proben zwischen den einzelnen Phasen, wird durch deren Affinität für die jeweilige Phase erzeugt und ist u.a. beeinflussbar durch Faktoren wie Temperatur sowie der chemischen Verbindung (Christian et al. 2014).

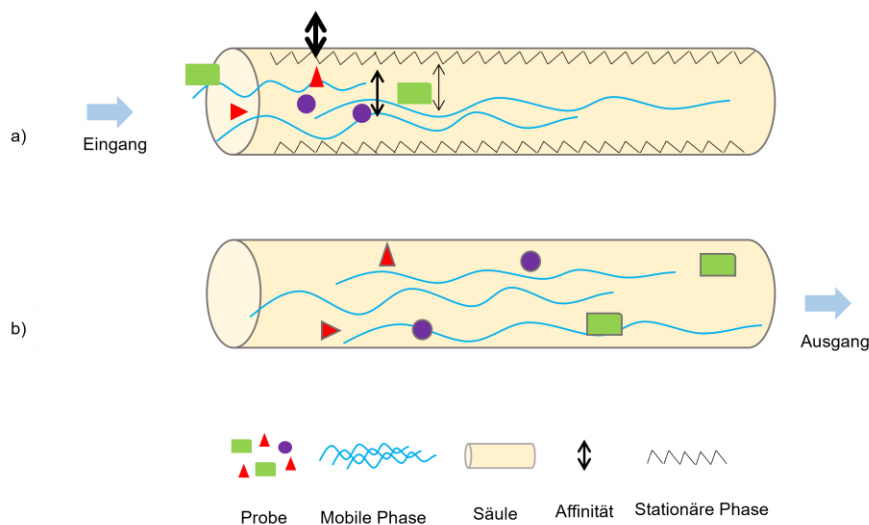


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer chromatographischen Trennung

a) die Probe wird mit Hilfe der mobilen Phase (hier in flüssiger Form dargestellt) über die Oberfläche der stationären Phase fortbewegt. In Abhängigkeit der jeweiligen Wechselkraft, zwischen den Probekomponenten und der stationären Phase, kommt es zur unterschiedlichen Verteilungsmuster der Komponenten. b) Probeteilchen mit niedriger Affinität verlassen die stationäre Phase zuerst, was zur unterschiedlichen und zugleich typischen Retentionszeiten der einzelnen Komponenten beiträgt. Eigendarstellung, angelehnt an das Buch Laborpraxis Band 3 (aprentas 2017).

1.3.2 Das Chromatogramm

Das Resultat einer chromatographischen Trennung wird als Chromatogramm bezeichnet. Es ist eine Darstellung der temporären Veränderung des zu analysierenden Stoffes, welche die stationäre Phase verlässt und mit einem Detektor, in Form von Peaks, aufgezeichnet wird (Rouessac und Rouessac 2007). Dabei wird auf der x-Achse die Elutionszeit und auf der y-Achse die Größe des Detektorsignals dargestellt (Lundanes et al. 2014b). Hieraus können sowohl qualitative als auch quantitative Feststellungen abgeleitet werden. Die jeweiligen Trennungszeiten der Probe, auch Retentionszeiten genannt,

werden als ein qualitatives Merkmal interpretiert. Als ein quantitatives Maß und zur Ermittlung der Mengen der einzelnen Komponenten werden die Signalfächen unter den jeweiligen Peaks hinzugezogen (Skoog et al. 2018) (Gey 2015).

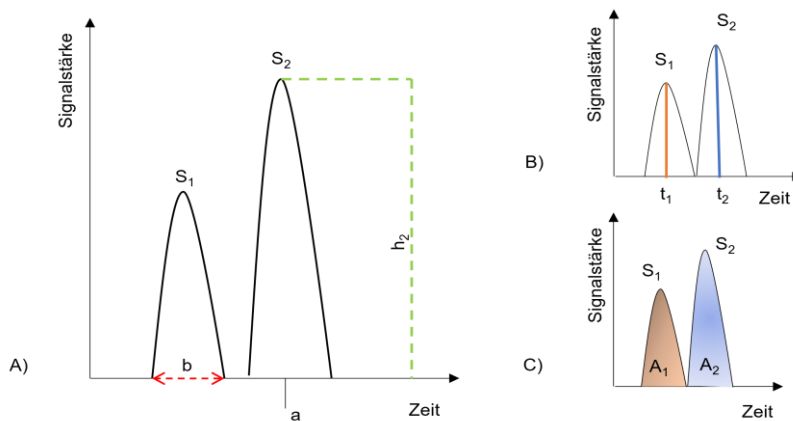


Abbildung 9: Darstellung eines Chromatogramms

A) Auf der x-Achse ist die Zeit und auf der y-Achse das Signal dargestellt. S_1 und S_2 stehen für jeweiligen Signale bzw. Peaks. Die Höhe (h) der Peaks wird von der Basislinie (a) bis zur maximalen Ausprägung in der y-Achse festgelegt. Die Breite der Signale wird an den Schnittpunkten der Basislinie errechnet. In Abbildung B) ist eine qualitative und in Abbildung C) eine quantitative Methode abgebildet. Eigendarstellung, angelehnt an (Gey 2015).

1.4 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurde in den 1970er Jahren aus der offenen Säulenchromatographie entwickelt (Kaltenböck 2008) und ist heute die am häufigsten eingesetzte Variante der Flüssigkeitschromatographie (Kazakevich und LoBrutto 2007). Zu den Wegbereitern der HPLC gehören u.a. Giddings, Snyder, Knox, Engelhardt und Unger (Gey 2015). Die Grundidee des Trennungsprozesses basiert auf der Dünnschichtchromatographie. Im Vergleich hierzu findet die Trennung der Analyten in sogenannten Säulen statt. In der Hochflüssigkeitschromatographie wird die zu analysierende Probe bei einem erhöhten Druck durch die Säule bewegt (Moldoveanu und David 2013). In der modernen HPLC stehen Säulen mit einem Partikeldurchmesser von 1,5 bis 2 μm Durchmesser sowie Pumpen mit Drucke von bis zu 1.000 bar zur Verfügung. Durch die Kombination von hohem Druck und kleinen Säulenpartikeln werden zugleich eine hohe Auflösung und eine verkürzte Analysezeit erzielt (Harris et al. 2014). Der Anwendungsbereich weist ein breites Spektrum auf und bedient organische sowie anorganische Ionen bis hin zu großen Biomolekülen. Sie sind aufgrund ihrer Eigenschaften in der Pharma-

und Lebensmittelindustrie die vorherrschende Analysetechnik (Corradini 2011). In Abhängigkeit der Lokalisation der Eluentenmischung wird zwischen einem Hoch- und Niederdrucksystem differenziert. In dem Niederdrucksystem findet die Eluentenmischung vor der Pumpe statt (Lundanes et al. 2014b), während dieser beim Hochdrucksystem erst nach der Pumpe erfolgt (Meyer 2010). Letzteres ist insbesondere durch seine präzise Leistung in verschiedenen Flussraten gekennzeichnet (Röpke 2014). Im Gegensatz dazu ist das Niederdrucksystem kostengünstiger und einfacher zu bedienen (Dong 2019).

1.4.1 Aufbau einer HPLC-Anlage

Die Anlage einer Hochflüssigkeitschromatographie setzt sich zumeist aus einem Vorratsgefäß, einer Pumpe, einem Injektor, einer Säule, einem Detektor und einem Datenerfassungsgerät zusammen. Dabei können die einzelnen Bausteine je nach Modell der HPLC-Anlage und System, sowohl in ihrer Anzahl als auch in der Zusammensetzung Unterschiede aufweisen. Ferner können diese durch die weitere Ausstattung wie Säulenofen und Entgaser modifiziert werden (Harris et al. 2014).

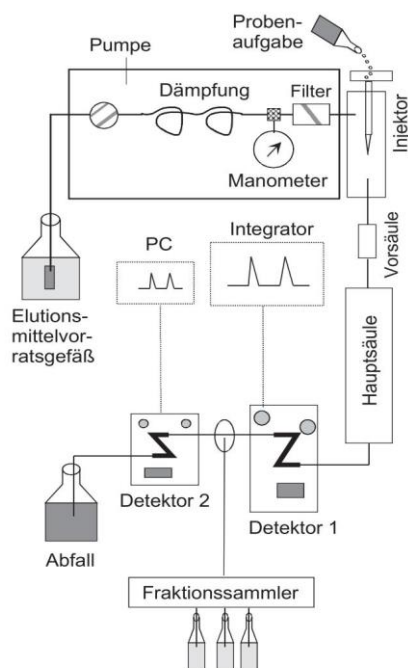


Abbildung 10: Klassische Zusammensetzung einer HPLC-Anlage

Abbildung aus (Gey 2015) mit Genehmigung vom Verlag.

Pumpe

In der HPLC-Anwendung werden zur Förderung des Elutionsmittel Kurzhub-Kolbenpumpen sowie Membran- und Spritzenpumpen verwendet (Gey 2015). Die Erstere zeichnet sich durch eine hundertprozentige Förderung der mobilen Phase aus und wird zumeist angewandt (Röpke 2014). Eine wichtige Anforderung an eine HPLC Pumpe besteht darin, dass sie den Eluenten präzise, konstant und pulsationsarm fördern soll (aprentas 2017). Um einen schnellen Eluentenwechsel zu ermöglichen und einen präzisen Gradienten aufzubauen, ist ein kleines Innenvolumen der Pumpe entscheidend. Zudem sollte das Material der Flusslinien mit verschiedenen Arten von Lösungsmitteln verträglich sein (Hanai 1999). Eine HPLC-Pumpe arbeitet gewöhnlich bei 200 bis 400 bar und liefert Flüsse von bis zu 10 mL/min.

Säule

Die Säule ist das Herzstück einer HPLC-Anlage und wurde seit ihrer Entwicklung im Jahr 1960 stark verändert (Snyder 2010). Sie kann aus Edelstahl, Titan, Polymeren aber auch aus druckverfestigtem Glas bestehen (Gey 2015). Aufgrund ihrer Eigenschaften werden Säulen in unterschiedliche Kategorien eingeteilt (Dong 2019). Die Lebensdauer wird durch die Zusammensetzung der mobilen Phase beeinflusst und beträgt etwa 500 bis 2000 Injektionen (Dong 2019). Um die Säule vor großen Schädigungen zu schützen, befindet sich zumeist eine kurze Schutzsäule vor dem Eingang der Hauptsäule (Harris et al. 2014) (Abbildung 13). Die herkömmlichen HPLC-Säulen sind durchgängig porös, haben eine Länge von 3 bis 160 Zentimeter (cm) und weisen eine Partikelgröße von 1,5 auf 5 μm (Lundanes et al. 2014b)(Snyder 2010). Während im präparativen Einsatz kurze und breite Trennsäulen verwendet werden, werden für Größentrennung lange und dünne Säulen angewandt. Dabei sind Kriterien wie Trennungsweg und Trennfläche für die jeweilige Analyse entscheidend (Marvin C. McMaster 2007). Die HPLC-Säulen können durch ihre Eigenschaften die Trennleistung wesentlich beeinflussen (Vreeker und Wuhrer 2017). So wird im Falle der porösen Träger eine große Oberfläche erzeugt und somit die Wechselwirkung der mobilen und der stationären Phase wesentlich beeinflusst (Dong 2019). Für eine optimale chromatographische Trennung wird in der heutigen HPLC-Säule sowohl ein hoher Druck- als auch pH-Stabilität gefordert (aprentas 2017).

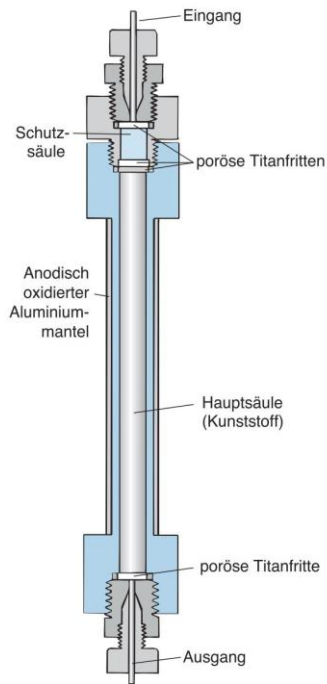


Abbildung 11: Schematische Darstellung einer HPLC-Säule

Die Zusammensetzung der Materialien sowie die Länge einer HPLC-Säule kann sich je nach Anwendungsgebiet unterscheiden. Teilweise ist der Hauptsäule eine Schutzsäule beim Eingang vorgesetzt. Abbildung aus (Harris et al. 2014); mit Genehmigung vom Verlag.

Injektor

Die Zugabe der Probe in die Probeschleife stellt eine der wichtigsten Schritte des Trennprozesses dar und kann sowohl manuell, mit einer Spritze, einem automatischen Injektionssystem als auch mit einem Septuminjektor erfolgen (Meyer 2010). Das Letztere wird heutzutage selten eingesetzt (Gey 2015). Als Einspritzventil wird meist ein Sechswegventil mit einem variablen Loop verwendet (Christian et al. 2014).

Detektor

Der Detektor ist der Säule nachgeschaltet und misst die Konzentration der eluierenden Analyten (Dong 2019). Je nach Messprinzipien und Anforderungen werden in der HPLC verschiedene Detektoren wie z.B. Fluoreszenz, UV-VIS Spektroskopie, Elektrochemie und Massenspektroskopie eingesetzt (aprentas 2017). Die Wahl des Detektors ist oft entscheidend für den Erfolg einer bestimmten HPLC-Methode (Ardrey 2003). Der Fluoreszenzdetektor zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit und Selektivität aus (Dong 2019). Zudem kann es für eine Gradientenelution angewandt werden (Snyder 2010) und ist bis zu 1000-mal empfindlicher als UV-Detektoren (Meyer 2010). Fluoreszenzdetektoren können aufgrund ihrer Eigenschaften nur für die Messung der fluoreszierenden Analyten eingesetzt werden. Als Alternative ist eine vorherige Derivatisierung der Proben notwendig (Röpke 2014).

1.4.2 Trägermaterial und Trennmechanismen

Siliziumdioxid ist das am häufigsten benutzte Adsorptionsmaterial und dient u.a. der Trennung von Positionsisomeren (Kazakevich und LoBrutto 2007). Es ist ein amorpher, polarer Feststoff mit freien Hydroxylgruppen an der Oberfläche und wird als Normalphase bezeichnet (aprentas 2017). Aufgrund ihrer Adsorptionskräfte, hierzu zählen u.a. Säure-Base- sowie Dispersionswechselwirkungen, sind sie besonders für die Retention von Aminogruppen und polaren Funktionen geeignet. Im Vergleich hierzu ist die Trennung von unpolaren Stoffen nur bedingt möglich (Lundanes et al. 2014b). In Anbetracht dessen werden Adsorptionssäulen meist mit unpolaren Flüssigkeiten eluiert und kommen außer in der Kohlenwasserstoff-Analytik relativ selten zum Einsatz (Gey 2015).

Die Kieselgele sind für die Gradientenelution und im basischen Milieu, pH oberhalb von acht, nicht verwendbar (Lundanes et al. 2014b) (Harris et al. 2014). Nichtsdestotrotz sind sie aufgrund ihrer mechanischen Stabilität, der veränderbaren Oberflächenstruktur und der hohen Leistungsfähigkeit als dominierendes Trägermaterial für die Chromatographie anzusehen (Kazakevich und LoBrutto 2007) (Dong 2019).

Die Umkehrphase (engl. *Reversed Phase*) wird durch die Derivatisierung von Kieselgeloberfläche mit Kohlenwasserstoffresten gebildet (aprentas 2017). Es ist die am häufigsten eingesetzte stationäre Phase, dabei stellen mit Octadecyl-Resten (C18) modifiziertes Kieselgel die wichtigste Umkehrphase dar. Die langen Kohlenwasserstoffketten führen zu einem hydrophoben Charakter der stationären Phase und hydrophobe Moleküle die mit der stationären Phase interagieren, werden mit der apolaren mobilen Phase eluiert (Gey 2015). Laut Frau Marie-Isabel Aguilar ist es aufgrund ihrer exzellenten Auflösung, der experimentellen Leichtigkeit, der hohen Produktivität und der hervorragenden Reproduzierbarkeit, für die Analyse von Peptiden und Proteinen gut geeignet (Aguilar 2003). Ferner findet das Kieselgel eine breite Anwendung in der Analyse von Umweltprouen, Arzneimitteln und zahlreichen biologischen sowie organischen Produkten (Moldoveanu und David 2017).

Je nach Analyseverfahren werden in der Flüssigkeitschromatographie verschiedene Trennmechanismen unterschieden. Die Einteilung erfolgt, aufgrund der physikalisch-chemischen Effekte, zwischen der mobilen und der stationären Phase und ermöglicht eine optimale Analyse der Proben. In der Chromatographie werden beispielweise zwischen Adsorptions-; Affinitäts-; Verteilungs- sowie Ionenaustausch- und Ionenaustauschchromatographie unterschieden. Im Rahmen eines Trennungsprozesses können verschiedene Trennmechanismen nebeneinander vorkommen und sich gegenseitig beeinflussen. Unter Berücksichtigung der Zielsetzung dieser Arbeit wird im Folgenden auf die Anionenaustauschchromatographie näher eingegangen.

Anionenaustauschchromatographie

Die Analyse von organischen und anorganischen Ionen wird in der Flüssigkeitschromatographie bevorzugt mittels Ionenaustauschchromatographie oder Ionenchromatographie durchgeführt (Gey 2015). Das Erstere ist ein hochselektives Verfahren und wird seit 1956 zur Analyse von Aminosäuren verwendet (Meyer 2010). Es kann ferner für die chromatographische Trennung von geladenen Molekülen, wie Peptiden oder Salzen, eingesetzt werden (aprentas 2017). Die Vorteile einer Ionenaustauschchromatographie zeichnen sich u.a. durch ein hohes Auflösungsvermögen und schnelle Separierungen aus (Aguilar 2003).

Die stationäre Phase der Ionenaustauschchromatographien enthält, im Vergleich zu den anderen Verfahren, eine elektrisch geladene Oberfläche. Diese sind entweder kovalent oder elektrostatisch an ein Gel oder Harz gebunden (Gey 2015) und enthalten beispielweise Carboxyl- oder Aminogruppen. Je nach vorliegender Stoffgruppe werden saure und basische Gruppen unterschieden und durch ihre pH-Eigenschaften in stark und schwache Kategorien eingeteilt. Die starken Austauschere sind pH-Wert-unabhängig und kommen hauptsächlich in ionisierter Form vor. Die Schwachen wiederum ändern ihre Ladung je nach pH-Wert. Diese Eigenschaft spielt, insbesondere hinsichtlich der möglichen Deprotonierung der stationären Phase, eine entscheidende Rolle (Harris et al. 2014).

Die mobile Phase ist flüssig und enthält Gegenionen und Moleküle der stationären Phase. Der Trennprozess wird durch die Wechselwirkung der Probenpartikel mit den aktiven Zentren der stationären Phase erzeugt (Meyer 2010). Die Retentionszeit der Proben wird durch die Anziehung zwischen der in Lösung befindlichen Ionen und der geladenen Gruppen der stationären Phase beeinflusst (Lundanes et al. 2014a).

Die Einteilung in eine anionische und kationische Ionenaustauschchromatographie erfolgt nach Art der Moleküle, welche durch die stationäre Phase angezogen werden (Aguilar 2003). Die Anionenaustauschchromatographie enthält positive Ionenzentren der stationären Phase, während die kationische eine negative Ladung vorweist (Kazakevich und LoBrutto 2007). Erstere wird aufgrund der hohen Empfindlichkeit und Selektivität vorzugsweise für die Analyse von Kohlenhydraten verwendet (Snyder 2010) (Sato et al. 1999).

Tabelle 1: Einteilung der Ionenaustauscher

Eigendarstellung, angelehnt an Lundanes et al. (Elsa Lundanes et al. 2014).

Ionenaustauscher	Art	Grundlage	Funktionelle Gruppen	pH-Bereich
Anionen	Schwache	Kieselsäure, organisches Polymer	Tertiäre Aminogruppe -NR ₂	7-2
	Starke	organisches Polymer	Quartäre Aminogruppe -NR ₃ ⁺	10-1
Kationen	Schwache	Kieselsäure, organisches Polymer	Carboxylgruppe -COO-	6-9
	Starke	organisches Polymer	Sulfogruppe R-SO ₃	1-10

DMB/HPLC-FD-Analyse

Laut Galuska et al. eignet sich die DMB/HPLC-FD-Analyse zu Bestimmung von kleine Mengen an Polysialinsäuren gut (Galuska et al. 2007). Es kann sowohl für den Nachweis als auch für die Kettenlängenanalyse von Polysialinsäuren angewandt werden. Für die Untersuchung wird eine Fluoreszenzmarkierung mittels DMB, eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie sowie ein Fluoreszenzdetektor benötigt. Zudem ist laut Inoue et al. die DMB/HPLC-FD Analyse in der Trennung von PolySia nahezu 1000-mal empfindlicher als der Hochleistungs-Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) (Inoue und Inoue 2003). Die fluorometrische HPLC-Analyse erfolgt in drei folgenden Schritten: Zunächst wird die PolySia-Kette durch eine Hydrolyse von ihrer Glokonkonjugaten freigesetzt. Danach folgt eine Fluoreszenzmarkierung der freigesetzten PolySia-Ketten mit DMB. Schlussendlich werden die DMB-markierten Polysialinsäuren, mittels HPLC, getrennt und quantifiziert (Kitajima et al. 2015).

2. Zielsetzung

Die Expression von Sialinsäure ist in der Natur weit verbreitet und reicht von einigen Bakterienstämmen bis hin zu Säugern (Nicolaou et al. 2002). Der Sialinsäuregehalt des menschlichen Gehirns ist unter allen Organismen am höchsten und kann mit dem evolutionären Fortschritt eines Organismus in Verbindung gebracht werden (Ghosh 2020b). Auch Polymere aus Sialinsäuren spielen sowohl in physiologischen Prozessen als auch in bestimmten Pathologien eine relevante Rolle (Gerardy-Schahn et al. 2015). So können Sialinsäurepolymere z.B. in kettenlängenabhängiger Weise (mehr als 20 Sialinsäureresten) an Histone binden und deren Zytotoxizität eindämmen (Galuska et al. 2017a). Darüber hinaus wurde bereits gezeigt, dass Polysialinsäuren mindestens eine Kettenlänge von 12 benötigen, um sich mit dem Wachstumsfaktor Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) verbinden zu können (Kanato et al. 2008). Im Vergleich hierzu ist für die Bindung an den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Protein (FGF2) mindestens eine Neu5Ac Kettenlänge von 17 notwendig (Ono et al. 2012). Auch die Migration von Vorläuferzellen, aber auch Metastasen, kann durch den Polysialylierungsgrad beeinflusst werden.

Deshalb ist die Erforschung des Polysialylierungsstatus und insbesondere die Kettenlängenanalyse ein wichtiger Aspekt in unterschiedlichen Bereichen der aktuellen Wissenschaft. Bisher ist lediglich die beschriebene DMB/HPLC-FD-Strategie zur Kettenlängenanalyse von biologischen Proben robust anwendbar, um Aussagen über den Polymerisierungsgrad zu erzielen. Jedoch besteht bisher der besondere Nachteil darin, dass durch die chemische Markierung der PolySia-Ketten mit dem Fluorophor DMB interne Strangbrüche entstehen (Nakata und Troy 2005a) (Inoue und Inoue 2003). Als Folge hiervon ist eine tatsächliche Bestimmung der *in vivo* vorhandenen Sialinsäurekettenlängen nicht möglich.

Ziel dieser Arbeit ist es, Möglichkeiten zu schaffen, um die Polysialinsäurekettenlängenverteilung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie genauer als bisher zu charakterisieren. Indem man den Freisetzungsprozess der PolySia-Ketten und die internen Strangbrüche im Detail charakterisiert, soll die Basis geschaffen werden, um zukünftig mathematische Modelle zu entwickeln, damit die Ausgangskettenlängen kalkuliert werden kann.

3. Material und Methoden

Zur Erstellung der vorliegenden Arbeit wurde das Microsoft Office Paket Versionsnummer 2101 verwendet. Dabei wurde Microsoft Word für die Texterstellung, Microsoft Excel für tabellarische Darstellungen und Formeln sowie das Microsoft Office für die Erstellung von Abbildungen genutzt. Die Aufnahme sowie die Bearbeitung der Chromatogramme erfolgte mittels Eurochrom2000 HPLC Software Version 1.65.

3.1. Materialien

Mäusehirne

Die Mäusehirne wurden von der Arbeitsgruppe um Professor Gerardy-Schahn, aus der medizinischen Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt. Alle Tiernutzungsprotokolle entsprechen dem deutschen Tierschutzgesetz und sind von den örtlichen Behörden genehmigt (Az. 33.12-42502-04-18/2932).

Chemikalien

Die DMB wurde in analytischer Qualität aus Japan (Dojindo) und die weiteren Chemikalien, sofern nicht anders angegeben, von den in Deutschland ansässigen Unternehmen Sigma-Aldrich, Roche, Roth, Merck und Fluka bezogen. Das Wasser (= destilliertes Wasser) wurde vorerst mit einer Elix UV5 Anlage gereinigt und anschließend mit einem „MiliQ Ultra-pure water System“ (Millipore, USA) analytisch rein aufgearbeitet.

Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen Eppendorf (Hamburg, DE)

Vase-Vials (1,5 ml) Glastechnik Gräfenroda (Gräfenroda, DE)

Safe-Lock (1 ml und 2 ml) Mikroreaktionsgefäß (Eppi) Eppendorf (Hamburg, DE)

Polypropylenröhrchen (15 ml und 50 ml) Sarstedt (Nümbrecht, DE)

Laborgeräte

Hochdruckpumpe Merck-Hitachi (Darmstadt, DE)

Hochdruckpumpe Knauer (Berlin, DE)

Fluoreszenz-Detektor Jasco (Gross-Umstadt, DE)

Fluoreszenz-Detektor Merck-Hitachi (Darmstadt, DE)

Steuerungseinheit Knauer (Berlin, DE)

Steuerungseinheit Merck-Hitachi (Darmstadt, DE)
Reinwasseranlage Millipore (Darmstadt, DE)
Thermo-Schüttler Eppendorf (Hamburg, DE)
Wärmeplatte Medax (Kiel, DE)
Heiz-/Magnetrührer Hartenstein (Würzburg, DE)
Vortexer Ika (Staufen, DE)
Ultraschallbad Bandelin Sonorex (Mörfelden-Walldorf, DE)
Universal 32 R Zentrifuge Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, DE)
Analysenwaage Mettler (Greifensee, CH)
Autosampler Spark VE (Emmen, NL)
Speed-Vac Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Injektionsventil für die präparative Säule: Rheodyne 7125
Injektionsspritze Hamilton-Spritze

3.2. Methoden

3.2.1 Technische Verfahren

Präparative Fraktionierung von PolySia mittels HPLC

Bei der verwendeten PolySia handelt es sich um bakterielle Colominsäure (Gerbu, Heidelberg, Deutschland), die strukturell identisch mit den Polysialinsäuren aus Säugern ist. Für die Trennung der Polysialinsäuren mittels DNAPac™ PA-100 Säule wurden folgende HPLC-Einstellungen und Proben verwendet. Dabei wurde ein Fluoreszenz-Detektor von Jasco (Gross-Umstadt, Deutschland) verwendet.

Standard-Probe:	Colominsäure 60 mg/ml
Injektionsvolumen:	40 µl
Säule:	DNAPac™ PA-100, 22 x 250 mm
Systemprogramm:	ECW 2000 Integration Package
Säulentemperatur:	Raumtemperatur (RT)
Laufmittel A:	Destilliertes Wasser (Aqua dest.)
Laufmittel B:	Ammoniumacetat (4 M NH ₄ Ac)

Detektor Einstellung:

Anregung [nm]:	372
Emission [nm]:	456
Antwortzeit [s]:	1,5
Sensitivität:	Hoch

Gradientenelution zur Kettenlängenbestimmung

Im Rahmen der Gradiententrennung mittels Ionenaustauschersäulen wird die Zusammensetzung des Eluents während der Analysezeit verändert. Hierbei gilt der Grundsatz, dass die Salzkonzentration im zeitlichen Verlauf des Trennungsprozesses erhöht werden soll (aprentas 2017). Die Gradienteneinstellung kann sich je nach Art der zu analysierenden Stoffe ändern und bedarf einer entsprechenden Anpassung. Dieser spiegelt sich zumeist auch in den Peaks wider.

Tabelle 2: Gradientenelution zur Kettenlängenbestimmung

Entsprechend der oben beschriebenen Grundregel ist eine Zunahme von Lösung B während der Analysezeit zu beobachten.

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	100	0
5	100	0
20	87	13
30	83	17
45	81	19
85	79	21
110	0	100
125	0	100
126	100	0
145	100	0

Probeninjektion

Die Aufgabe der Proben wurde manuell Mithilfe einer Injektionsspritze (Hamilton-Spritze 50 µl) durchgeführt. Als Einspritzventil wurde ein Sechswegventil, Rheodyne 7125, mit einer variablen Loop verwendet. Entsprechend der jeweiligen Vorangehensweise wurde das Ventil auf „Load“ und „Inject“ Einstellung umgestellt.

Analytische Kettenlängenbestimmung mittels Anionenaustauscher HPLC

Die Kettenlängen der fraktionierten Polysialinsäuren wurden mithilfe einer analytischen DNAPac™ Pa-100 Säule durchgeführt. Die Anregungs- und Emissionswellenlänge der Fluoreszenzdetektor FP 1520 (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland) waren mit 372 nm und 456 nm, der oben beschriebenen Analyseverfahren identisch. Hierbei wurde ein HPLC-System (Knauer, Berlin) verwendet. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Als mobile Phase wurde Aqua dest. als Laufmittel (A) und Ammoniumacetat als Laufmittel (B) genutzt. Die Gradienten waren wie folgt: T0 min = 0 % B, T5 min = 1 % B, T15 min = 10 % B, T60 min = 50 % B. Die Probenaufgabe erfolgte automatisch über den Autosampler. Die Reihenfolge der Vials wurde zuvor festgelegt und entsprechend bei der Datenanalyse berücksichtigt.

Säule:	Dionex DNAPac™ Pa-100 Säule, 4 x 250mm
Trennungsart:	Anionenaustauschchromatographie
Systemprogramm:	Eurochrom2000
Säulentemperatur:	RT
Pumpe:	Hockdruckpumpe (Knauer)
Detektor:	Jasco oder MerckHitachi
Probeninjektion:	Autosampler Spark VE (Emmen, Niederlande)

Quantifizierung von Neu5Ac aus Polysialinsäuren – Analytische Säule

Die Analyse erfolgte mit einer Merck-Hitachi Superspher 100 C-18 Säule, 250 x 40 mm (Darmstadt, Deutschland). Der Fluoreszenzdetektor wurde auf 372 nm zur Anregung und 456 nm zur Emission eingestellt. Es erfolgte eine automatische Probeninjektion über den Autosampler.

Säule:	Merck-Hitachi Superspher 100 C-18 Säule, 250 x 40 mm
Trennungsart:	Umkehrphasenchromatographie
Systemprogramm:	Eurochrom2000
Säulentemperatur:	4 Grad Celsius (°C)
Pumpe:	Hockdruckpumpe (Knauer)
Detektor:	Jasco oder MerckHitachi
Probeninjektion:	Autosampler Spark VE (Emmen, Niederlande)

Für die Quantifizierung von Zuckerketten mittels (RP)-HPLC wurden folgende Eluentenzusammensetzung und Gradienteneinstellung angewandt.

Tabelle 3: Laufmittel für Superspher 100 RP-18e-Säule

Laufmittel A	Laufmittel B
0,1 % Trifluoressigsäure	0,1 % Trifluoressigsäure
4 % Acetonitril	45 % Acetonitril
4 % Methanol	45 % Methanol
91,9 % Wasser	9,9 % Wasser

Tabelle 4: Gradient für Neu5Ac-Analyse per Superspher 100 RP-18e-Säule

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	100	0
20	95	5
25	91	9
30	85	15
35	0	100
40	0	100
55	100	0

3.2.2 Chemische Methoden und Analysetechniken

Zur Markierung von Neu5Ac, am reduzierenden Ende der PolySia-Ketten oder nach Hydrolyse als Monomer vorliegend, wurde DMB verwendet:

DMB-Markierungsreagenz: 1,22 mg DMB in 1ml Pufferlösung

Die Pufferlösung [für 10 ml] besteht aus:

18 mM Natriumhydrosulfit (31,3 mg)

1 M Mercaptoethanol (700,7 µl)

40 mM Trifluoressigsäure (30,8 µl)

Quantifizierung von Neu5Ac nach Hydrolyse der PolySia-Ketten

Hydrolyse

Zur Quantifizierung der PolySia-Ketten werden die Polymere zunächst hydrolysiert, um anschließend die Neu5Ac-Monomere mit DMB zu markieren. Hierfür wurden die Proben zunächst in einer SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) getrocknet. An-

Material und Methoden

schließlich erfolgte die Gabe von 200 µl Essigsäure (2 M) sowie eine 120-minütige Inkubation der Proben im Schüttler (Thermomixer comfort) bei 80°C. Daraufhin wurden die Proben bei Raumtemperatur (20°C) für 10 min abgekühlt. Zuletzt wurde die Probe für 60 min erneut mittels Rotationsverdampfer getrocknet.

DMB-Markierung von Neu5Ac

Die Fluoreszenzmarkierung mittels DMB wurde in Anlehnung an Sato et al. (Sato et al. 1999b) durchgeführt. Hierfür wurde die zu analysierende Probe zuerst mit dem DMB-Reagenz gelöst und anschließend für 2 Stunden (h) bei 55°C inkubiert. Letztlich wurde die chemische Reaktion, nach 10-minütiger Abkühlung der Probe bei Raumtemperatur, durch die Addition von 0,2 M Natriumhydroxid (NaOH, 20 µL) gestoppt. In Anbetracht der vorliegenden Fragestellung und der Analyseverfahren wurde der Derivatisierungsprozess, in Bezug auf die Inkubationszeit und der chemischen Reaktionsbedingungen, wie zum Beispiel der Temperatur, verändert. Jeweilige Änderungen werden im Verlauf angegeben.

Sowohl für den qualitativen als auch den quantitativen Nachweis von Polysialinsäuren wurden in den durchgeführten Analyseverfahren Standards und Leerwerte mitgeführt. Diese wurden in verschiedenen Konzentrationen, jedoch bei bekannten Verhältnissen gerichtet und sollen sowohl als Referenzwerte als auch für den sicheren Nachweis der zu analysierenden Probe dienen. Für die Quantifizierung von Neu5Ac wurde ein Gemisch aus Sialinsäuren, bestehend aus Neu5Ac, Neu5Gc und KDN (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) angewandt.

Kettenlängenanalyse von PolySia

Milde DMB-Markierung

Im Rahmen der Bestimmung des Polymerisationsgrad (engl. *Degree of Polymerization*, DP) von PolySia-Ketten wurde das „milde“ DMB-HPLC-Verfahren verwendet. Hierbei wurde die getrocknete Probe, ähnlich der oben beschriebenen DMB-Markierung, in 80 µl DMB-Reaktionspuffer aufgelöst. Im Vergleich zu der beschriebenen Derivatisierung erfolgte die Inkubation über Nacht bei 8°C. Die Reaktion wurde anschließend durch das Hinzufügen von 20 µL 1 M NaOH gestoppt. Die chromatographische Trennung der Proben erfolgte in einer DNAPac PAC-100-Säule (Dionex) mittels HPLC (Smartline System, Knauer, Berlin, Deutschland).

Fraktionierung und anschließende Quantifizierung von PolySia

Bei der käuflich erhältlichen Polysialinsäure (= Colominsäure) handelt es sich um ein Gemisch aus unterschiedlichen Kettenlängen. Zum Sammeln definierter Kettenlängen von Polysialinsäure, wurde zunächst Colominsäure mit DMB markiert und per präparativer DNAPac™ PA-100 Säule getrennt, um die Retentionszeiten der unterschiedlichen Kettenlängen zu bestimmen. Anschließend wurde unmarkierte PolySia getrennt und anhand der ermittelten Retentionszeiten nach definierten Kettenlängen und anschließend in 5-minütigen Zeitabständen in Kolben aufgesammelt. Als nächstes wurden die gesammelten Proben getrocknet, um anschließend die Menge zu quantifizieren und die Kettenlängen zu kontrollieren.

Für den quantitativen Nachweis und Vergleich der jeweiligen Proben fand anschließend eine Quantifizierung mittels der oben beschriebenen Superspher 100 C-18 Säule statt. Hierfür wurde von den einzelnen Proben ein Prozent entnommen und in der SpeedVac getrocknet. Anschließend erfolgten eine chemische Hydrolyse und Analyse, wie zuvor beschrieben. Für eine Rechromatographie und Charakterisierung des Polymerisierungsgrad der gesammelten Fraktionen wurde das analytische Dionex DNAPac Pa-100 System angewendet.

Reduktion von PolySia

Für die Charakterisierung von internen Strangbrüchen wurde die Sialinsäure am reduzierende Ende reduziert. Dieser Schritt schließt eine chemische Reaktion dieser terminalen Sialinsäure mit DMB aus. Nur neue, durch interne Strangbrüche erzeugte, neue reduzierte Enden können markiert werden (Sato et al. 1998) (Sato und Kitajima 2013). Hierfür wurden jeweils 20 % der gesammelten Fraktionen der Standardprobe mit Colominsäure, für die Reduktion angewandt.

Im Ersten Schritt wurde die trockene Probe in 100 µl 40 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5) gelöst. Anschließend erfolgte eine Reduktion durch die Zugabe von 100 µl 0,2 M Natriumborhydrid in 0,2 M Natriumboratpuffer (pH 8,0). Darauf folgend erfolgte eine Inkubation der Probe bei 8°C über Nacht. Im weiteren Verlauf fand eine Dialyse gegen 25 mM Ammoniumcarbonat mit Dialyse Cups MWCO2000 Da statt. Die Dialyse wurde über Nacht bei Raumtemperatur mittels Thermo-Schüttler Eppendorf durchgeführt und anschließend mit SpeedVac getrocknet. Im weiteren Verlauf werden die reduzierte Polysialinsäurefraktionen als ProbeR angegeben.

Als Vergleichswert fand eine Dialyse derselben Kettenlängenfraktionen, jedoch ohne eine vorherige Reduzierung, statt. Hierfür wurde im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Vorgehen etwa 10 % der Gesamtfraktion entnommen. Im Anschluss der Trocknungsprozedur mittels SpeedVac erfolgte die Hinzugabe von 100 µl Dialysepuffer. Die

Material und Methoden

Dialyse wurde ebenfalls über Nacht bei Raumtemperatur mittels Thermo-Schüttler Eppendorf durchgeführt und anschließend erneut mit SpeedVac getrocknet. Im weiteren Verlauf wurde der getrockneten Probe 125 µl H₂O hinzugegeben. Sodann erfolgte der oben beschriebene Ablauf. Hierbei wurde anteilig der gelösten Probe 1 % und 2 % entnommen und mit DMB-Reagenz derivatisiert. Im weiteren Verlauf werden die nicht reduzierten Polysialinsäurefraktionen als ProbeD angegeben. Von beide Probensettings wurden nach den jeweiligen Schritten die Kettenlängen mittels der oben beschriebenen Anionenaustauschchromatographie bestimmt.

Derivatisierung und Quantifizierung von Fetuin, Transferrin und Colominsäure

Im weiteren Verlauf wurden die die monosialylierten Glykoproteine Fetuin und Transferrin (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) analysiert, um den Abspaltungsprozess unter verschiedenen Bedingungen zu charakterisieren. Ein Anteil der zu analysierenden Probe unterlief dem Verfahren einer Hydrolyse und der anschließenden DMB-Derivatisierung über 2h bei 55°C, wie sie bei der Quantifizierung von Sialinsäuren erfolgt, sodass der gesamte Anteil an Neu5Ac der Glykoproteine analysiert werden kann. Zum Vergleich wurde auf eine chemische Hydrolyse verzichtet. Im Gegensatz zu dem ersten Anteil fand die Derivatisierung über Nacht, bei 8°C statt, um die milde Kettenlängenmethode zu simulieren. Der Reaktionsstop erfolgte jeweils mit 0,2 M NaOH. Anschließend wurden alle Proben, jeweils eine Probe von Transferrin, Fetuin, DP2 sowie Standardprobe, mittels Superspher 100 C-18 Säule analysiert. Zur Verifizierung des Verfahrens wurde eine Kalibrationsgerade mit Abweichungskoeffizienten erstellt.

3.2.3 Aufarbeitung der Gewebeproben

Um eine Kettenlängenanalyse von Polysialinsäuren aus Geweben zu veranschaulichen, wurden drei Mäusehirne aufgearbeitet. Im Ersten Schritt wurde das Feuchtgewicht der Organe in 2 ml Eppendorf-Gefäßen abgewogen. Dabei wurde für die 2 ml Mikroreaktionsgefäß das jeweilige Objektgewicht dokumentiert, um anschließend darin das Gehirngewicht zu bestimmen. Als nächstes erfolgte die Gabe von 500 µl Wasser sowie eine anschließende Homogenisierung der Probe mittels eines Ultraschallstabs („Sonifier“, Branson, Danbury, USA).

Für das weitere Testverfahren mittels HPLC wurden die Proben an drei aufeinanderfolgenden Versuchstagen wie folgt bearbeitet: Als Erstes erfolgte eine Mischung von 120 µl Aliquot und 120 µl DMB-Reagenz. Nach einer ein-minütigen Mischung der Probe im Ultraschallbad wurde eine Inkubation über Nacht im Schüttler (Thermomixer comfort) bei 8°C veranlasst. Als Vergleichswert diente eine Standardprobe und ein Leerwert. Nach der oben beschriebenen Inkubationszeit wurden die Proben 30 min bei 4°C mit 17380 g

Material und Methoden

(RCF) in einer Universal 32 R Zentrifuge (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert. Für die anschließende HPLC Analyse wurden 200 µl vom Überstand in Glasgefäße pipettiert und die Reaktion durch das Hinzufügen von 50 µl 1 M NaOH (Sigma-Aldrich) gestoppt. Die Standardprobe setzte sich in diesem Fall aus 120 µl Colominsäure und 120 µl DMB-Reagenz, während der Leerwert aus 120 µl H₂O und 120 µl DMB-Reagenz bestand. Die chromatographische Trennung erfolgte mittels analytischer DNAPac PAc-100-Säule (Dionex).

4. Ergebnisse

4.1. Analyse von Gewebeproben

In den Studien mit Mäusehirnen wurde bereits die Korrelation zwischen der Qualität und der Quantität von Polysialinsäuren mit dem möglichen Erkrankungsrisiko in knock-out Mäusen beschrieben (Sato und Kitajima 2013b). Nach aktuellem Wissensstand spielt der Polymerisationsgrad von PolySia in ihrer Funktion eine wesentliche Rolle (Schnaar et al. 2014). Aus diesem Grund ist die Bestimmung der Kettenlängen von großem Interesse. Um die Anwendung der milden DMB-basierten PolySia-Kettenanalyse zu demonstrieren, wurde in dieser Arbeit zunächst PolySia aus Mäusehirnen analysiert.

In der Abbildung 12 sind Kettenlängenanalysen von drei verschiedenen Mäusehirnen zu entnehmen. Maximale Kettenlängen mit mehr als 30 Neu5Ac-Resten waren dabei nachweisbar. Die Verifizierung des Kettenlängenspektrums der Proben wurde durch die Vergleichsanalyse mittels Colominsäure bestätigt. Die maximal detektierbaren Kettenlängen der Colominsäure lagen bei mehr als 40 Sialinsäureeinheiten (siehe Abbildung 13). Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse konnte durch die repetitiven Versuchsreihen gestärkt werden.

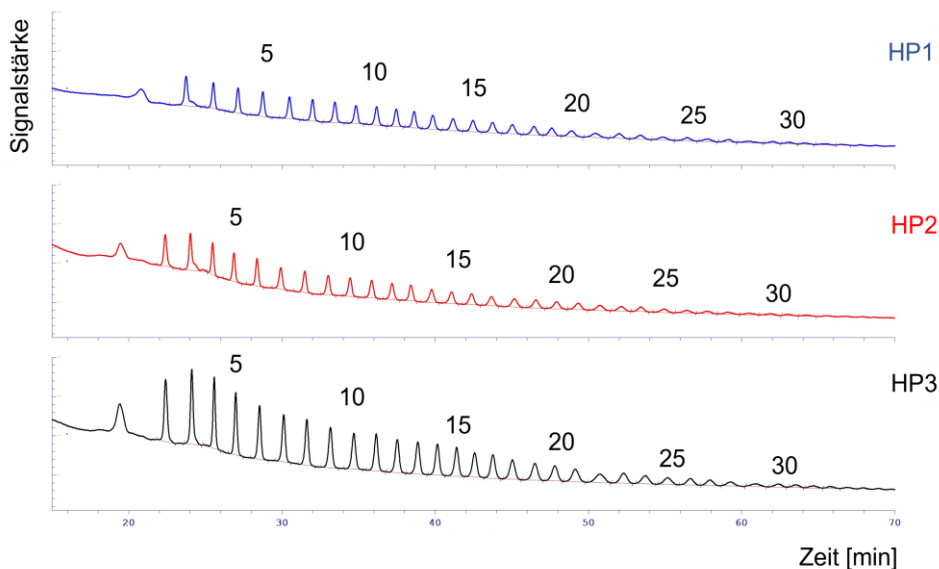


Abbildung 12: Chromatographische Darstellung von PolySia aus drei murinen Hirnproben

Nach der Fluoreszenzmarkierung der PolySia-Ketten aus Mäusehirnen, wurden diese mittels Anionenaustauschchromatographie nach der Kettenlänge getrennt und visualisiert. Ausgewählte Peaks sind mit der entsprechenden Kettenlänge markiert (HP: Hirnprobe).

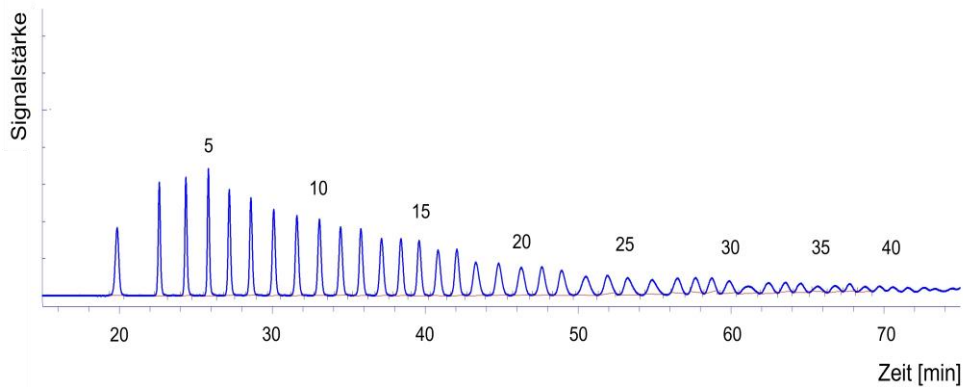


Abbildung 13: Chromatographische Trennung fluoreszenzmarkierter Colominsäure

Die chromatographische Trennung von DMB-markierter Colominsäure erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie. Ausgewählte Peaks sind mit der entsprechenden Kettenlänge markiert.

Die Analyse der vorliegenden Chromatogramme lässt vermuten, dass in den Mäusehirnen mehr PolySia-Ketten mit kurzen als mit langen Kettenlängen vorliegen. Sowohl die Anzahl der Peaks als auch die Signalstärke nehmen mit der zunehmenden Trennungszeit ab. Ähnliche Verteilungsmuster der PolySia-Ketten wurden bereits in anderen Studien gezeigt (Galuska et al 2006 JBC).

Aufgrund ihrer kettenlängenabhängigen Funktionsweisen ist eine nähere Bestimmung des Polymerisationsgrads von PolySia von großer Bedeutung. Die *in vivo* vorkommenden Kettenlängen lassen sich mit den aktuell zur Verfügung stehenden Methoden jedoch nicht genau feststellen. Die Testergebnisse werden zumeist durch verschiedene chemische und technische Rahmenbedingungen beeinflusst. Insbesondere die neu entstandenen, internen Strangbrüche spielen hierbei eine relevante Rolle. Als Ursache für die Entstehung der internen Strangbrüche ist die saure Bedingung am wahrscheinlichsten. Diese entsteht im Rahmen der Derivatisierung und führt zur Abspaltung der PolySia-Kette vom Glykan des Glykoproteins.

Um auf die Zielsetzungen dieser Arbeit einzugehen, werden nun die jeweils relevanten Schritte zur Bestimmung der Polysialinsäurekettenlänge mittels HPLC erläutert. Es werden sowohl technische als auch chemische Prozesse berücksichtigt. Ein besonderes Augenmerk soll auf die oben beschriebenen internen Strangbrüche gelegt werden, um anhand dieser, die Ausgangskettenlängen der PolySia-Ketten zu kalkulieren.

4.2. Fraktionierung von definierten Kettenlängenbereichen

Die genaue Bestimmung der Polysialinsäurekettenlängen ist für die Analyse der Struktur und Funktion von Sialinsäurepolymeren unabdingbar. Sie stellt eine wichtige Herausforderung dar und Bedarf einer hohen technischen Ausstattung sowie biochemischer Kenntnisse. Bei chromatographischen Trennungsvorgängen von Polysialinsäuren nehmen insbesondere die Retentionszeiten der einzelnen Kettenlängen eine entscheidende Rolle ein. Daneben ist es von Bedeutung, die Veränderungen des Analyten, welche im Rahmen der chemischen Markierung entstehen, zu kennen. Um diese bei PolySia zu bestimmen, sollen zunächst definierte Kettenlängen aufgereinigt werden. Hierdurch können beispielsweise auch interne Strangbrüche detektiert werden.

Für diese Aufarbeitung wurde initial eine präparative Säule angewandt, um solche definierte Kettenlängen für nachfolgende Versuche zu gewinnen. Das primäre Ziel bestand darin, mindestens 30 Kettenlängen der PolySia chromatographisch darzustellen und zu fraktionieren. In den ersten Vorversuchen konnten lediglich etwa 14 der DMB markierten Polysialinsäurekettenlängen bis zur Baseline voneinander getrennt werden (Abbildung 14). Zudem war eine adäquate Beurteilung der Proben, aufgrund von geringer Signalstärke und der asymmetrischen Peakverteilung, nicht möglich. Durch weitere Optimierungen der technischen und chemischen Rahmenbedingungen (siehe Punkt 3.2.1) war das oben beschriebene Ziel nach ca. 20 Versuchsreihen erreicht (Abbildung 15).

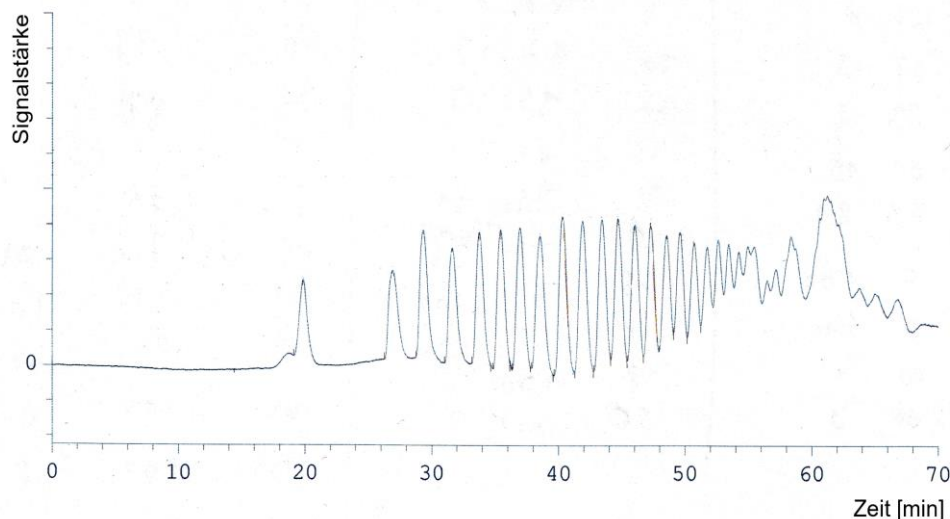


Abbildung 14: Initiale Trennung von Colominsäure

Colominsäure wurde mittels präparativer Säule analysiert. Die Abbildung zeigt die ersten Trennergebnisse. Eine adäquate Darstellung und Beurteilung der PolySia-Ketten war nicht möglich. Es liegt keine Baseline-trennung ab Kettenlänge 10 vor.

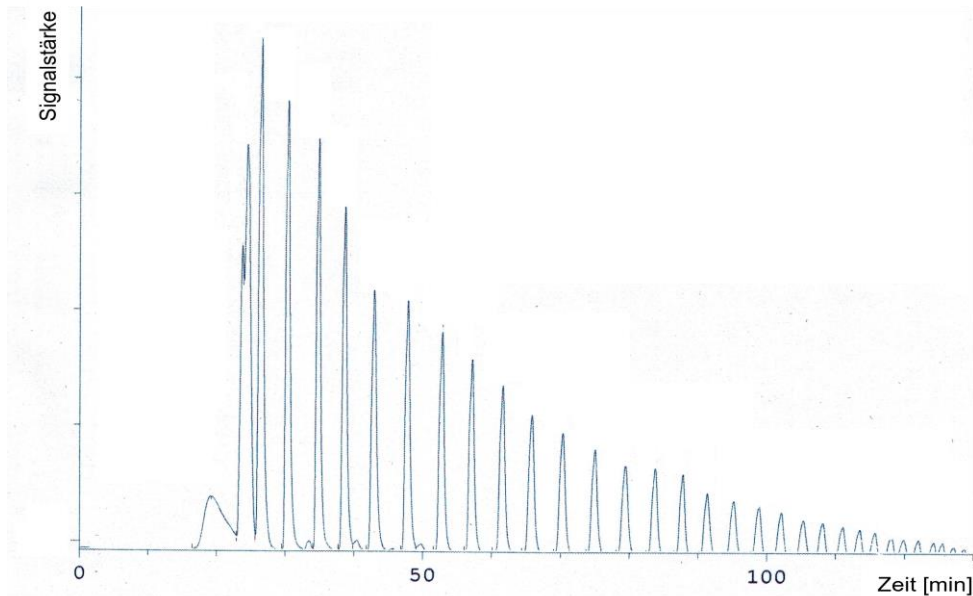


Abbildung 15: Optimierte Trennung von Colominsäure

Colominsäure wurde mittels präparativer Säule analysiert. Die Abbildung zeigt die Trennung nach Optimierung des Salzgradientens. Die Baselinie lässt sich festlegen und die Signalstärke nimmt mit zunehmender Analysezeit ab.

Anhand der Retentionszeiten, die mit einem DMB-markierten PolySia-Standard ermittelt wurden, konnten anschließend unmarkierte, native Colominsäure „blind“ (da nicht markiert) fraktioniert werden. Zur Charakterisierung der fraktionierten Kettenlängenbereiche wurden die einzelnen Fraktionen wiederum mittels Anionenaustauschchromatographie nach DMB-Markierung rechromatographiert (Abbildung 16). Während die Fraktionierung der Sialinsäure per präparativen Säulen erfolgte, wurde die Rechromatographie mittels analytischer DNAPac PA-100-Säule durchgeführt.

Die fraktionierten Kettenlängengruppen konnten mittels Anionenaustauschchromatographie repetitiv und gezielt nach bestimmten Kettenlängen getrennt sowie chromatographisch dargestellt werden. Nach diesem Schema wurden für die folgenden Versuche definierte Kettenlängenbereiche fraktioniert. Ab Kettenlänge 16 kann das Zustandekommen interner Strangbrüche beobachtet werden (siehe Abbildung 16). Diese sind aufgrund der Peakgrößen von den gesammelten Fraktionen gut zu unterscheiden.

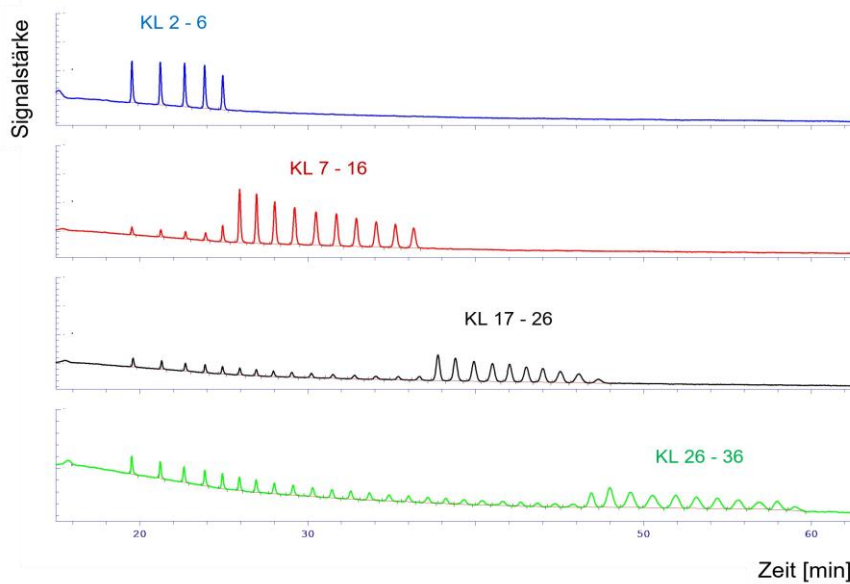


Abbildung 16: Rechromatographie von PolySia

Rechromatographie der fraktionierten Kettenlängen mittels Anionenaustauschchromatographie nach DMB-Markierung. Die Kettenlängen zwei bis 36 sind in vier Fraktionen abgebildet. Die Trennung erfolgte an einer analytischer DNAPac PAc-100-Säule.

4.3. Quantifizierung der fraktionierten Polysialinsäuren

Die quantitative Analyse der gesammelten Fraktionen erfolgte nach kompletter Hydrolyse der PolySia-Ketten und DMB-Markierung der entstandenen Monomere mittels Superspher 100 C-18 Säule. Das Ziel dieses Abschnitts bestand darin, den Nachweis und die Stoffmenge von Neu5Ac einer Probe mittels HPLC zu berechnen, damit anschließend mit definierten Mengen gearbeitet werden kann. Als Standard wurde Siamix, bestehend aus KDN, Neu5Gc und Neu5Ac, angewandt (siehe Punkt 3.2.2).

Um die Stoffmenge der gesuchten Probe zu bestimmen, war zunächst eine Identifizierung der jeweiligen Analyten notwendig. In diesem Fall wurde Colominsäure, welches ein Homopolymer aus Neu5Ac ist, der Standardprobe aus Siamix gegenübergestellt und mit dieser verglichen. Dabei waren die Grundkenntnisse über das Verteilungsmuster und die Zusammensetzung von Siamix entscheidend. Als Trennkriterium wurde hierbei die Retentionszeit von Neu5Ac festgelegt. Die Abbildung 17 zeigt das typische Verteilungsmuster der oben genannten Standardprobe in vier verschiedenen Konzentrationen (Inoue et al. 1998).

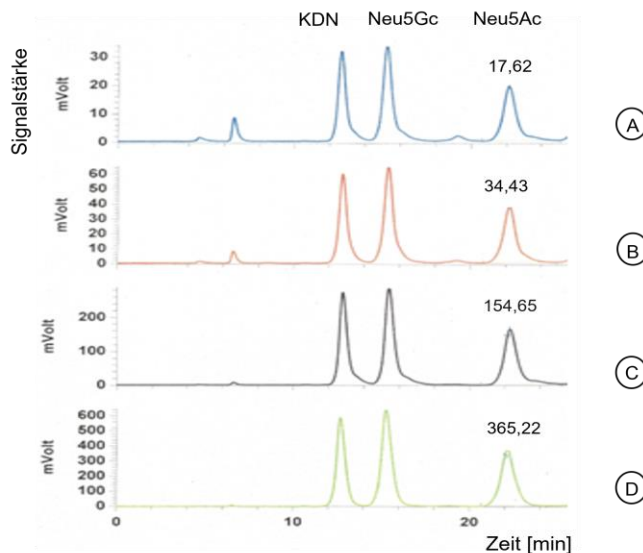


Abbildung 17: Quantifizierung von Siamix

Siamix wird als Referenzsubstrat in vier verschiedenen Konzentrationen mittels RP-Chromatographie analysiert (A: $c = 0,005 \text{ mol}/\mu\text{l}$; B: $c = 0,01 \text{ mol}/\mu\text{l}$; C: $c = 0,05 \text{ mol}/\mu\text{l}$; D: $c = 0,1 \text{ mol}/\mu\text{l}$). Entsprechend der Retentionszeiten des DMB-markierten Siamix ist der erste Peak als KDN, der Zweite als Neu5Gc und der Dritte als Neu5Ac zu werten. Die Signalfäche von Neu5Ac wurde an der Baseline manuell markiert und durch die Software errechnet. c =Stoffmengenkonzentration.

Tabelle 5: Peakflächen der Neu5Ac für vier verschiedenen Siamix-Mengen

Zur Erstellung einer Kalibrationsgerade wurde in diesem Fall vier verschiedene Stoffmengenkonzentrationen verwendet. Die erhobenen Peakflächen unterscheiden sich, entsprechend der jeweiligen Stoffmenge, voneinander und sind der Abbildung 17 zu entnehmen

Stoffmenge [nmol]	Peakfläche
0,05	17,62
0,1	34,43
0,5	154,65
1	365,22

Basierend auf die oben genannten Analysedaten erstellten wir eine Kalibrationsgerade mit der Funktion $y = 362,53x - 6,5609$ und nutzen diese als Grundlage für die weiteren Analysevorgänge. Der Abweichungskoeffizient betrug dabei etwa 0,99. Im Folgenden ist die quantitative Analyse von Neu5Ac, am Beispiel einer Fraktionierung dargestellt (Abbildung 18). Die Erhebung der Signalfächen erfolgte wie oben beschrieben.

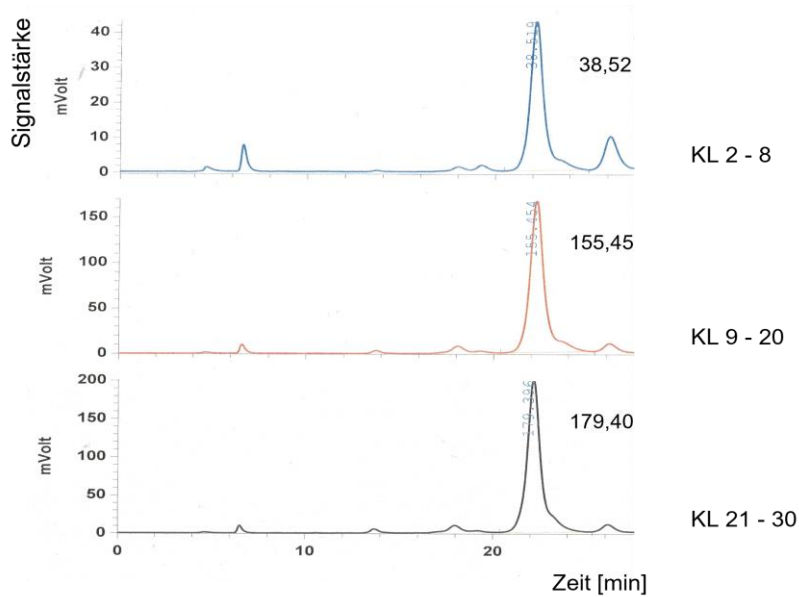


Abbildung 18: Quantifizierung der gesammelten Kettenlängenfraktionen

Nach Hydrolyse und DMB-Markierung wurden die fluoreszenzmarkierten Neu5Ac-Einheiten mittels RP-Chromatographie analysiert. Es sind drei verschiedene KL-Fractionen mit jeweiligen Signalfächern dargestellt. Auf der x-Achse ist die Zeit und auf der y-Achse die Signalstärke abgebildet.

Für die Berechnung der Neu5Ac-Mengen der einzelnen Fraktionen wurde die oben genannte Funktion umgestellt. Das Ergebnis ist dann wie folgt:

$$x = \frac{y + 6,5609}{362,53}$$

(y=Peakfläche; 362,53 ist die Steigung der Funktion; x= Stoffmenge; 6,5609 = Offset-Wert)

Die errechneten Stoffmengen sind in der unteren Tabelle (Tabelle 6) aufgelistet. Letztlich wurde die Konzentration der einzelnen Fraktionen summiert und mit der Stoffkonzentration der zu analysierenden Probe verglichen.

Tabelle 6: Analytierte Menge an Neu5Ac

Die Stoffmengen an Neu5Ac sind für die einzelnen Fraktionen der Abbildung 18 mit den jeweiligen Peakflächen aufgelistet.

Kettenlänge	Peakfläche	Stoffmenge [nmol]
2-8	38,51	0,12
9-20	155,45	0,45
21-30	179,39	0,51

4.4. Vergleich der DMB-Markierung von reduzierter und nativer Polysialinsäuren

Zur Beantwortung der Arbeitshypothese war eine nähere Charakterisierung der neu entstandenen Strangbrüche notwendig. Das Ziel der folgenden Methode bestand darin, das Ausmaß der Strangbrüche separat darzustellen und diese von der Grundstruktur der Probe zu differenzieren.

In diesem Zusammenhang fand als Erstes eine gezielte Reduzierung des reduzierenden Endes der Oligo-/Polysialinsäuren statt (Inoue und Inoue 2003). Eine anschließende Fluoreszenzmarkierung dieser terminalen Abschnitte mittels DMB war infolgedessen nicht möglich. Im Gegensatz hierzu bieten die neu entstandenen, internen Strangbrüche eine Anknüpfungsstelle für DMB. Folglich werden nur diese markiert und chromatographisch dargestellt. In Abbildung 19 wird dieser Vorgang schematisch dargestellt.

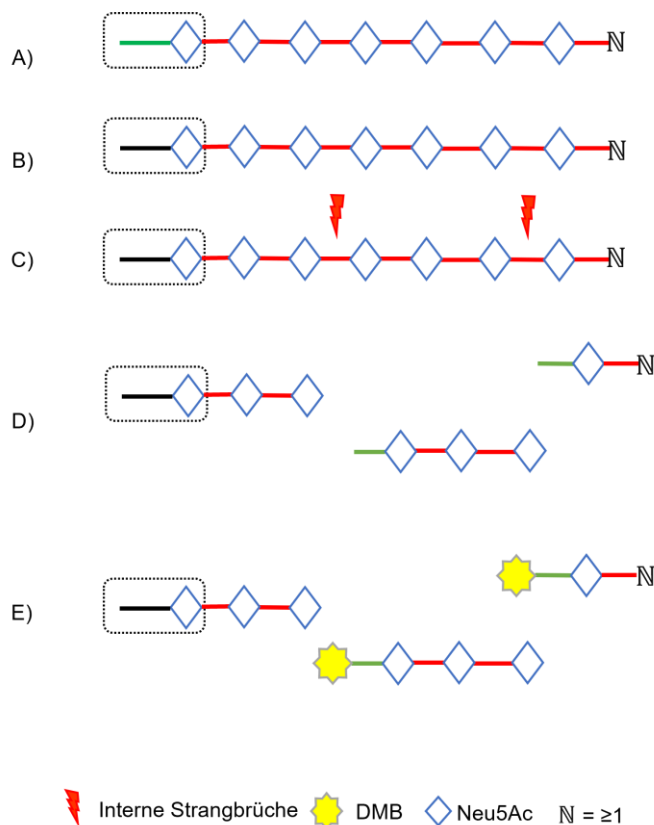


Abbildung 19: Hydrolyse und Derivatisierung mit Reduzierung der terminalen Sialinsäureketten

A+B) Das reduzierende Ende der terminalen Sialinsäure wird reduziert (hier dunkel dargestellt). C-E) Im Rahmen der Hydrolyse kommt es zu internen Strangbrüchen. Die neu entstandenen, reduzierenden Enden der Sialinsäure werden mittels DMB markiert, während eine Fluoreszenzmarkierung der zu Beginn vorliegenden terminalen Enden nicht möglich ist. Bei der Hydrolyse und DMB-Markierung handelt es sich um eine Eintopfreaktion. \mathbb{N} = Natürliche Zahlen, Anzahl der Neu5Ac-Einheiten.

Ergebnisse

Im Folgenden ist die Analyse der ProbeR und ProbeD, für die Kettenlängenfraktion 2 bis 6, beispielhaft abgebildet. Die Trennung der Proben erfolgte mittels analytischer Dionex DNAPac™ Pa-100 Säule.

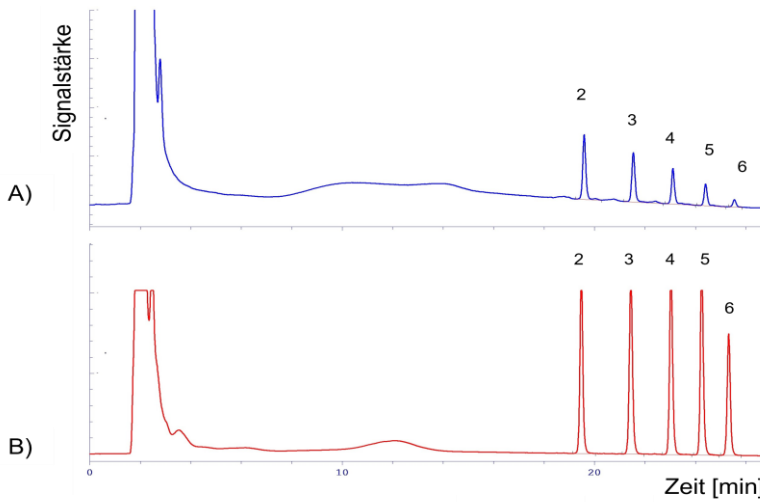


Abbildung 20: Analyse der ProbeR und ProbeD für die Kettenlängen 2-6

ProbeR (A) entspricht der reduzierten PolySia und ProbeD (B) der nativen PolySia-Fraktion

Mithilfe der erhobenen Chromatogramme war eine qualitative Analyse der jeweiligen Peakflächen möglich. Hierdurch gewonnene Daten wurden mit einem Excel-Programm dokumentiert und graphisch dargestellt. Am Beispiel einer Versuchsreihe werden im Folgenden die Ergebnisse der ProbeR und ProbeD erläutert.

Die Testergebnisse der Kettenlängenfraktionen 2 bis 6 sind in Abbildung 21 dargestellt. Diese enthalten lediglich kurze PolySia-Ketten, sodass nur geringe interne Strangbrüche entstehen. Die Resultate spiegeln sich in der Analyse der ProbeR wider.

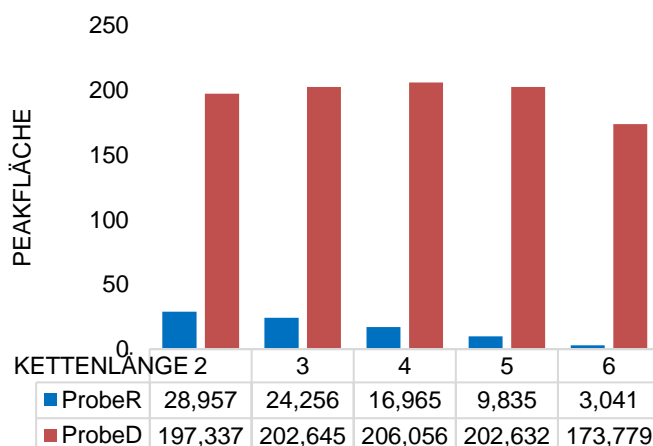


Abbildung 21: Analyse der KL 2 bis 6 für ProbeR und ProbeD

Die Signalflächen der ProbeR sind im unteren Messbereich. Dabei werden Verhältnisse von etwa 1:7 bis zu 1:55 zugunsten der nicht reduzierten Kettenlängen beobachtet.

Ergebnisse

In Zusammenschau der Abbildung 22 bis Abbildung 27 ist, mit zunehmender Kettenlängenfraktion, eine steigende Tendenz der ProbeR zu beobachten. Es zeigt sich hierbei ein exponentieller Verlauf der Signalfächen von ProbeR. Zudem ist festzuhalten, dass sich das Verteilungsmuster der jeweiligen Proben entgegengesetzt darstellt. Während in ProbeR hauptsächlich kurze Polysialinsäurekettenlängen vorkommen, sind in ProbeD vorwiegend lange Kettenlängen vorliegend.

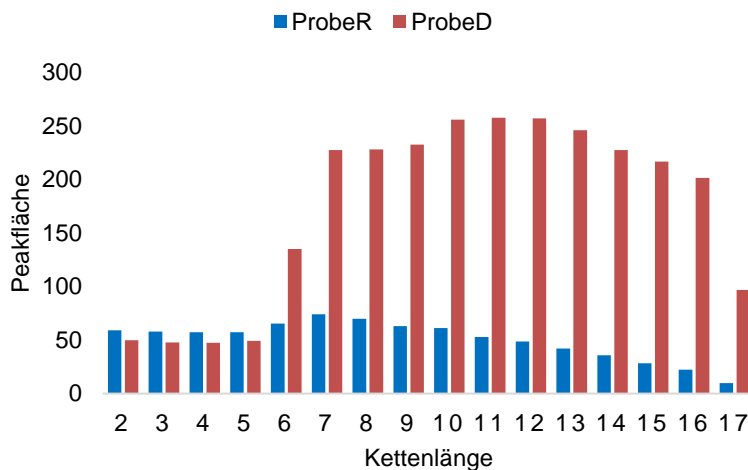


Abbildung 22: Analyse der KL 7 bis 17 für ProbeR und ProbeD

Entsprechend der zuvor festgelegten Kettenlängenfraktionen zeigen sich die Peakflächen der Kettenlängen 7 bis 17 für die ProbeD am höchsten. Die Kettenlängen der ProbeR sind im Vergleich zur ProbeD im niedrigeren Niveau.

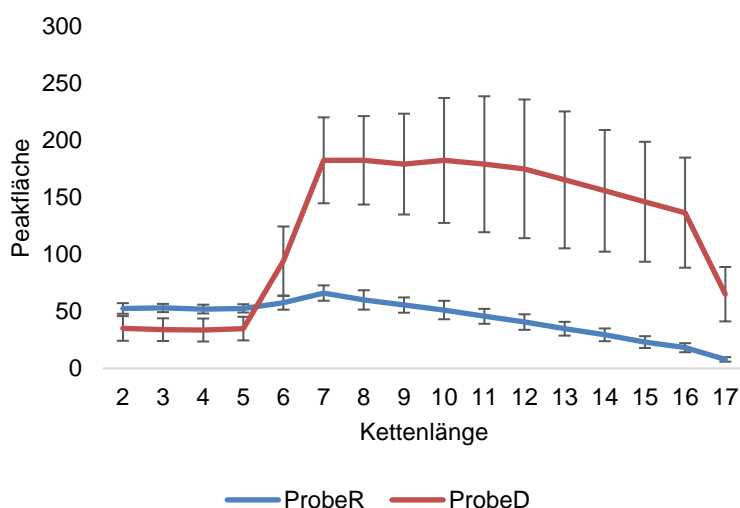


Abbildung 23: Mittelwerte und Standardabweichungen für KL 7 bis 17 in ProbeR und ProbeD

Es sind die Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen von drei verschiedenen Versuchsreihen für ProbeR und ProbeD für die Kettenlängenfraktion 7 bis 17 abgebildet. Der Kurvenverlauf spiegelt die Abbildung 22 wider.

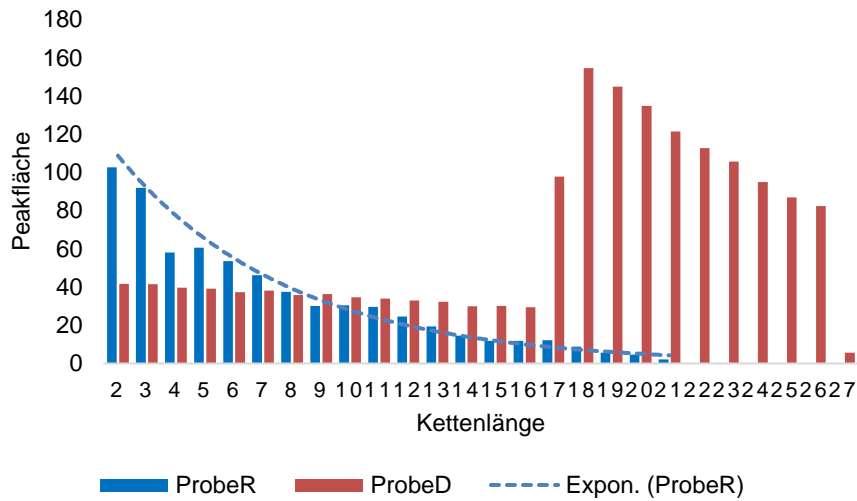


Abbildung 24: Analyse der KL 18 bis 26 für ProbeR und ProbeD

Die Signalfächen der ProbeD sind im Bereich der längeren Kettenlängen am stärksten ausgeprägt, während die ProbeR im Bereich der kurzen Kettenlängen dominiert.

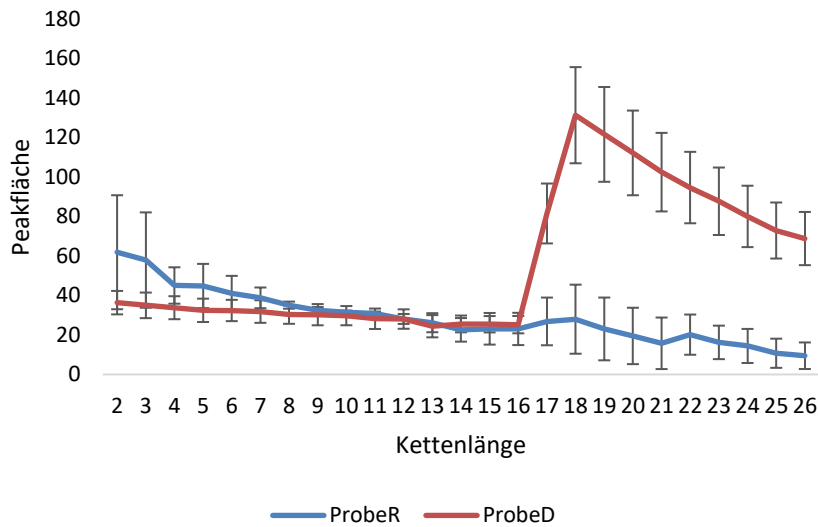


Abbildung 25: Mittelwerte und Standardabweichungen für KL 18 bis 26 in ProbeR und ProbeD

Im Vergleich zu der vorherigen Abbildung zeigt sich eine Zunahme der Kettenlängen der ProbeR. Entsprechend der festgelegten Kettenlängenfraktion sind die Signalfächen der ProbeD im Bereich der KL 18 bis 26 am stärksten ausgeprägt. Die Daten entsprechen der Analyse von drei verschiedenen Versuchsreihen.

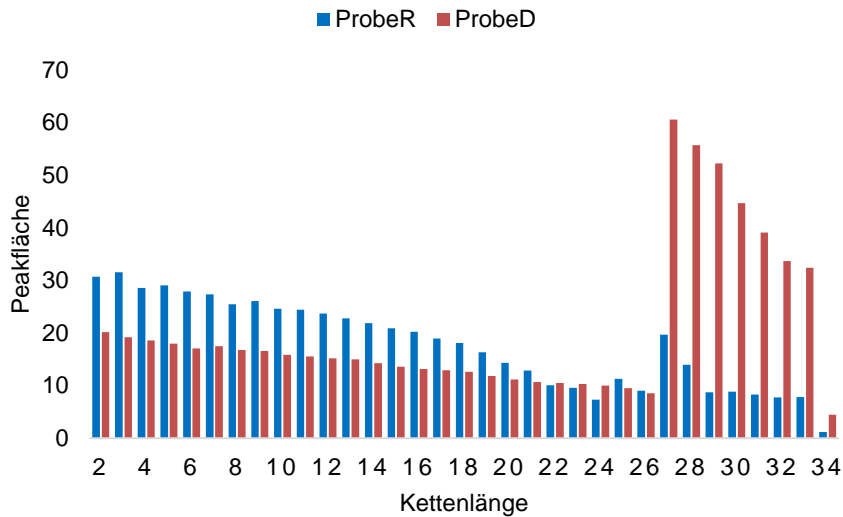


Abbildung 26: Analyse der KL 27 bis 35 für ProbeR und ProbeD

Das Verteilungsmuster der ProbeR und ProbeD sind im Vergleich zur Abbildung 24 nahezu identisch.

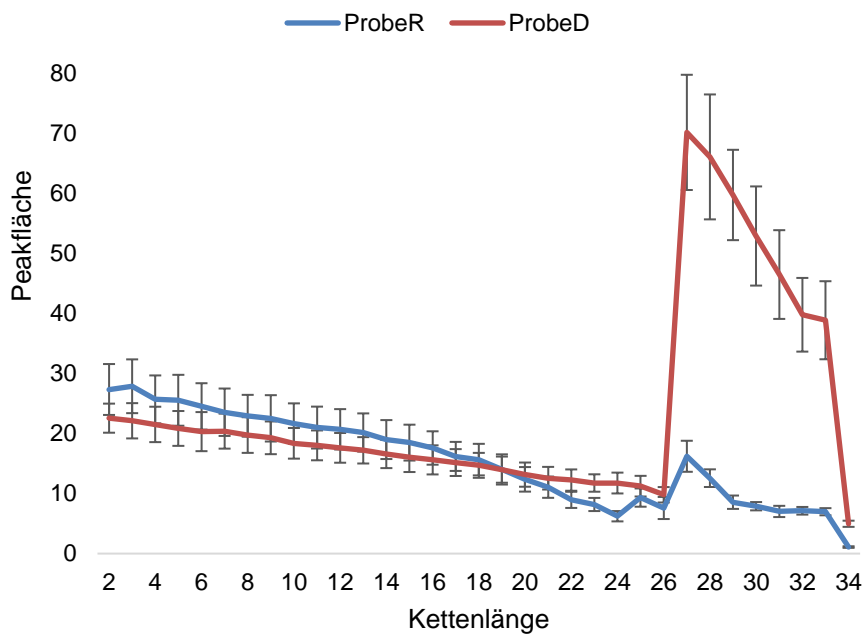


Abbildung 27: Mittelwerte und Standardabweichungen für KL 27 bis 35 in ProbeR und ProbeD

Die Mittelwerte und Standardabweichungen für die Analyse von Sialinsäuren ist für die Kettenlängenfraktion 27 bis 35 für ProbeR und ProbeD abgebildet. Entsprechend der oben gezeigten Abbildung ist die ProbeR im Bereich der kurzen PolySia-Ketten dominierend, während ProbeD im Bereich der langen Kettenlängen um ein Vielfaches der ProbeR überwiegt. Die Daten entsprechen der Analyse von drei verschiedenen Versuchsreihen.

Ergebnisse

Die Analyse der Kettenlängenfraktionen 35 bis 55 (Abbildung 28) erbringt, im Vergleich zu den vorherigen Testabschnitten, vorwiegend mehr kurze als lange Polysialinsäurekettenlängen. Dabei ist ein negativ linearer Verlauf der Signalfächen, von kurzen zu langen Kettenlängen, zu entnehmen. Dieser spiegelt sich im Kurvenverlauf der ProbeR wider. Dementsprechend ist es auf ein erhöhtes Ausmaß von neu entstandenen Strangbrüchen zurückzuführen.

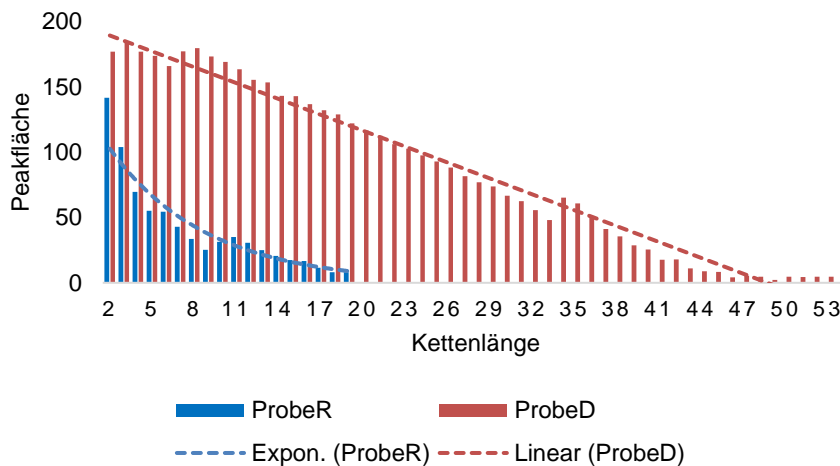


Abbildung 28: Analyse der KL 35 bis 55 für ProbeR und ProbeD

Die Signalfächen nehmen mit zunehmender Kettenlänge in beiden Proben ab. Während für ProbeR ein exponentieller Verlauf zu beobachten ist, zeigt sich in ProbeR eine negative lineare Trendlinie. Die Signalfächen der ProbeD sind verhältnismäßig der ProbeR um ein Vielfaches erhöht und hinsichtlich der Kettenlänge breiter aufgestellt.

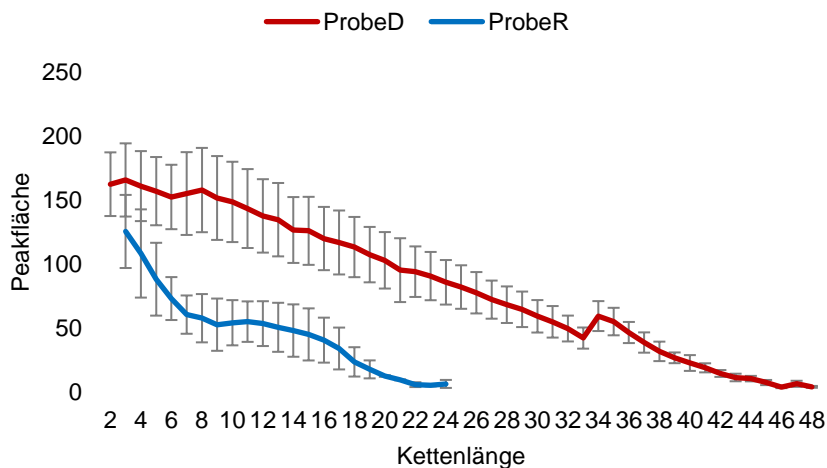


Abbildung 29: Mittelwerte und Standardabweichungen für KL 35 bis 55 in ProbeR und ProbeD

In beiden Versuchsreihen ist die Ausprägung von kurzen PolySia-Ketten stärker als von langen Kettenlängen. Die Analyse der Kettenfraktion spiegelt sich zum Teil im Verlauf der ProbeD wider. Die Daten entsprechen der Analyse von drei verschiedenen Versuchsreihen.

Angesichts des bereits erläuterten theoretischen Wissens (siehe Abbildung 19), konnte eine Differenz zwischen den Signalfächern der untersuchenden Proben dokumentiert werden. Die erhobenen Daten der ProbeR sind als interne Strangbrüche der PolySia zu interpretieren. Die reduzierenden terminalen Sialinsäureketten, welche eine Demarkierungsprozedur unterliefen, wurden chromatographisch nicht detektiert und spiegeln sich in den genannten Ergebnissen nicht wider. Im Gegensatz hierzu, sind in der Analyse der nativen Polysialinsäuren, sowohl interne Strangbrüche als auch die initial vorliegenden terminale Sialinsäureketten enthalten.

Zusammenfassend konnten nachgewiesen werden, dass im Rahmen der milden Derivatisierung von Polysialinsäuren, interne Strangbrüche entstehen und deren Ausmaß mit dem zunehmenden Polymerisationsgrad der Sialinsäuren korreliert. In der Analyse von kurzen PolySia-Ketten präsentierten sich geringe Anteile an internen Strangbrüchen, welche auf die kurzen Kettenlängen der zu untersuchenden Proben zurückzuführen sind. Unter den oben beschriebenen Rahmenbedingungen, sind allerdings in der Analyse von langen PolySia-Ketten, andere Ergebnisse beobachtbar. Und zwar lässt sich feststellen, dass bei langen PolySia-Ketten ein hohes Maß an internen Strangbrüchen entstehen. Ab einem gewissen Polymerisationsgrad wiederum, verändert sich das Verteilungsmuster der Analyse zugunsten von internen Strangbrüchen (siehe Abbildung 28).

4.5. Charakterisierung der Abspaltung und DMB-Markierung von Sialinsäuren bei Glykoproteinen

Sialinsäuren kommen zumeist als Monosialinreste an der nicht reduzierten Endposition der Glykanketten von Glykoproteinen und Glykolipiden vor (Sato 2004). Genauso wie Monosialylreste sind auch PolySia-Ketten kovalent an Glykoproteine gekoppelt. Mithilfe einer „normalen“ Hydrolyse ist eine komplette Freisetzung aller Sialinsäuren und somit auch aller PolySia-Ketten von Glykoproteinen möglich. Bei der milden DMB-Kettenlängenanalyse kommt es während des Derivatisierungsvorgang wohl zu einer partiellen Hydrolyse. Erst dann ist ein reduzierendes Ende einer PolySia-Kette frei, um sie mit DMB zu markieren.

In diesem Abschnitt wird, am Beispiel von Fetuin und Transferrin, auf die Abspaltung der Sialinsäuren von deren Glykanen eingegangen. Sialinsäuren sind in den genannten Glykoproteinen durch unterschiedliche Verknüpfungsarten an Glykanen gebunden. Wäh-

rend Fetuin, neben $\alpha 2,6$ -Verbindungen, vorwiegend eine $\alpha 2,3$ -Verbindungen enthält (Lederkremer et al. 2022), liegt bei Transferrin eine $\alpha 2,6$ -Bindung vor (Matsumoto et al. 2015). Im Vergleich hierzu sind in PolySia-Ketten die Neu5Ac-Reste durch eine $\alpha 2,8$ -Verbindung miteinander verknüpft (Abbildung 30). Auch bei einer PolySia-Kette wäre jedoch die erste Sialinsäure über eine der beiden erstgenannten Verbindungen am restlichen Glykan gebunden (Mark D. Jankowski et al. 2019). Bei der Kettenlängenanalyse würde man somit nur die tatsächlich vorhandene Kettenlänge erfassen, wenn ausschließlich die $\alpha 2,3$ - oder $\alpha 2,6$ -Verbindung zwischen der ersten Sialinsäure und dem Glykan hydrolysiert werden würde, jedoch nicht die internen $\alpha 2,8$ -Verbindungen einer PolySia-Kette. Um eine nähere Bestimmung, der *in vivo* tatsächlich vorkommende Sialinsäureketten zu ermöglichen, ist die Kenntnis über das Ausmaß der Hydrolyse von der jeweiligen Verbindung ($\alpha 2,3$ -, $\alpha 2,6$ - und $\alpha 2,8$ -Verbindungen) notwendig.

Es soll nachgewiesen werden, wie viel Prozent aller $\alpha 2,3$ -, $\alpha 2,6$ - gebunden Sialinsäuren (dies wäre auch bei PolySia, die erste Sialinsäure) unter den milden Bedingungen, die für die Kettenlängenanalyse (ohne zusätzlichen Hydrolyse-Schritt) genutzt wird, von Glykanen freigesetzt werden und welche der oben genannten Verbindungen am säurestabilsten ist. Zudem wurden Sialinsäuredimere verwendet, um die Spaltung von $\alpha 2,8$ -Verbindungen zu charakterisieren.



Abbildung 30: Schematische Darstellung der Verbindungen von Fetuin, Transferrin und DP2

Es sind die Glykoproteine, Fetuin und Transferrin, sowie die DP2 in ihrer Verknüpfungsform mit Neu5Ac schematisch dargestellt. Neu5Ac ist bei Fetuin über eine $\alpha 2,3$ und $\alpha 2,6$ -Bindungen kovalent an Galaktose gebunden. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde die $\alpha 2,6$ -Bindung von Fetuin hier nicht abgebildet. Bei Transferrin liegt eine $\alpha 2,3$ - Bindung vor. Sialinsäuren sind durch $\alpha 2,8$ -Bindungen miteinander verknüpft.

4.5.1 Derivatisierung mit Hydrolyse

Die Analyten unterliefen zunächst der Prozedur einer zusätzlichen kompletten Hydrolyse und der anschließenden Derivatisierung. So soll zunächst bestimmt werden, wie viel Sialinsäuren überhaupt abgespalten werden können. In allen drei Versuchsproben konnte Neu5Ac identifiziert und quantitativ gemessen werden. Zur besseren Übersicht werden die Ergebnisse der DP2 separat abgebildet.

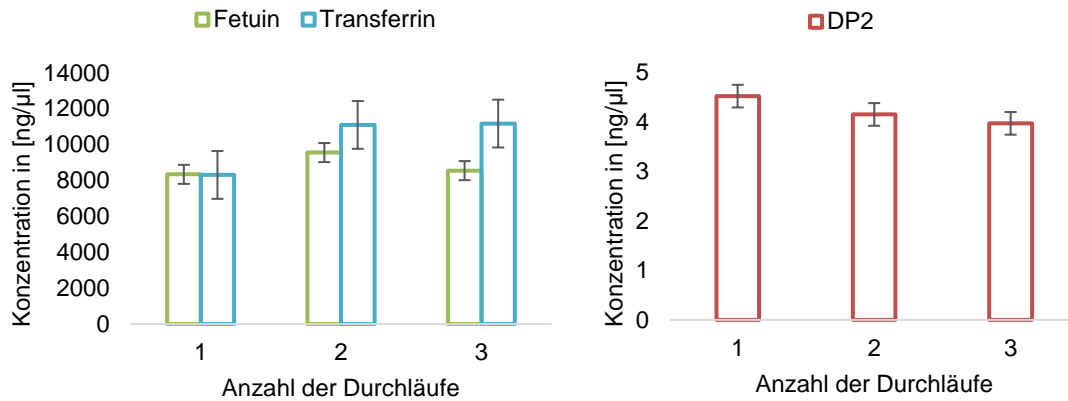


Abbildung 31: Quantifizierung von Neu5Ac in Fetuin, Transferrin und DP2 nach Hydrolyse und Derivatisierung

Auf der x-Achse ist die Anzahl der Versuche und auf der y-Achse die Konzentration von Neu5Ac in ng/µl dargestellt. Der Mittelwert (MW) für Fetuin beträgt 8820,45 ng/µl und die Standardabweichung (SD) 530,53 ng/µl. Der MW für Transferrin beträgt 10196,97 ng/µl und die SD 1332,25 ng/µl. Der MW für DP2 beträgt 4,21 ng/µl und die SD 0,2 ng/µl.

4.5.2 Derivatisierung ohne Hydrolyse

In der Versuchsreihe einer direkten milden Derivatisierung, ohne vorangegangener kompletter Hydrolyse, betrug die durchschnittliche Konzentrationsmenge von Fetuin etwa 56 ng/µl. Im Vergleich hierzu wurde in den vorherigen Testverfahren, mit vorangegangener Hydrolyse, durchschnittlich ca. 8820 ng/µl Fetuin festgestellt. Sowohl das Trennverfahren als auch die quantitative Analyse war der oben beschriebenen Methode unter Punkt 4.5.1 identisch.

Die Analyse von Transferrin und DP2 erbrachten ebenfalls, im Vergleich zur vorherigen Versuchsreihe, niedrigen Nachweis von Neu5Ac. Um die Verhältnisse der Versuchsreihen zu veranschaulichen sind die jeweiligen Proben, in beiden Versuchsreihen (Derivatisierung mit und ohne eine Hydrolyse), im Folgenden graphisch gegenübergestellt.

Ergebnisse

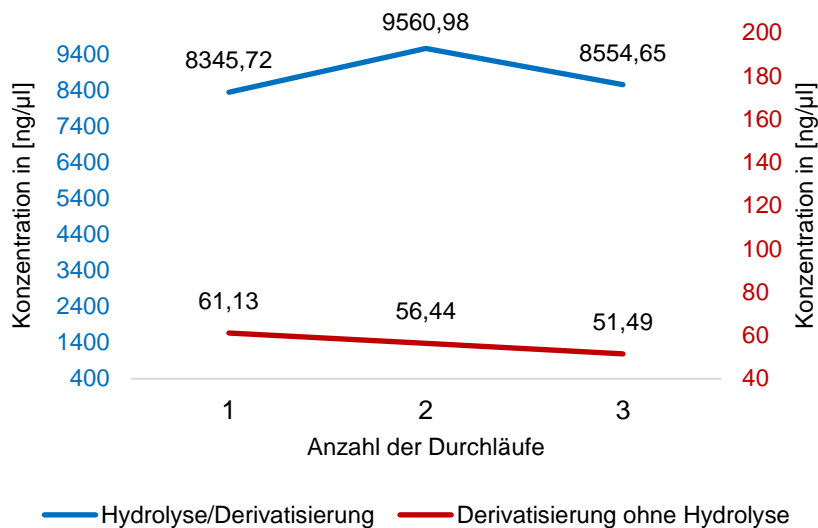


Abbildung 32: Vergleich der Konzentrationsmenge von Neu5Ac in Fetuin mit und ohne einer vorangegangener Hydrolysereaktion

Die Neu5Ac-Werte, die mittels zusätzlicher Hydrolyse bestimmt wurden, sind in Blau dargestellt (linke Skalierung). In Rot sind die Werte ohne vorangegangener Hydrolyse dargestellt (rechte Skalierung).

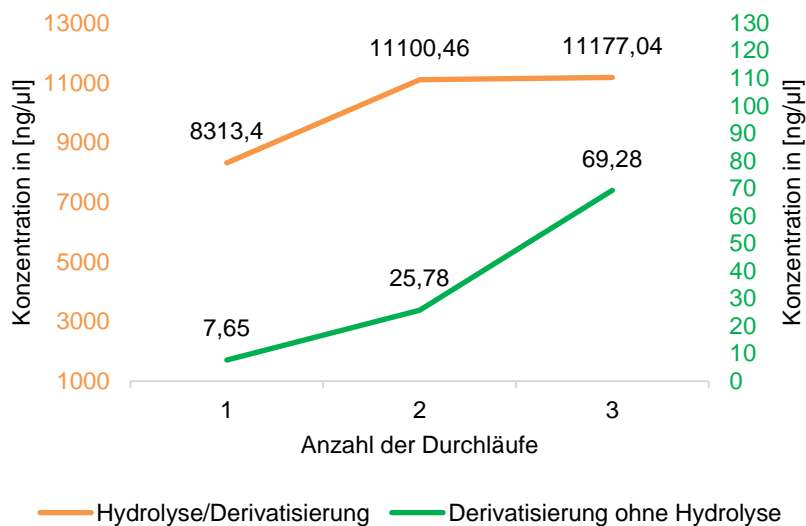


Abbildung 33: Vergleich der Konzentrationsmenge von Neu5Ac in Transferrin mit und ohne einer Hydrolysereaktion

Die Neu5Ac-Werte, die mittels zusätzlicher Hydrolyse bestimmt wurden, sind in Orange dargestellt (linke Skalierung). In Grün sind die Werte ohne vorangegangener Hydrolyse dargestellt (rechte Skalierung).

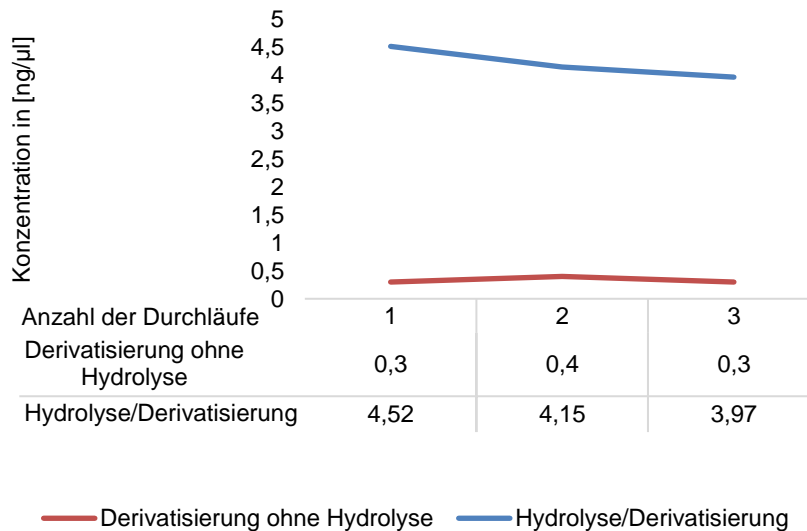


Abbildung 34: Vergleich der Konzentrationsmenge von Neu5Ac in DP2 mit und ohne einer Hydrolysereaktion

Die Neu5Ac-Werte, die mittels zusätzlicher Hydrolyse bestimmt wurden, sind in Blau dargestellt. In Rot sind die Werte ohne vorrangegangener Hydrolyse dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in den Versuchsreihen mit durchgemachter Hydrolysereaktion, die Konzentrationsmenge von Neu5Ac in allen Proben, unter Beachtung zur Vergleichsgruppe, erwartungsgemäß um ein Vielfaches erhöht war. Aufgrund der Hydrolyse war eine komplette Freisetzung aller Sialinsäuren gegeben. Die Ergebnisse spiegeln somit die maximale Menge an Neu5Ac in den jeweiligen Proben wider.

Bei fehlender kompletter Hydrolysereaktion wurde, im Fall von Fetuin, 0,6 Prozent von Neu5Ac detektiert. Das bedeutet, dass unter Beachtung der oben beschriebenen maximalen Menge, ca. 99,4 Prozent aller Sialinsäuren nicht von ihren Glykanen abgespalten wurden. In den Versuchsproben von Transferrin betrug der prozentuelle Anteil von freien Sialinsäuren ca. 0,3 Prozent. Im Gegensatz zu analysierten Glykoproteinen (α 2,3-, α 2,6-Verbindungen) erbrachte die Analyse von DP2 (α 2,8-Verbindungen), unter denselben Rahmenbedingungen, einen Anteil von etwa 7 Prozent an Neu5Ac (Abbildung 35).

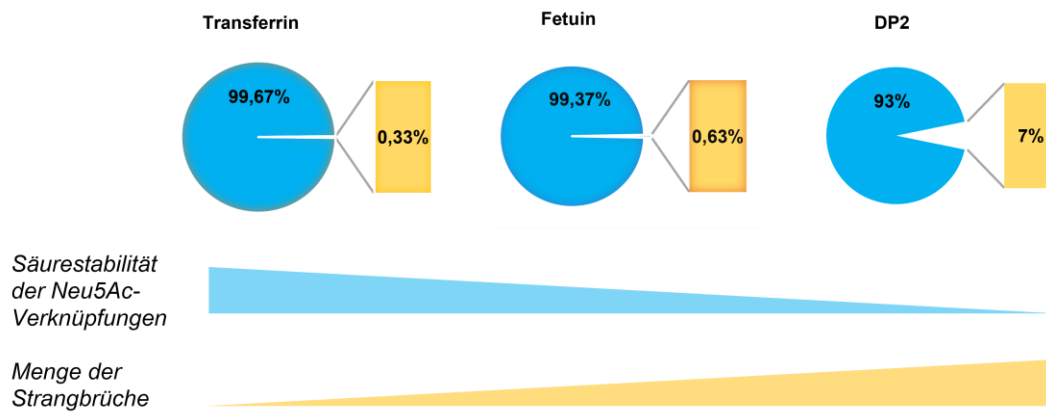


Abbildung 35: Gegenüberstellung von Fetuin, Transferrin und DP2 nach partieller Hydrolyse

In der Versuchsreihe mit partieller Hydrolyse zeigte sich der Neu5Ac Anteil mit etwa 7 % von Gesamtmenge in der Probe DP2 am höchsten. Das Glykoprotein Transferrin weist hingegen den geringsten Anteil vor.

In Anbetracht der Fragestellung und unter Berücksichtigung der jeweiligen chemischen Verknüpfungen der einzelnen Proben lässt sich folgendes dokumentieren: Die kovalente α 2,3-Verbindungen von Sialinsäure an Glykanen lässt sich durch eine milde Derivatisierung leichter brechen als eine α 2,6-Verbindung. Die α 2,8-Verbindung zeigt sich am wenigsten säurestabil, sodass die Wahrscheinlichkeit an internen Strangbrüchen, unter milder Derivatisierung, am höchsten ist. Es ist somit zu erwarten, dass im Rahmen der oben genannten Derivatisierung von PolySia-Ketten, mit höherem Ausmaß an internen Strangbrüchen, als die Spaltung von terminalen Sialinsäureresten zu rechnen ist.

5. Diskussion

Polysialinsäuren sind aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen und ihr ubiquitäres Vorkommen von besonderer Relevanz für die Wissenschaft. Sie können durch die Bildung von Polymeren eine unterschiedliche Anzahl an Kettenlängen vorweisen. Laut aktuellen Studien geht eine Abweichung ihrer Kettenlänge vom Normwert, mit diversen Krankheitsbildern bei Menschen und Säugetieren einher (Dall'Olio et al. 2014) (Livingston et al. 1988). Für die Bestimmung von Oligo-/PolySia-Ketten stehen zwar aktuell verschiedene Techniken zur Verfügung, diese sind jedoch für eine tatsächliche Bestimmung der *in vivo* vorkommenden PolySia-Ketten nicht optimal geeignet. Die Ergebnisse werden zum größten Teil durch die neu entstandenen Strangbrüche, welche im Rahmen der Derivatisierung und der Hydrolyse auftreten, beeinflusst. Dem Ausmaß der internen Strangbrüche wird aktuell eine untergeordnete Rolle zugesprochen.

Das Ziel dieser Dissertation bestand darin, die genannten Strangbrüche mittels HPLC näher zu charakterisieren, um so Rückschlüsse über den tatsächlichen Polymerisationsgrad der Probe ziehen zu können. Dabei waren insbesondere folgende Aspekte von Relevanz:

1. Inwiefern spiegeln die chromatographischen Darstellungen der PolySia Analyse mittels HPLC, die tatsächliche Kettenlängenverteilung der *in vivo* vorkommenden PolySia, wider.
2. Welche Rolle nimmt die milde Derivatisierung bei der Entstehung von internen Strangbrüchen ein.
3. Welche der Verknüpfungen der PolySia-Ketten ($\alpha 2,3$; $\alpha 2,6$ oder $\alpha 2,8$) spaltet sich am wahrscheinlichsten unter der milden Derivatisierung.
4. Inwiefern hängt das Ausmaß der Strangbrüche vom Polymerisationsgrad der zu untersuchenden Probe ab.

Im Folgenden wird auf die genannten Aspekte eingegangen und die Ergebnisse dieser Arbeit kritisch diskutiert.

Fraktionierung und Quantifizierung von Polysialinsäuren

Die HPLC wird aufgrund ihres breiten Spektrums an Funktionalität in verschiedenen Wissenschaftsbereichen angewandt. Insbesondere die Ionenaustauschchromatographie spielt, aufgrund der hohen Selektivität und Sensitivität, in der Analyse von Kohlenhydraten eine zentrale Rolle. Für die Kettenlängenanalyse von Polysialinsäuren ist eine fluoreszenzbasierte Detektoranalyse mittels DMB/HPLC-Methode zurzeit am besten geeignet auch wenn bekannt ist, dass interne Strangbrüche vorkommen (Guo et al. 2021) (Tiralongo und Martinez-Duncker 2013).

Für eine optimale Trennung der Polysialinsäuren wurde in dieser Arbeit die Gradientenelution angewandt. Im Gegensatz zur isokratischen Trennung zeichnet sich diese durch eine hohe Auftrennungsrate aus, setzt jedoch eine optimale Anpassung der Gradienten als auch der Eluentenzusammensetzung voraus. Die Optimierung der Gradienten kann sich, je nach Eluent, ändern und bedarf einen hohen zeitlichen Aufwand. In diesem Beispiel waren mehr als 20 Versuche und weitere Anpassungen notwendig, um das gewünschte Zielergebnis für die präperative Kettenlängenbestimmung mittels DNAPac™ PA-100 Säule zu erreichen (Abbildung 15). Dabei wurden Kriterien wie die Anzahl der Kettenlängen, Peakverteilung als auch die Signalstärke berücksichtigt. Die HPLC zeichnet sich grundsätzlich durch eine einfache Handhabung aus. Sofern eine passende Einstellung für die gewünschte Analyse vorliegt, kann diese jederzeit repetitiv angewandt werden.

Die Probenaufgabe auf die präparativen DNAPac™ PA-100 Säule erfolgte über eine manuelle Injektion. Im Gegensatz zum Autosampler ist dies mit einem hohen Zeitaufwand und der Präsenz einer durchzuführenden Person verbunden. Darüber hinaus können Fehler und Verzögerungen bei der manuellen Injektion auftreten, welche zur Verfälschung der Ergebnisse beitragen könnten.

Für die Aufsammlung der Proben in Glaskolben ist eine präzise Arbeitsweise notwendig. Da im Falle der unmarkierten PolySia-Fraktionierung keine visuelle Darstellung der Peaks möglich ist, wurde sich bei der Fraktionierung an die Retentionszeiten der Standardproben orientiert. Hierbei stellte sich folgende Problematik dar. Erstens, die Behandlung der Standard – und Blindproben mussten identisch verlaufen, um während der Fraktionierung der Blindproben so wenig Unterschiede wie möglich zu haben. Dabei waren sowohl die Rahmenbedingungen wie Temperatur und Dauer der Derivatisierung, als auch die Stoffmenge der Proben entscheidend.

Des Weiteren ist der hohe Zeitaufwand hervorzuheben. Die Gradienten für die Kettenlängenbestimmung für die DNAPac™ PA-100 Säule betrug für einen Durchlauf 145 min. Hierzu ist ein zusätzlicher Waschgang der Säule mit 60 min hinzuzurechnen. Somit ergeben sich für die Fraktionierung von einer Probe etwa 205 min.

Diskussion

Die gesammelten Fraktionen konnten mittels Anionenaustauschchromatographie rechromatographiert und verifiziert werden (Abbildung 16). Die definierten Kettenlängenabschnitte entsprachen der zuvor festgelegten Fraktionen. Die gesammelten Blindproben, welche hierfür erneut derivatisiert wurden, präsentierten sich, verglichen mit der Standardprobe, chromatographisch als nahezu identisch. Ferner konnten die neu entstandenen Strangbrüche chromatographisch dargestellt und diese von der festgelegten Kettenlängenfraktion differenziert werden. Ein relevantes Merkmal lag darin, dass ein Unterschied zwischen den Signalfächern der gesammelten Fraktionen und der neu entstandenen Strangbrüche zu sehen war. Es fiel hierbei besonders auf, dass die genannten Strangbrüche erst ab der Kettenlänge 16 chromatographisch zu objektivieren waren, während eine nähere Identifizierung oder Differenzierung dieser, in den kurzen Kettenlängenabschnitten (2 - 16) nicht adäquat möglich war (siehe Abbildung 16). Vergleichend hierzu waren bei steigender Kettenlängenfraktion (KL 26 - 35) auch eine quantitative Zunahme der Strangbrüche zu beobachten. Zudem zeichnet sich diese durch eine steigende Signalfäche sowie ein breites Spektrum an Kettenlängen aus. Diese Beobachtung bestätigte sich auch in der Analyse der zunehmenden Kettenlängenfraktion, ab KL 35 und der danach gesammelten Fraktionen (Methoden, S. 29, Chromatogramme nicht abgebildet). Spätestens zu diesem Abschnitt der Arbeit stellte sich die Frage, inwiefern die internen Strangbrüche mit dem Polymerisationsgrad der zur untersuchenden Probe zusammenhängt. Eine positive Korrelation war angesichts der quantitativen Analyse bereits anzunehmen. Eine Verfälschung der Ergebnisse durch Verunreinigung konnte durch repetitive Datenerhebungen widerlegt werden.

Zuletzt fand eine Quantifizierung der Fraktionen mittels Superspher 100 C-18 Säule, 250 × 40 mm (Darmstadt, Deutschland) statt. Hiermit konnte die Stoffmenge von Neu5Ac in den fraktionierten Kettenlängenabschnitten bestimmt werden. Mit Hilfe der stets mitgeführten Standardproben sowie der ermittelten Kalibrationsgerade, wurde die Fehlerquote so gering wie möglich gehalten. Der Abweichungsquotient betrug jeweils nahezu eins. Durch die Erstellung von mehreren Standardproben, in diversen Konzentrationen, war eine hohe Genauigkeit der Analyse gegeben.

Mögliche Fehlerursachen bei den Analysen können u.a. durch die Festlegung der Baseline sowie bei der mathematischen Berechnung der Testergebnisse entstanden sein. Um diese Fehler so gering wie möglich zu halten, ist ein hoher Kenntnisstand über die Analyse der Chromatographie sowie eine präzise Arbeitsweise essenziell.

In dieser Arbeit fand eine Analyse der Neu5Ac statt, während weitere Sialinsäurearten wie KDN und NeuGc nicht berücksichtigt wurden. Es ist jedoch hervorzuheben, dass bei Menschen keine PolySia-Ketten mit den Sialinsäuren Neu5Gc und KDN gebildet werden (Wang 2012).

Vergleich der DMB-Markierung von reduzierter und nativer PolySia

Bei Säugetieren besteht Polysialinsäure aus α 2,8-verknüpften Neu5Ac-Resten (siehe Abbildung 2) und die Polymerkette ist an ihrem reduzierenden Ende über eine α 2,3- oder α 2,6-Verbindung mit ihren Glykoproteinen verknüpft. Aufgrund der Anzahl der vorliegenden Neu5Ac-Einheiten werden Sialinsäurepolymere grundsätzlich in Mono-; Oligo- und Polysialinsäuren eingeteilt.

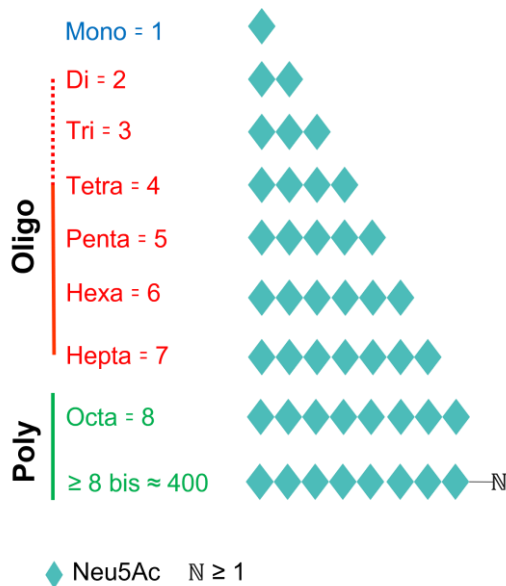


Abbildung 36: Polymerisationsgrad von Sialinsäure

Polysialinsäuren werden je nach Anzahl der Neu5Ac-Monomere in Oligo- und Polysialinsäuren eingeteilt. Eigendarstellung, angelehnt an (Sato und Kitajima 2019).

Angesichts des strukturellen Aufbaus der PolySia-Ketten wurde im Folgenden die Frage thematisiert, inwiefern die entstandenen Strangbrüche, als Folge der internen Spaltungen und nicht der terminalen Einheiten von PolySia-Ketten, zu werten sind. Zudem sollte geklärt werden, ob eine mögliche Korrelation zwischen der entstandenen Strangbrüche und dem Polymerisationsgrad der untersuchenden Probe vorliegt.

Die Fluoreszenzmarkierung des reduzierenden Endes kann durch eine vorhergehende Reduktion verhindert werden. Durch die Inaktivierung des reduzierenden Endes der PolySia, infolge der Reduzierung der dort sitzenden Sialinsäure, konnten so dessen Auswirkung auf die Ergebnisse der Analyse gezielt eingestellt werden (Abbildung 19). Die Resultate bestätigen einerseits, dass es im Rahmen der milden DMB-Markierung von

Polysialinsäuren, zu internen Strangbrüchen kommt (Inoue und Inoue 2003) und andererseits zeigen sie, dass das Ausmaß der Strangbrüche mit dem Polymerisationsgrad der zu untersuchenden Probe positiv korreliert. Dabei präsentierte sich, in der Analyse von kurzen PolySia Analyten, ein geringer Anteil an internen Strangbrüchen, als in der Analyse von langen Kettenlängenfraktionen. Bei steigenden Polymerisationsgrad des Analyts stieg auch der Anteil der internen Strangbrüche. Bei zunehmendem Ausmaß der Strangbrüche, war in unserem Fall, ab KL 35, der zuvor festgelegte Fraktionsbereich chromatographisch nicht eindeutig zu objektivieren (siehe Abbildung 28).

Die saure Bedingung, welche im Rahmen der milden Derivatisierung entsteht, ist am ehesten als Ursache für die Spaltung der PolySia-Ketten und somit als Entstehungsgrund der internen Spaltprodukte zu erwähnen. Die Rahmenbedingungen der Fluoreszenzmarkierung der Polysialinsäure wurden zuletzt von Sato et al. optimiert und für die Analyse mittels HPCL-FD Methode größtenteils standardisiert. Im Vergleich zum gängigen Derivatisierungsprozess findet dieser unter niedriger Temperatur und bei längerer Reaktionszeit statt. Grundsätzlich ist ein saurer Bereich der Lösung, für die Freisetzung der terminalen Sialin- bzw. PolySia-Ketten von deren Glykane, für eine HPLC-FD basierte Analyse, gewünscht und unabdingbar. Im Gegensatz hierzu ist eine Spaltung der internen Kettenlängen unerwünscht, da diese die Beurteilung der tatsächlich *in vivo* vorkommenden PolySia-Kettenlängen negativ beeinflussen können.

Die milde Derivatisierung von PolySia ist aktuell am ehesten für eine optimale Fluoreszenzmarkierung von PolySia geeignet. Die chemischen Rahmenbedingungen wie Temperatur und chemische Zusammensetzung der Lösungen sind so angepasst, dass weitere Veränderungen mit zunehmender Spaltung oder mit geringer Derivatisierung der zu untersuchenden Probe einhergehen würde. Theoretisch ist eine enzymatische Spaltung der PolySia-Ketten von deren Glykanen möglich, allerdings ist ein entsprechendes Enzym zur Trennung von α 2,3- oder α 2,6- Verknüpfungen von PolySia aktuell nicht bekannt. Zudem wäre eine enzymbasierte Methode durch eine hohe Enzym-Spezifität im Einsatzbereich stark eingeschränkt und würde mit hohen Kosten einhergehen.

Die Spaltung von internen Kettenlängen, im Rahmen der milden DMB-Markierung von Polysialinsäuren, ist grundsätzlich bekannt (Nakata und Troy 2005a). Eine nähere Analyse dieser Kettenlängen wurde jedoch bis dato nicht erforscht. Nach aktuellem Wissensstand wird davon ausgegangen, dass im Zuge der Derivatisierung, es hauptsächlich zur Spaltung der terminalen Sia- und PolySia-Monomeren vom Glykokonjugate kommt. Die Spaltung der internen Kettenlängen und dessen Ausmaß wird als geringgradig und nahezu bedeutungslos eingestuft (Inoue und Inoue 2003). Inwiefern diese Annahmen stimmen, werden im Folgenden diskutiert.

Charakterisierung der Abspaltung und DMB-Markierung von Sialinsäuren bei Glykoproteinen

Basierend auf die oben genannte Annahme, dass im Rahmen der milden DMB-Markierung von PolySia nur geringe Anteile an interne Strangbrüche entstehen würden, kann eine Analyse der PolySia zu einer falschen Beurteilung führen. Es ist hierbei erneut hervorzuheben, dass Sia-Monomere durch eine $\alpha 2, 8$ -Verbindung miteinander verknüpft sind, während die Bindung an den Glykoproteinen zumeist in Form von $\alpha 2,3$ - oder $\alpha 2,6$ -Verbindung vorliegt (Abbildung 30). Stützend auf die bereits erwähnte Annahme, würde das bedeuten, dass die $\alpha 2, 8$ -Verbindung säurestabiler sei als die $\alpha 2,3$ - oder $\alpha 2,6$ -Verbindung. In Anbetracht der formulierten Annahmen, war das Ziel der Untersuchungen, herauszufinden, ob es einen Unterschied zwischen den genannten Sialinsäureverbindungen ($\alpha 2,3$ -; $\alpha 2,6$ - und $\alpha 2, 8$ -) und der Säurestabilität gibt. Dadurch sollten Rückschlüsse auf die Lokalisation der Strangbrüche erzielt werden.

Die Resultate der Arbeit zeigen auf, dass sich interne Sialinsäureketten mit $\alpha 2,8$ -Verbindungen am häufigsten unter milden Derivatisierungsbedingungen spalten lassen als die $\alpha 2,3$ - oder die $\alpha 2,6$ -Verbindungen. Die Verknüpfungen der $\alpha 2,3$ - und $\alpha 2,6$ -Verbindung zeigten zwar untereinander einen signifikanten Unterschied, waren jedoch im Vergleich zur oben genannten $\alpha 2,8$ -Bindung nahezu bedeutungslos gering. Die Glykoproteine, Fetuin und Transferrin, enthalten Monosialinsäuren, wodurch eine Verfälschung der Testergebnisse, als Folge von internen Strangbrüchen, unmöglich ist. Die erhobenen Daten spiegelten in dieser Versuchsreihe lediglich die Spaltung der Sialinsäuren von deren Glykanen wider. Die Versuchsgruppe DP2 enthält wiederum keine Bindung an Glykanen und dient als Nachweis für die Spaltung der $\alpha 2, 8$ -Verknüpfungen.

Somit konnte gezeigt werden, dass die neu entstandenen Strangbrüche am ehesten als Folge von internen Strangbrüche zu werten sind. Als Ursache hierfür ist die Trennung der $\alpha 2,8$ -PolySia-Ketten, unter der milden Derivatisierungsprozedur, auszumachen. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass nur ein geringer Anteil der untersuchten Probe, unter milder Derivatisierung, zu detektieren war. Der größte Anteil der Probe, ca. 93 Prozent, war durch die genannte Derivatisierungsprozedur nicht erfasst.

Im letzten Abschnitt wurde der Zusammenhang zwischen dem Polymerisationsgrad des Analyts und der entstehenden Strangbrüche erläutert. Unter Berücksichtigung der Säurestabilität der $\alpha 2,8$ -Verknüpfungen und des Polymerisationsgrades, der zu untersuchenden Probe, lässt sich dieser Zusammenhang wie folgt erklären: Die kurzen PolySia-Ketten enthalten einen geringeren Anteil an $\alpha 2,8$ -Verknüpfungen pro Kette als die Langen. Folglich können bei höherem Polymerisationsgrad mehr Spaltungen entstehen,

welche zur Bildung von Spaltprodukten führen. Ergänzend hierzu reagiert nur ein gewisser Anteil der zur Verfügung stehenden Monomeren mit der DMB, sodass die Wahrscheinlichkeit diese fluorometrisch zu detektieren, bei geringem Anteil an Neu5Ac, weiterhin sinkt. Entsprechend konnten bei der Analyse von niedrigen Neu5Ac-Einheiten, insbesondere KL 2 bis 6, keine signifikanten Strangbrüche festgestellt werden (Abbildung 21). Im Gegensatz hierzu ist bei längeren PolySia-Ketten die Möglichkeit für interne Strangbrüche höher.

Angesichts der zugrundeliegenden Daten ist davon auszugehen, dass die DMB/HPLC_FD basierte Analyse von PolySia nicht die tatsächliche Kettenlänge der untersuchenden Probe wiedergibt. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass es unter der milden Derivatisierung zur Trennung von α 2,8 -Verbindungen kommt und nur ein minimaler Anteil der tatsächlichen Neu5Ac-Ketten chromatographisch festgehalten wird (siehe Abbildung 37). Der größte Teil der Strangbrüche wird unter den milden Bedingungen nicht markiert und kann in der chromatographischen Darstellung nicht erfasst werden. Ohne die genannten Punkte zu berücksichtigen, kann es zu einer falschen Interpretation des Chromatogramms kommen, welche beinhaltet, dass die untersuchte Probe mehr kurze als lange PolySia-Ketten enthält.

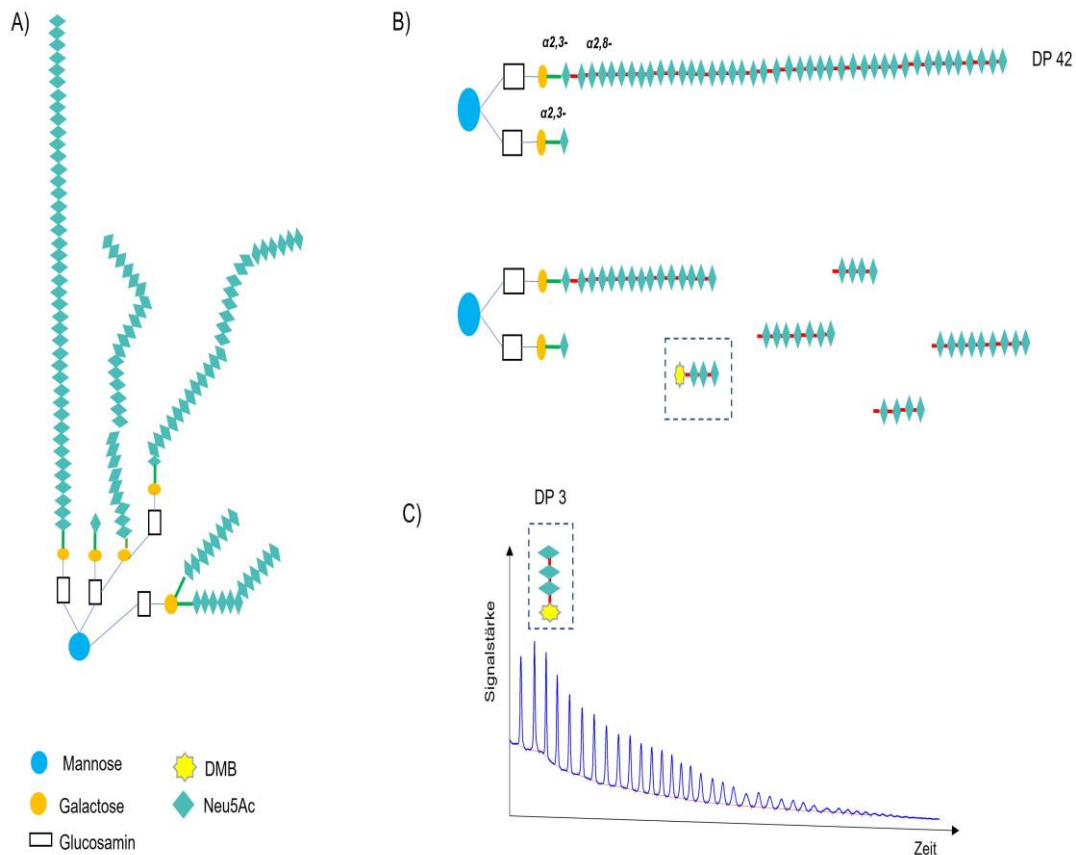


Abbildung 37: Analyse von PolySia

A) Schematische Darstellung von Polysialinsäureketten an einem Glykokonjugat B) Es ist nur ein Anteil der PolySia-Zweige dargestellt. Neu5Ac-Monomere sind untereinander durch eine $\alpha 2,8$ -Verbindungen miteinander verknüpft, die Bindung der Sia- und PolySia an ihre Glykoproteine ist durch die $\alpha 2,3$ -Verbindungen gekennzeichnet. Unter der milden Derivatisierung von PolySia kommt es zur Spaltung von $\alpha 2,8$ -Verbindungen und DMB-Markierung von Strangbrüchen. Der große Anteil von Strangbrüchen wird nicht fluoreszenzmarkiert und kann nicht chromatographisch detektiert werden. C) Chromatographische Darstellung des in B) markierten Strangbruchs.

Analyse von Gewebeproben – Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit fand die Analyse und der Nachweis von Polysialinsäureketten in Mäusehirnen statt. Dabei konnten PolySia mit bis zu 30 Kettenlängen mittels Anionenaustauschchromatographie getrennt und chromatographisch dargestellt werden (siehe Abbildung 12). Mit zunehmender Detektionszeit nahm die Signalstärke der Proben stetig ab, sodass der Eindruck erweckt wurde, dass in der oben genannten Probe deutlich mehr kurze als lange PolySia-Ketten vorliegen würden. Diese Annahme stützt sich im Wesentlichen auf zwei Punkte. Erstens, es wird angenommen, dass im Rahmen der

milden Derivatisierung von PolySia, lediglich ein geringer Anteil an internen Strangbrüchen entstehen würde. Dieser Gedankengang basiert auf der Vorstellung, dass durch die Hydrolyse hauptsächlich die terminalen Neu5Ac-Einheiten und nicht die internen Ketten gespalten werden. Zweitens, es wird davon ausgegangen, dass ein großer Anteil der PolySia-Ketten durch die genannte Fluoreszenzmarkierung markiert wird.

Das primäre Ziel dieser Arbeit bestand darin, die oben beschriebenen Strangbrüche näher zu klassifizieren. In diesem Kontext sollte auf die Frage eingegangen werden, inwiefern die HPLC-FD basierte Analyse der Polysialinsäuren der tatsächlichen Kettenlängenverteilung der Probe entsprechen würde. Die kettenlängenabhängige Funktionsweise der PolySia sowie die Relevanz ihrer tatsächlichen Kettenlängenbestimmung wurde in dieser Arbeit mehrmals erläutert und soll hier erneut hervorgehoben werden.

In der folgenden Abbildung (siehe Abbildung 38) ist die Analyse von Polysialinsäureketten aus Mäusehirnen erneut dargestellt. Dabei ist das Chromatogramm einer von uns erstellten Abbildung gegenübergestellt. Letzteres basiert auf Grundlage der Resultate dieser Arbeit und soll die tatsächliche Kettenlängenverteilung der Probe schematisch darstellen. Im Gegensatz zu den gewonnenen Ergebnissen zur Kettenlängenverteilung im postnatalem Mäusehirn, nämlich dass weniger lange als kurze PolySia-Ketten vorliegen, ist unter Berücksichtigung dieser Dissertation davon auszugehen, dass in Mäusehirnen mehr lange als kurze PolySia-Ketten vorhanden sind. Dies ist wichtig, um die Bedeutung von Polysialinsäureketten für die menschliche Physiologie detailliert aufzuklären (Inoue et al. 2001). Bisher ist man davon ausgegangen, dass Kettenlängen mit mehr als 20 Sialinsäuren eher Subfraktionen in Blut, Milch und Ejakulat oder aber Organen wie das Gehirn darstellen (Yang et al. 2020) (Yabe et al. 2003) (Zlatina et al. 2018). Solch lange Ketten sind jedoch oft nötig, um Interaktionen mit Bindungspartnern von PolySia einzugehen. Ein Beispiel hierfür sind Histone. Laut Galuska et al. werden Kettenlängen von mehr als 20 Sialinsäuren benötigt (Galuska et al. 2017c) (Shahraz et al. 2022) (Shahraz et al. 2015). Ähnlich lange Ketten sind auch bei Lactoferrin Voraussetzung. Lactoferrin ist ein multifunktionales Glykoprotein (Einerhand et al. 2022). Laut Kühne et al. trägt die Bindung von PolySia an Lactoferrin dazu bei, die Freisetzung von NET zu verhindern sowie die Bindung an bereits freigesetzten NET-Fasern zu modulieren (Kühnle et al. 2019a) (Kühnle et al. 2019b). Andere Bindungspartner brauchen hingegen kürzere Ketten. Beispiele hierfür sind die neurotrophischen Faktoren FGF2 und BDNF, bei denen jeweils Kettenlängen von 17 und 12 notwendig sind (Kanato et al. 2008) (Ono et al. 2012).

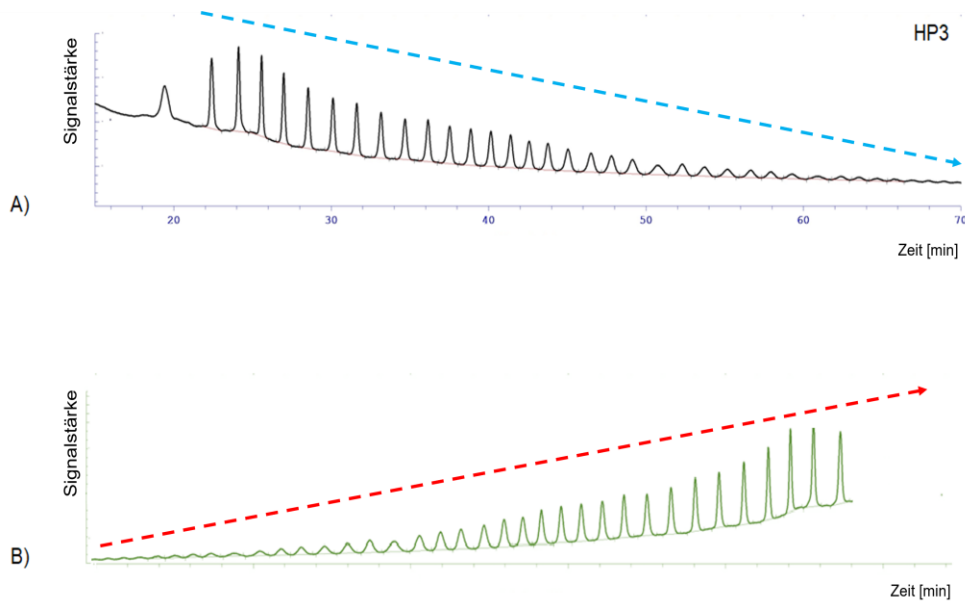


Abbildung 38: Hirnprobe drei – mögliche Kettenlängenverteilung

A) Chromatogramm aus der Abbildung 12. Entsprechend dieser Abbildung ist davon auszugehen, dass in diese Probe vermeintlich mehr kurze als lange PolySia-Ketten vorliegen würden (blaue gestrichelte Linie).
 B) Ist ein Spiegelbild der Abbildung A. Die tatsächliche PolySia-Kettenverteilung könnte möglicherweise so aussehen. Stützend auf unsere Ergebnisse ist es davon auszugehen, dass in den untersuchenden Mäusehirn mehr lange PolySia-Ketten vorliegen als kurze (rote gestrichelte Linie).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Sia-Verknüpfungen (α 2,3-; α 2,6- und α 2,8-), hinsichtlich der Säurestabilität, vorliegt. Im Gegensatz zur bisherigen Annahme, ist davon auszugehen, dass die neu entstandenen Strangbrüche, im Rahmen der milden Derivatisierung der PolySia, mit größter Wahrscheinlichkeit als interne Strangbrüche zu werten sind. Die α 2,8-Verbindungen zeigten sich im Vergleich zu α 2,3-; α 2,6- Verbindungen am wenigsten säurestabil. Zudem lässt sich feststellen, dass die internen Strangbrüche mit dem Polymerisationsgrad der zur untersuchenden Probe stark korreliert. Je größer die PolySia-Ketten, desto stärker die internen Strangbrüche. Ferner ist hervorzuheben, dass die Darstellung, laut vorliegender Daten, lediglich einen geringen Anteil an PolySia zeigt. Es konnte gezeigt werden, dass nur ein minimaler Anteil der Probe unter den genannten Bedingungen durch die DMB markiert wird und ein großer Anteil mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht detektiert wurde.

Zur Lösung dieses Problems ist die fluoreszenzbasierte HPLC-Methode allein nicht in der Lage. Durch diese Dissertationsschrift sind jedoch die notwendigen Grundlagen vorhanden, um mathematische Modelle zu entwickeln, mit deren Hilfe die Ausgangskettenlänge kalkuliert werden kann.

6. Zusammenfassung

Polysialinsäuren setzen sich aus α 2,8-verknüpften N-Acetylneuraminsäuren zusammen und kommen bei Wirbeltieren überwiegend als Modifikation des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls vor. Sowohl die Anzahl einzelner Monomere als auch ihre chemischen Verknüpfungen untereinander sind relevant für das jeweilige Vorkommen und deren Funktionen. So sind sie beispielweise an der neuronalen Zellmigration und der Myelinisierung, Axonenwachstum sowie der Synapsenbildung und an der Neurogenese beteiligt. In aktuellen Studien wurde ein starker Zusammenhang zwischen ihrer biologischen Funktion und dem Polymerisationsgrad nachgewiesen. Abhängig von ihrer Kettenlänge können sie einerseits die Zytotoxizität von Histonen, die Migration von Vorläuferzellen und Metastasen beeinflussen. Eine Abweichung ihrer Kettenlänge vom Normwert wird aktuell mit diversen Pathologien beim Menschen zusammengebracht, während ihre komplette Abwesenheit in den knock-out Mausmodellen mit der Letalität eines Organismus beschrieben ist. Die Bestimmung der PolySia-Ketten spielt, zum Verständnis ihre Funktionen sowie ihre Rolle in der heutigen Medizin, eine entscheidende Rolle. Mit den aktuell zur Verfügung stehenden Methoden ist eine tatsächliche Bestimmung der *in vivo* vorkommenden PolySia-Ketten nicht adäquat möglich. Unter diesen ist die DMB/HPLC-FD Methode für die Kettenlängenbestimmung am besten geeignet, hat jedoch auch relevante Nachteile. Im Rahmen der Fluoreszenzmarkierung der Probe entstehen Strangbrüche, welche die Analysedaten stark beeinflussen. In der heutigen Wissenschaft der Sialinsäure-Analytik werden die genannten Strangbrüche, unter der milden Derivatisierung, eher geringgradig eingeschätzt, was zu falschen Interpretationen der Analysedaten und somit zu eingeschränkten bzw. fälschlichen Rückschlüssen bezüglich der Analyse von PolySia führen kann.

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit konnte nachgewiesen werden, dass im Rahmen der milden Derivatisierung von PolySia interne Strangbrüche, in Folge der Spaltung von α 2,8-verknüpften Neu5Ac, entstehen. Zudem konnte der Nachweis erbracht werden, dass das Ausmaß der Trennungen, mit dem Polymerisationsgrad der Probe positiv korreliert. Im Gegensatz zum aktuellen Kenntnisstand, konnte aufgezeigt werden, dass die α 2,3- und α 2,6-Verknüpfungen an den Glykoproteinen einen minimalen und bedeutungslosen Einfluss an der Spaltung haben. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass der größte Anteil der tatsächlichen Kettenlänge durch die aktuellen Techniken nicht erfasst werden. Die hier erlangten Ergebnisse bestätigen, dass die aktuelle Kettenlängenanalyse mittels DMB/HPLC-FD unter milden Bedingungen nicht den tatsächlichen Polymerisationsgrad widerspiegeln, sondern hauptsächlich Spaltprodukte. Die tatsächlich vorkommenden PolySia-Ketten sind nach den Ergebnissen dieser Arbeit, als viel länger anzunehmen, was bei der Diskussion über die biologischen Funktionen eine essenzielle Information darstellt.

7. Summary

Polysialic acids (PolySia) are composed of α 2,8-linked N-acetylneuraminic acids and occur in vertebrates predominantly as modifications of the neural cell adhesion molecule. Both the number of individual monomers and their chemical linkages to each other contribute to their respective occurrences and functions. For example, they are involved in neural cell migration and myelination, axon growth, synapse formation and neurogenesis. In recent studies, a strong correlation between their function and the degree of polymerization has been demonstrated. Depending on their chain length, they can influence the cytotoxicity of histones, the migration of progenitor cells as well as metastases. A deviation of their chain length from the normal value is currently associated with various pathologies in humans, while their complete absence in knock-out mouse models is described with the lethality of an organism.

The determination of PolySia chains is crucial for the understanding of their functions and their role in today's medicine. With the currently available methods, an actual determination of the PolySia chains occurring is not adequately possible *in vivo*. Among these, the DMB/HPLC-FD method is the most suitable for chain length determination but has relevant drawbacks. Within the fluorescence labelling of the sample, strand breaks occur, which strongly influence the analysis data. In today's science around the sialic acid analysis the mentioned strand breaks, under the mild derivatization, are estimated rather low which can lead to wrong interpretation of the analysis data and thus to limited or wrong conclusions about the analysis of PolySia.

In this dissertation, we demonstrated that within the mild derivatization of PolySia to internal strand breaks, because of the cleavage of α 2,8-linked Neu5Ac. Moreover, we demonstrated that the extent of the separations positively correlates with the degree of polymerization of the sample. In contrast to the current state of knowledge, we demonstrated that the α 2,3- and α 2,6-linkages on the glycoproteins contribute to an almost minimal and meaningless influence of the cleavages. On the contrary, it can be assumed that the largest fraction of native PolySia chain length is not detected by the current techniques. Our results confirm that the current chain length analysis by DMB/HPLC-FD under mild conditions does not reflect the actual degree of polymerization, but a fraction of internal strand breaks. According to our results, the actual occurring PolySia chains can be assumed to be much longer, which is an essential information when the biological functions of PolySia are discussed.

8. Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
Da	Dalton
DMB	1,2-Diamino-4,5-Methylenedioxybenzol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	Degree of Polymerization
E.coli	Escherichia coli
FD	Fluoreszenz-Detektor
FGF2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Protein 2
HP	Hirnprobe
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
kDa	Kilodalton
KDN	Desaminoneuraminsäure
KL	Kettenlänge
LC	Liquid Chromatography
M	Molare Masse
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
ℕ	Natürliche Zahlen
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
NET	Neutrophil extracellular traps
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	N-Glykolyneuraminsäure
OligoSia	Oligosialinsäure
PolySia	Polysialinsäure
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
Sia	Sialinsäure
SD	Standardabweichung
ST8SialI	α -N-Acetylneuraminid- α -2,8-Sialyltransferase 2
ST8SialIV	α -N-Acetylneuraminid- α -2,8-Sialyltransferase 4
STs	Sialintransferasen
TBA	Thiobarbitursäure
TFA	Trifluoressigsäure

9. Abbildungs- /Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Struktur der Sialinsäuren	2
Abbildung 2: Aufbau der PolySia	5
Abbildung 3: Die Auswirkung der Quantität und Qualität von PolySia auf das Krankheitsrisiko	6
Abbildung 4: Auswirkung der Polysialinsäuren auf NET	8
Abbildung 5: Strukturelle Aufbau der Transmembranproteine vom Typ II	9
Abbildung 6: Oxidierung von Neu5Ac	10
Abbildung 7: Einteilung der Chromatographie nach Aggregatzustand	12
Abbildung 8: Schematische Darstellung einer chromatographischen Trennung	13
Abbildung 9: Darstellung eines Chromatogramms	14
Abbildung 10: Klassische Zusammensetzung einer HPLC-Anlage	15
Abbildung 11: Schematische Darstellung einer HPLC-Säule	17
Abbildung 12: Chromatographische Darstellung von PolySia aus drei murinen Hirnproben	31
Abbildung 13: Chromatographische Trennung fluoreszenzmarkierter Colominsäure	32
Abbildung 14: Initiale Trennung von Colominsäure	33
Abbildung 15: Optimierte Trennung von Colominsäure	34
Abbildung 16: Rechromatographie von PolySia	35
Abbildung 17: Quantifizierung von Siamix	36
Abbildung 18: Quantifizierung der gesammelten Kettenlängenfraktionen	37
Abbildung 19: Hydrolyse und Derivatisierung mit Reduzierung der terminalen Sialinsäureketten	38
Abbildung 20: Analyse der ProbeR und ProbeD für die Kettenlängen 2-6	39
Abbildung 21: Analyse der KL 2 bis 6 für ProbeR und ProbeD	39
Abbildung 22: Analyse der KL 7 bis 17 für ProbeR und ProbeD	40
Abbildung 23: Mittelwerte und Standardabweichungen für KL 7 bis 17 in ProbeR und ProbeD	40
Abbildung 24: Analyse der KL 18 bis 26 für ProbeR und ProbeD	41
Abbildung 25: Mittelwerte und Standardabweichungen für KL 18 bis 26 in ProbeR und ProbeD	41
Abbildung 26: Analyse der KL 27 bis 35 für ProbeR und ProbeD	42
Abbildung 27: Mittelwerte und Standardabweichungen für KL 27 bis 35 in ProbeR und ProbeD	42
Abbildung 28: Analyse der KL 35 bis 55 für ProbeR und ProbeD	43

Abbildungs-/Tabellenverzeichnis

Abbildung 29: Mittelwerte und Standardabweichungen für KL 35 bis 55 in ProbeR und ProbeD	43
Abbildung 30: Schematische Darstellung der Verbindungen von Fetuin, Transferrin und DP2	45
Abbildung 31: Quantifizierung von Neu5Ac in Fetuin, Transferrin und DP2 nach Hydrolyse und Derivatisierung	46
Abbildung 32: Vergleich der Konzentrationsmenge von Neu5Ac in Fetuin mit und ohne einer vorangegangener Hydrolysereaktion	47
Abbildung 33: Vergleich der Konzentrationsmenge von Neu5Ac in Transferrin mit und ohne einer Hydrolysereaktion	47
Abbildung 34: Vergleich der Konzentrationsmenge von Neu5Ac in DP2 mit und ohne einer Hydrolysereaktion	48
Abbildung 35: Gegenüberstellung von Fetuin, Transferrin und DP2 nach partieller Hydrolyse	49
Abbildung 36: Polymerisationsgrad von Sialinsäure	53
Abbildung 37: Analyse von PolySia	57
Abbildung 38: Hirnprobe drei – mögliche Kettenlängenverteilung	59
Tabelle 1: Einteilung der Ionenaustauscher	20
Tabelle 2: Gradientenelution zur Kettenlängenbestimmung	24
Tabelle 3: Laufmittel für Superspher 100 RP-18e-Säule	26
Tabelle 4: Gradient für Neu5Ac-Analyse per Superspher 100 RP-18e-Säule	26
Tabelle 5: Peakflächen der Neu5Ac für vier verschiedenen Siamix-Mengen	36
Tabelle 6: Analysierte Menge an Neu5Ac	37

10. Literaturverzeichnis

Aguilar M-I (2003): HPLC of Peptides and Proteins. Methods and Protocols.

Al-Saraireh YMJ, Sutherland M, Springett BR, Freiburger F, Ribeiro Morais G, Loadman PM, Errington RJ, Smith PJ, Fukuda M, Gerardy-Schahn R, Patterson LH, Shnyder SD, Falconer RA (2013): Pharmacological inhibition of polysialyltransferase ST8Siall modulates tumour cell migration. PLoS ONE 8: e73366. DOI 10.1371/journal.pone.0073366.

Aminoff D (1961): Methods for the Quantitative Estimation of N-acetylneuraminic Acid and their Application to Hydrolysates of Sialomucoids. Biochem J 81: 384–392. DOI 10.1042/bj0810384.

Angata K, Suzuki M, Fukuda M (1998): Differential and cooperative polysialylation of the neural cell adhesion molecule by two polysialyltransferases, PST and STX. J. Biol. Chem. 273: 28524–28532. DOI 10.1074/jbc.273.43.28524.

Angata K, Suzuki M, McAuliffe J, Ding Y, Hindsgaul O, Fukuda M (2000): Differential biosynthesis of polysialic acid on neural cell adhesion molecule (NCAM) and oligosaccharide acceptors by three distinct alpha 2,8-sialyltransferases, ST8Sia IV (PST), ST8Sia II (STX), and ST8Sia III. J. Biol. Chem. 275: 18594–18601. DOI 10.1074/jbc.M910204199.

aprentas (2017): Laborpraxis Band 3: Trennungsmethoden. 6. Aufl. Springer International Publishing, Cham.

Ardrey RE (2003): Liquid chromatography-mass spectrometry. An introduction. J. Wiley, New York.

Barnard KN, Alford-Lawrence BK, Buchholz DW, Wasik BR, LaClair JR, Yu H, Honce R, Ruhl S, Pajic P, Daugherty EK, Chen X, Schultz-Cherry SL, Aguilar HC, Varki A, Parrish CR (2020): Modified Sialic Acids on Mucus and Erythrocytes Inhibit Influenza A Virus Hemagglutinin and Neuraminidase Functions. J Virol 94. DOI 10.1128/JVI.01567-19.

Barry G (1958): Colominic acid, a polymer of N-acetylneuraminic acid. J Exp Med 107: 507–521. DOI 10.1084/jem.107.4.507.

Bhide GP, Colley KJ (2017): Sialylation of N-glycans: mechanism, cellular compartmentalization and function. Histochem Cell Biol 147: 149–174. DOI 10.1007/s00418-016-1520-x.

Bornhöfft KF, Goldammer T, Rebl A, Galuska SP (2018): Siglecs: A journey through the evolution of sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins. *Dev Comp Immunol* 86: 219–231. DOI 10.1016/j.dci.2018.05.008.

Brinkmann V, Zychlinsky A (2012): Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *The Journal of cell biology* 198: 773–783. DOI 10.1083/jcb.201203170.

Castilho A (2015): *Glyco-Engineering. Mass Spectrometric Analysis of Oligo- and Polysialic Acids*. Springer New York, New York, NY.

Cheeseman J, Kuhnle G, Spencer DIR, Osborn HMI (2021): Assays for the identification and quantification of sialic acids: Challenges, opportunities and future perspectives. *Bioorg Med Chem* 30: 115882. DOI 10.1016/j.bmc.2020.115882.

Chen X, Varki A (2010): Advances in the biology and chemistry of sialic acids. *ACS Chem Biol* 5: 163–176. DOI 10.1021/cb900266r.

Christian GD, Dasgupta PK, Schug K (2014): *Analytical chemistry*. Seventh edition. John Wiley and Sons Inc, Hoboken NJ.

Corradini D (2011): *Handbook of HPLC / editor, Danilo Corradini*. 2nd ed.

Curto Y, Alcaide J, Röckle I, Hildebrandt H, Nacher J (2019): Effects of the Genetic Depletion of Polysialyltransferases on the Structure and Connectivity of Interneurons in the Adult Prefrontal Cortex. *Front Neuroanat* 13: 1–10. DOI 10.3389/fnana.2019.00006.

Dąbrowska D, Jabłońska E, Garley M, Ratajczak-Wrona W, Iwaniuk A (2016): New Aspects of the Biology of Neutrophil Extracellular Traps. *Scand J Immunol* 84: 317–322. DOI 10.1111/sji.12494.

Dall'Olio F, Malagolini N, Trinchera M, Chiricolo M (2014): Sialosignaling: sialyltransferases as engines of self-fueling loops in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 1840: 2752–2764. DOI 10.1016/j.bbagen.2014.06.006.

Dhar C, Sasmal A, Varki A (2019): From "Serum Sickness" to "Xenosialitis": Past, Present, and Future Significance of the Non-human Sialic Acid Neu5Gc. *Front Immunol* 10: 807. DOI 10.3389/fimmu.2019.00807.

Diaz SL, Padler-Karavani V, Ghaderi D, Hurtado-Ziola N, Yu H, Chen X, Brinkman-Vander Linden ECM, Varki A, Varki NM (2009): Sensitive and specific detection of the non-human sialic Acid N-glycolylneuraminic acid in human tissues and biotherapeutic products. *PLoS ONE* 4: e4241. DOI 10.1371/journal.pone.0004241.

Dong MW (2019): *HPLC AND UHPLC FOR PRACTICING SCIENTISTS*. second Edition.

- Döring Y, Soehnlein O, Weber C (2017): Neutrophil Extracellular Traps in Atherosclerosis and Atherothrombosis. *Circ Res* 120: 736–743. DOI 10.1161/CIRCRESAHA.116.309692.
- Einerhand AWC, van Loo-Bouwman CA, Weiss GA, Wang C, Ba G, Fan Q, He B, Smit G (2022): Can Lactoferrin, a Natural Mammalian Milk Protein, Assist in the Battle against COVID-19? *Nutrients* 14. DOI 10.3390/nu14245274.
- Engin AB, Engin ED, Engin A (2020): Dual function of sialic acid in gastrointestinal SARS-CoV-2 infection. *Environ Toxicol Pharmacol* 79: 103436. DOI 10.1016/j.etap.2020.103436.
- Ettre LS (1993): Nomenclature for Chromatography: 819–872.
- Fliniaux I, Marchand G, Molinaro C, Decloquement M, Martoriati A, Marin M, Bodart J-F, Harduin-Lepers A, Cailliau K (2022): Diversity of sialic acids and sialoglycoproteins in gametes and at fertilization. *Front Cell Dev Biol* 10: 982931. DOI 10.3389/fcell.2022.982931.
- Foley DA, Swartzentruber KG, Colley KJ (2009): Identification of sequences in the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV that are required for the protein-specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule, NCAM. *J. Biol. Chem.* 284: 15505–15516. DOI 10.1074/jbc.M809696200.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A (2007): Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology* 176: 231–241. DOI 10.1083/jcb.200606027.
- Galuska CE, Dambon JA, Kühnle A, Bornhöfft KF, Prem G, Zlatina K, Lütteke T, Galuska SP (2017a): Artificial Polysialic Acid Chains as Sialidase-Resistant Molecular-Anchors to Accumulate Particles on Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol* 8: 1229. DOI 10.3389/fimmu.2017.01229.
- Galuska CE, Lütteke T, Galuska SP (2017b): Is Polysialylated NCAM Not Only a Regulator during Brain Development But also during the Formation of Other Organs? *Biology (Basel)* 6: 1–15. DOI 10.3390/biology6020027.
- Galuska SP, Galuska CE, Tharmalingam T, Zlatina K, Prem G, Husejnov FCO, Rudd PM, Vann WF, Reid C, Vionnet J, Gallagher ME, Carrington FA, Hassett S-L, Carrington SD (2017c): In vitro generation of polysialylated cervical mucins by bacterial polysialyltransferases to counteract cytotoxicity of extracellular histones. *FEBS J* 284: 1688–1699. DOI 10.1111/febs.14073.

- Galuska SP, Geyer H, Mink W, Kaese P, Kühnhardt S, Schäfer B, Mühlenhoff M, Freiburger F, Gerardy-Schahn R, Geyer R (2012): Glycomic strategy for efficient linkage analysis of di-, oligo- and polysialic acids. *J Proteomics* 75: 5266–5278. DOI 10.1016/j.jprot.2012.06.011.
- Galuska SP, Geyer R, Gerardy-Schahn R, Mühlenhoff M, Geyer H (2008): Enzyme-dependent variations in the polysialylation of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in vivo. *J. Biol. Chem.* 283: 17–28. DOI 10.1074/jbc.M707024200.
- Galuska SP, Geyer R, Mühlenhoff M, Geyer H (2007): Characterization of oligo- and polysialic acids by MALDI-TOF-MS. *Anal Chem* 79: 7161–7169. DOI 10.1021/ac0712446.
- Galuska SP, Oltmann-Norden I, Geyer H, Weinhold B, Kuchelmeister K, Hildebrandt H, Gerardy-Schahn R, Geyer R, Mühlenhoff M (2006): Polysialic acid profiles of mice expressing variant allelic combinations of the polysialyltransferases ST8SialI and ST8SialIV. *J. Biol. Chem.* 281: 31605–31615. DOI 10.1074/jbc.M606516200.
- Gey MH (2015): *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Ghosh S (Hrsg.) (2020): *Sialic acids and sialoglycoconjugates in the biology of life, health and disease*. Elsevier, Waltham.
- Grasso S, Neumann A, Lang IM, Etscheid M, Köckritz-Blickwede M von, Kanse SM (2018): Interaction of factor VII activating protease (FSAP) with neutrophil extracellular traps (NETs). *Thromb Res* 161: 36–42. DOI 10.1016/j.thromres.2017.11.012.
- Guo X, Elkashef SM, Patel A, Ribeiro Morais G, Shnyder SD, Loadman PM, Patterson LH, Falconer RA (2021): An assay for quantitative analysis of polysialic acid expression in cancer cells. *Carbohydr Polym* 259: 117741. DOI 10.1016/j.carbpol.2021.117741.
- Hanai T (1999): HPLC. A Practical Guide. In: Hanai T (Hrsg.), *HPLC*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1–10.
- Hanashima S, Sato C, Tanaka H, Takahashi T, Kitajima K, Yamaguchi Y (2013): NMR study into the mechanism of recognition of the degree of polymerization by oligo/polysialic acid antibodies. *Bioorg Med Chem* 21: 6069–6076. DOI 10.1016/j.bmc.2013.07.023.
- Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi M-A, Samyn-Petit B, Julien S, Delannoy P (2001): The human sialyltransferase family. *Biochimie* 83: 727–737. DOI 10.1016/S0300-9084(01)01301-3.

- Haroun RA-H, Osman WH, Eessa AM (2022): Evaluation of serum total sialic acid in moderate COVID-19 patients with and without gastrointestinal tract manifestations. *Tissue Cell* 74: 101679. DOI 10.1016/j.tice.2021.101679.
- Harris DC, Werner G, Werner T (2014): *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*. 8., vollst. überarb. erw. Aufl. 2014. Springer Spektrum, Berlin.
- Hildebrandt H, Mühlenhoff M, Weinhold B, Gerardy-Schahn R (2007): Dissecting polysialic acid and NCAM functions in brain development. *J Neurochem* 103 Suppl 1: 56–64. DOI 10.1111/j.1471-4159.2007.04716.x.
- Hong W, Yang J, Zou J, Bi Z, He C, Lei H, He X, Li X, Alu A, Ren W, Wang Z, Jiang X, Zhong K, Jia G, Yang Y, Yu W, Huang Q, Yang M, Zhou Y, Zhao Y, Kuang D, Wang J, Wang H, Chen S, Luo M, Zhang Z, Lu T, Chen L, Que H, He Z, Sun Q, Wang W, Shen G, Lu G, Zhao Z, Yang L, Yang J, Wang Z, Li J, Song X, Dai L, Chen C, Geng J, Gou M, Chen L, Dong H, Peng Y, Huang C, Qian Z, Cheng W, Fan C, Wei Y, Su Z, Tong A, Lu S, Peng X, Wei X (2022): Histones released by NETosis enhance the infectivity of SARS-CoV-2 by bridging the spike protein subunit 2 and sialic acid on host cells. *Cell Mol Immunol* 19: 577–587. DOI 10.1038/s41423-022-00845-6.
- Hu W, Xie J, Zhu T, Meng G, Wang M, Zhou Z, Guo F, Chen H, Wang Z, Wang S, Liu H, Jiang H (2020): Serum N-Acetylneuraminic Acid Is Associated with Atrial Fibrillation and Left Atrial Enlargement. *Cardiol Res Pract* 2020: 1358098. DOI 10.1155/2020/1358098.
- Huang J, Hong W, Wan M, Zheng L (2022): Molecular mechanisms and therapeutic target of NETosis in diseases. *MedComm* (2020) 3: e162. DOI 10.1002/mco2.162.
- Huizing M, Hackbarth ME, Adams DR, Wasserstein M, Patterson MC, Walkley SU, Gahl WA (2021): Free sialic acid storage disorder: Progress and promise. *Neurosci Lett* 755: 135896. DOI 10.1016/j.neulet.2021.135896.
- Hurum DC, Rohrer JS (2012): Determination of sialic acids in infant formula by chromatographic methods: A comparison of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and ultra-high-performance liquid chromatography methods. *J Dairy Sci* 95: 1152–1161. DOI 10.3168/jds.2011-4988.
- Inoko E, Nishiura Y, Tanaka H, Takahashi T, Furukawa K, Kitajima K, Sato C (2010): Developmental stage-dependent expression of an alpha2,8-trisialic acid unit on glycoproteins in mouse brain. *Glycobiology* 20: 916–928. DOI 10.1093/glycob/cwq049.
- Inoue S, Inoue Y (2003): Ultrasensitive Analysis of Sialic Acids and Oligo=Polysialic Acids by Fluorometric High-Performance Liquid Chromatography: 543–560.

Inoue S, Lin SL, Chang T, Wu SH, Yao CW, Chu TY, Troy FA, Inoue Y (1998): Identification of free deaminated sialic acid (2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononic acid) in human red blood cells and its elevated expression in fetal cord red blood cells and ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 273: 27199–27204. DOI 10.1074/jbc.273.42.27199.

Inoue S, Lin SL, Lee YC, Inoue Y (2001): An ultrasensitive chemical method for polysialic acid analysis. *Glycobiology* 11: 759–767. DOI 10.1093/glycob/11.9.759.

Inoue S, Sato C, Kitajima K (2010): Extensive enrichment of N-glycolylneuraminic acid in extracellular sialoglycoproteins abundantly synthesized and secreted by human cancer cells. *Glycobiology* 20: 752–762. DOI 10.1093/glycob/cwq030.

Jahan M, Wynn PC, Wang B (2016): Molecular characterization of the level of sialic acids N-acetylneuraminic acid, N-glycolylneuraminic acid, and ketodeoxynonulosonic acid in porcine milk during lactation. *J Dairy Sci* 99: 8431–8442. DOI 10.3168/jds.2016-11187.

Jakobsson E, Schwarzer D, Jokilampi A, Finne J (2015): Endosialidases: Versatile Tools for the Study of Polysialic Acid. *Top Curr Chem* 367: 29–73. DOI 10.1007/128_2012_349.

Janas T, Janas T (2011): Membrane oligo- and polysialic acids. *Biochim Biophys Acta* 1808: 2923–2932. DOI 10.1016/j.bbamem.2011.08.036.

Ji S, Wang F, Chen Y, Yang C, Zhang P, Zhang X, Troy FA, Wang B (2017): Developmental changes in the level of free and conjugated sialic acids, Neu5Ac, Neu5Gc and KDN in different organs of pig: a LC-MS/MS quantitative analyses. *Glycoconj J* 34: 21–30. DOI 10.1007/s10719-016-9724-9.

Kaltenböck K (2008): *Chromatographie für Einsteiger*. 1. Aufl. Wiley-VCH, Weinheim.

Kamerling JP, Gerwig GJ (2006): Structural analysis of naturally occurring sialic acids. *Methods Mol Biol* 347: 69–91. DOI 10.1385/1-59745-167-3:69.

Kanato Y, Kitajima K, Sato C (2008): Direct binding of polysialic acid to a brain-derived neurotrophic factor depends on the degree of polymerization. *Glycobiology* 18: 1044–1053. DOI 10.1093/glycob/cwn084.

Kazakevich Y, LoBrutto R (2007): *HPLC for pharmaceutical scientists*. Wiley-Interscience, Hoboken N.J.

Kitajima K, Varki N, Sato C (2015): Advanced Technologies in Sialic Acid and Sialoglycoconjugate Analysis. *Top Curr Chem* 367: 75–103. DOI 10.1007/128_2013_458.

Kitazume S, Kitajima K, Inoue S, Troy FA, Cho JW, Lennarz WJ, Inoue Y (1994): Identification of polysialic acid-containing glycoprotein in the jelly coat of sea urchin eggs. Occurrence of a novel type of polysialic acid structure. *J. Biol. Chem.* 269: 22712–22718.

Köckritz-Blickwede M von, Nizet V (2009): Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. *J Mol Med* 87: 775–783. DOI 10.1007/s00109-009-0481-0.

Kühnle A, Galuska CE, Zlatina K, Galuska SP (2019a): The Bovine Antimicrobial Peptide Lactoferricin Interacts with Polysialic Acid without Loss of Its Antimicrobial Activity against *Escherichia coli*. *Animals (Basel)* 10. DOI 10.3390/ani10010001.

Kühnle A, Veelken R, Galuska CE, Saftenberger M, Verleih M, Schuppe H-C, Rudloff S, Kunz C, Galuska SP (2019b): Polysialic acid interacts with lactoferrin and supports its activity to inhibit the release of neutrophil extracellular traps. *Carbohydr Polym* 208: 32–41. DOI 10.1016/j.carbpol.2018.12.033.

Lederkremer RM de, Giorgi ME, Agusti R (2022): trans-Sialylation: a strategy used to incorporate sialic acid into oligosaccharides. *RSC Chem Biol* 3: 121–139. DOI 10.1039/d1cb00176k.

Levene PA, Landsteiner K (1927): ON SOME NEW LIPOIDS. *Journal of Biological Chemistry* 75: 607–612. DOI 10.1016/S0021-9258(18)84168-0.

Li M-N, Qian S-H, Yao Z-Y, Ming S-P, Shi X-J, Kang P-F, Zhang N-R, Wang X-J, Gao D-S, Gao Q, Zhang H, Wang H-J (2020): Correlation of serum N-Acetylneuraminic acid with the risk and prognosis of acute coronary syndrome: a prospective cohort study. *BMC Cardiovasc Disord* 20: 404. DOI 10.1186/s12872-020-01690-z.

Li Y, Chen X (2012): Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 94: 887–905. DOI 10.1007/s00253-012-4040-1.

Livingston BD, Jacobs JL, Glick MC, Troy FA (1988): Extended polysialic acid chains (n greater than 55) in glycoproteins from human neuroblastoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 263: 9443–9448. DOI 10.1016/S0021-9258(19)76560-0.

LoBrutto R, Kazakevich Y (Hrsg.) (2007): HPLC for pharmaceutical scientists. Wiley-Interscience, Hoboken.

Lundanes, Elsa, Reubsaet, L&, eacute, on, Greibrokk, Tyge (2014a): Chromatography.

Lundanes E, Reubsaet L, Greibrokk T (2014b): Chromatography. Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods.

- M. Crook (1993): The Determination of Plasma or Serum Sialic Acid 26: 31–38.
- M. Crook, M. Haq, P. Tutt (1993): Evaluation of Three Assays for the Determination of Serum Total Sialic Acid 26: 449–454.
- Ma AC, Kubes P (2008): Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *J Thromb Haemost* 6: 415–420. DOI 10.1111/j.1538-7836.2007.02865.x.
- Mark D. Jankowski, Scott Glaberman, David B. Kimball, Kirsten J. Taylor-McCabe, Jeanne M. Fair (2019): Sialic Acid on Avian Erythrocytes.
- Marvin C. McMaster (2007): HPLC A Practical Users Guide. Second Edition. John Wiley & Sons,
- Masuda S, Nakazawa D, Shida H, Miyoshi A, Kusunoki Y, Tomaru U, Ishizu A (2016): NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin Chim Acta* 459: 89–93. DOI 10.1016/j.cca.2016.05.029.
- Matsumoto Y, Saito T, Hoshi K, Ito H, Kariya Y, Nagae M, Yamaguchi Y, Hagiwara Y, Kinoshita N, Wada I, Saito K, Honda T, Hashimoto Y (2015): In situ visualization of a glycoform of transferrin: localization of α 2,6-sialylated transferrin in the liver. *J Biochem* 157: 211–216. DOI 10.1093/jb/mvu071.
- Matsuno K, Suzuki S (2008): Simple fluorimetric method for quantification of sialic acids in glycoproteins. *Anal Biochem* 375: 53–59. DOI 10.1016/j.ab.2008.01.002.
- Meyer VR (2010): Practical High-Performance Liquid Chromatography. Fifth Edition: 1–403.
- Miñana R, Climent E, Baretino D, Segui JM, Renau-Piqueras J, Guerri C (2000): Alcohol exposure alters the expression pattern of neural cell adhesion molecules during brain development. *J Neurochem* 75: 954–964. DOI 10.1046/j.1471-4159.2000.0750954.x.
- Moldoveanu SC, David V (2013): Basic Information about HPLC, Essentials in Modern HPLC Separations. Elsevier, 1–51.
- Moldoveanu SC, David V (2017): Start of the Implementation of a New HPLC Method, Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis. Elsevier, 1–29.
- Müller-Miny L, Thiel K, Meinert S, Hahn T, Kircher T, Nenadić I, Krug A, Hufschmidt F, Liao H, Neumann H, Dannlowski U, Lünemann JD (2023): Association of polysialic acid serum levels with schizophrenia spectrum and bipolar disorder-related structural brain changes and hospitalization. *Sci Rep* 13: 2085. DOI 10.1038/s41598-023-29242-3.

Nadano D, Iwasaki M, Endo S, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y (1986): A naturally occurring deaminated neuraminic acid, 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid (KDN). Its unique occurrence at the nonreducing ends of oligosialyl chains in polysialoglycoprotein of rainbow trout eggs. *Journal of Biological Chemistry* 261: 11550–11557. DOI 10.1016/S0021-9258(18)67278-3.

Nakamura M, Hara S, Yamaguchi M, Takamori Y, Ohkura Y (1987): 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzene as a Highly Sensitive Fluorogenic Reagent for α -Keto Acid. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* 1987: 687–692.

Nakata D, Troy FA (2005a): Degree of polymerization (DP) of polysialic acid (polySia) on neural cell adhesion molecules (N-CAMS): development and application of a new strategy to accurately determine the DP of polySia chains on N-CAMS. *J Biol Chem* 280: 38305–38316. DOI 10.1074/jbc.M508762200.

Nakata D, Troy FA (2005b): Degree of polymerization (DP) of polysialic acid (polySia) on neural cell adhesion molecules (N-CAMS): development and application of a new strategy to accurately determine the DP of polySia chains on N-CAMS. *J. Biol. Chem.* 280: 38305–38316. DOI 10.1074/jbc.M508762200.

Nie H, Li Y, Sun X-L (2012): Recent advances in sialic acid-focused glycomics. *J Proteomics* 75: 3098–3112. DOI 10.1016/j.jprot.2012.03.050.

Olaru OG, Constantin GI, Pena CM (2020): Variation of total serum sialic acid concentration in postmenopausal women. *Exp Ther Med* 20: 2455–2459. DOI 10.3892/etm.2020.8873.

Oltmann-Norden I, Galuska SP, Hildebrandt H, Geyer R, Gerardy-Schahn R, Geyer H, Mühlenhoff M (2008): Impact of the polysialyltransferases ST8SialII and ST8SialIV on polysialic acid synthesis during postnatal mouse brain development. *J. Biol. Chem.* 283: 1463–1471. DOI 10.1074/jbc.M708463200.

Ono S, Hane M, Kitajima K, Sato C (2012): Novel regulation of fibroblast growth factor 2 (FGF2)-mediated cell growth by polysialic acid. *J Biol Chem* 287: 3710–3722. DOI 10.1074/jbc.M111.276618.

Passek K, Bendels MH, Ohlendorf D, Oremek GM (2021): Der Tumormarker Sialinsäure. *Zbl Arbeitsmed* 71: 44–48. DOI 10.1007/s40664-020-00413-7.

Reich E, Schibli A (2007): High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. Thieme, New York.

Rollenhagen M, Buettner FFR, Reismann M, Jirmo AC, Grove M, Behrens GMN, Gerardy-Schahn R, Hanisch F-G, Mühlenhoff M (2013): Polysialic acid on neuropilin-2

- is exclusively synthesized by the polysialyltransferase ST8SiaIV and attached to mucin-type o-glycans located between the b2 and c domain. *J Biol Chem* 288: 22880–22892. DOI 10.1074/jbc.M113.463927.
- Röpke W (2014): *Der HPLC-Schrauber*. 1. Aufl. Wiley-VCH, s.l.
- Rossmann MG, Rao VB (2012): *Viral molecular machines* 726.
- Rouessac F, Rouessac A (2007): *Chemical analysis. Modern instrumentation methods and techniques*. 2nd ed. John Wiley, Chichester England, Hoboken NJ.
- Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, Lohmeyer J, Preissner KT (2012): Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS ONE* 7: e32366. DOI 10.1371/journal.pone.0032366.
- Samraj AN, Pearce OMT, Läubli H, Crittenden AN, Bergfeld AK, Banda K, Gregg CJ, Bingman AE, Secret P, Diaz SL, Varki NM, Varki A (2015): A red meat-derived glycan promotes inflammation and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 542–547. DOI 10.1073/pnas.1417508112.
- Sato C (2004): Chain Length Diversity of Sialic Acids and Its Biological Significance 16: 331–344.
- Sato C, Inoue S, Matsuda T, Kitajima K (1999): Fluorescent-assisted detection of oligosialyl units in glycoconjugates. *Anal Biochem* 266: 102–109. DOI 10.1006/abio.1998.2921.
- Sato C, Kitajima K (2013a): Disialic, oligosialic and polysialic acids: distribution, functions and related disease. *J Biochem* 154: 115–136. DOI 10.1093/jb/mvt057.
- Sato C, Kitajima K (2013b): Impact of structural aberrancy of polysialic acid and its synthetic enzyme ST8SIA2 in schizophrenia. *Front Cell Neurosci* 7. DOI 10.3389/fncel.2013.00061.
- Sato C, Kitajima K (2019): Sialic Acids in Neurology. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 76: 1–64. DOI 10.1016/bs.accb.2018.09.003.
- Schauer R, Kamerling JP (2018): Exploration of the Sialic Acid World. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 75: 1–213. DOI 10.1016/bs.accb.2018.09.001.
- Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H (2014): Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiol Rev* 94: 461–518. DOI 10.1152/physrev.00033.2013.
- Segal AW (2005): How neutrophils kill microbes. *Annual review of immunology* 23: 197–223. DOI 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653.

- Shahraz A, Kopatz J, Mathy R, Kappler J, Winter D, Kapoor S, Schütza V, Scheper T, Gieselmann V, Neumann H (2015): Anti-inflammatory activity of low molecular weight polysialic acid on human macrophages. *Sci Rep* 5: 16800. DOI 10.1038/srep16800.
- Shahraz A, Lin Y, Mbroh J, Winkler J, Liao H, Lackmann M, Bungartz A, Zipfel PF, Skerka C, Neumann H (2022): Low molecular weight polysialic acid binds to properdin and reduces the activity of the alternative complement pathway. *Sci Rep* 12: 5818. DOI 10.1038/s41598-022-09407-2.
- Shuuji Hara, Yasuyo Takamori, Masatoshi Yamaguchi, Yosuke Ohkura (1987): Fluorometric high-performance liquid chromatography of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acids and its application to their microdetermination in human and animal sera, glycoproteins, and glycolipids: 138–145.
- Simon P, Bäumner S, Busch O, Röhrich R, Kaese M, Richterich P, Wehrend A, Müller K, Gerardy-Schahn R, Mühlenhoff M, Geyer H, Geyer R, Middendorff R, Galuska SP (2013): Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase ST8Siall. *J Biol Chem* 288: 18825–18833. DOI 10.1074/jbc.M113.451112.
- Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR (2018): Principles of Instrumental Analysis. Seventh Edition. Pure and Applied Chemistry.
- Snyder LR (2010): Introduction to Modern Liquid Chromatography. Third Edition,
- Spichtig V, Michaud J, Austin S (2010): Determination of sialic acids in milks and milk-based products. *Anal Biochem* 405: 28–40. DOI 10.1016/j.ab.2010.06.010.
- Tiralongo J, Martinez-Duncker I (2013): Sialobiology. Structure, Biosynthesis and Function. *Advances in Sialic Acid and Polysialic Acid Detection Methodologies*.
- Tortorici MA, Walls AC, Lang Y, Wang C, Li Z, Koerhuis D, Boons G-J, Bosch B-J, Rey FA, Groot RJ de, Velesler D (2019): Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors. *Nat Struct Mol Biol* 26: 481–489. DOI 10.1038/s41594-019-0233-y.
- Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A (2009): Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS pathogens* 5: e1000639. DOI 10.1371/journal.ppat.1000639.
- Varki A (1997): Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J* 11: 248–255. DOI 10.1096/fasebj.11.4.9068613.
- Vreeker GCM, Wuhrer M (2017): Reversed-phase separation methods for glycan analysis. *Anal Bioanal Chem* 409: 359–378. DOI 10.1007/s00216-016-0073-0.

- Walz E (1927): Über das Vorkommen von Kerasin in der normalen Rindermilz.
- Wang B (2009): Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. *Annu Rev Nutr* 29: 177–222. DOI 10.1146/annurev.nutr.28.061807.155515.
- Wang B (2012): Molecular mechanism underlying sialic acid as an essential nutrient for brain development and cognition. *Adv Nutr* 3: 465S–72S. DOI 10.3945/an.112.001875.
- Wang B, Brand-Miller J (2003): The role and potential of sialic acid in human nutrition. *Eur J Clin Nutr*: 1351–1369. DOI 10.1038/sj.ejcn.1601704.
- Warren L (1959): The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J. Biol. Chem.* 234: 1971–1975.
- Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, Taylor FB, Esmon NL, Lupu F, Esmon CT (2009): Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nature medicine* 15: 1318–1321. DOI 10.1038/nm.2053.
- Yabe U, Sato C, Matsuda T, Kitajima K (2003): Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. *J Biol Chem* 278: 13875–13880. DOI 10.1074/jbc.M300458200.
- Yang W, Jiang Y, Guo Q, Tian Z, Cheng Z (2022): Aberrant N-glycolylneuraminic acid in breast MCF-7 cancer cells and cancer stem cells. *Front Mol Biosci* 9: 1047672. DOI 10.3389/fmolb.2022.1047672.
- Yang Y, Murai R, Takahashi Y, Mori A, Hane M, Kitajima K, Sato C (2020): Comparative Studies of Polysialic Acids Derived from Five Different Vertebrate Brains. *Int J Mol Sci* 21. DOI 10.3390/ijms21228593.
- Zawrotniak M, Rapala-Kozik M (2013): Neutrophil extracellular traps (NETs) — formation and implications Vol. 60, No 3.
- Zhang C, Chen J, Liu Y, Xu D (2019): Sialic acid metabolism as a potential therapeutic target of atherosclerosis. *Lipids Health Dis* 18: 173. DOI 10.1186/s12944-019-1113-5.
- Zhang L, Wei T-T, Li Y, Li J, Fan Y, Huang F-Q, Cai Y-Y, Ma G, Liu J-F, Chen Q-Q, Wang S-L, Li H, Alolga RN, Liu B, Zhao D-S, Shen J-H, Wang X-M, Zhu W, Li P, Qi L-W (2018): Functional Metabolomics Characterizes a Key Role for N-Acetylneuraminic Acid in Coronary Artery Diseases. *Circulation* 137: 1374–1390. DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031139.
- Zhou X, Yang G, Guan F (2020): Biological Functions and Analytical Strategies of Sialic Acids in Tumor. *Cells* 9. DOI 10.3390/cells9020273.

Literaturverzeichnis

Zlatina K, Lütteke T, Galuska S (2017): Individual Impact of Distinct Polysialic Acid Chain Lengths on the Cytotoxicity of Histone H1, H2A, H2B, H3 and H4. *Polymers* 9: 720. DOI 10.3390/polym9120720.

Zlatina K, Saftenberger M, Kühnle A, Galuska CE, Gärtner U, Rebl A, Oster M, Vernunft A, Galuska SP (2018): Polysialic Acid in Human Plasma Can Compensate the Cytotoxicity of Histones. *Int J Mol Sci* 19. DOI 10.3390/ijms19061679.

Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, Gockman K, Zuo M, Madison JA, Blair C, Weber A, Barnes BJ, Egeblad M, Woods RJ, Kanthi Y, Knight JS (2020): Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight* 5. DOI 10.1172/jci.insight.138999.

11. Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

12. Danksagung

„Es gibt auf der Welt kaum ein schöneres Übermaß als das der Dankbarkeit“

von Jean de La Bruyère

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meines Promotionsvorhabens tatkräftig unterstützt und begleitet haben.

Besonders gebührt mein Dank meinem Doktorvater PD. Dr. Sebastian Galuska. Die gemeinsame Zeit und großartige Zusammenarbeit mit Dir werden mir als Bereicherung in Erinnerung bleiben. Ich danke Dir für die herausragende Betreuung, es war schön ein Teil deiner Arbeitsgruppe sein zu dürfen.

Ich danke meinen Eltern für all das, was sie für mich im Leben getan haben. Danke für euer Vertrauen, Liebe, Mut und unermüdliche Unterstützung.

Zudem bedanke ich mich bei meinen Geschwistern und Freunden: Könül, Faig, Mateo und Hashmat.

Nicht zuletzt und ganz besonders möchte ich mich bei meiner Frau bedanken.

Selina, ich danke Dir für deine Geduld und deinen Glauben an mich. Ohne deine Unterstützung wäre diese Arbeit, als auch vieles andere was ich bis dahin erreicht habe, nicht möglich gewesen. Die vorliegende Dissertation ist Dir und unserer Tochter gewidmet.

13. Lebenslauf