

Charakterisierung der Kompensation der
Zytotoxizität von extrazellulären Histonen durch
Polysialinsäure

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

vorgelegt von
Gerlinde Prem-Ukaj, geb. Prem
aus Satu Mare, Rumänien

Gießen 2020

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Biochemisches Institut

Gutachter: PD Dr. Galuska

Gutachter: Prof. Dr. Kracht

Tag der Disputation: 30.06.2021

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | I |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Polysialinsäure (PolySia) - ein Polymer aus Sialinsäuren | 1 |
| 1.1.1 Vorkommen und chemische Struktur von Sialinsäuren sowie der Polysialinsäure (PolySia) | 1 |
| 1.1.2 Biosynthese der PolySia | 5 |
| 1.1.3 Vielfalt der biologischen Funktion von Sialinsäuren und PolySia bei Säugetieren.... | 8 |
| 1.2 Histone und <i>Neutrophil extracellular trap</i> (NET) | 18 |
| 1.2.1 Aufbau und Funktion von Histonen | 18 |
| 1.2.2 Extrazelluläre Histone | 20 |
| 1.2.3 Aufbau und Funktion von <i>neutrophil extracellular traps</i> (NETs) | 21 |
| 1.2.4 Beteiligung extrazellulärer Histone und <i>neutrophil extracellular trap</i> (NET) an verschiedenen Pathologien | 23 |
| 2 ZIELSETZUNG | 25 |
| 3 MATERIAL UND METHODEN | 26 |
| 3.1 Material | 26 |
| 3.2 Methoden | 29 |
| 3.2.1 <i>High performance liquid chromatography</i> (HPLC) | 29 |
| 3.2.2 Modifizierung der PolySia durch Oxidation am nicht-reduzierenden Ende | 35 |
| 3.2.3 Zellkultur | 35 |
| 3.2.4 Zytotoxizitätsmessung | 40 |
| 4 ERGEBNISSE | 43 |
| 4.1 Die Inhibition der zytotoxischen Eigenschaften von Histonen durch Polysialinsäure (PolySia) ist konzentrationsabhängig | 43 |
| 4.2 Die Inaktivierung der Histon-vermittelten Zytotoxizität hängt von der Kettenlänge der PolySia ab | 44 |
| 4.3 Oxidierte PolySia vermag ebenfalls die Histon-vermittelte Zytotoxizität zu reduzieren | 47 |
| 5 DISKUSSION | 50 |
| 5.1 PolySia als Gegenspieler der Histon- bzw. NET-induzierten Zytotoxizität | 50 |
| 5.2 Kopplung von PolySia an Nano-Partikel | 53 |
| 5.3 Klinische Bedeutung von PolySia | 55 |
| 5.3.1 Möglichkeiten für den Einsatz von PolySia als direktes Therapeutikum – Beispiele: Zystische Fibrose und Schlaganfall | 55 |
| 5.4 Ausblick | 59 |

| | | |
|-----------|---------------------------------------|-----------|
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 60 |
| 7 | SUMMARY..... | 61 |
| 8 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 62 |
| 9 | TABELLENVERZEICHNIS | 63 |
| 10 | LITERATURVERZEICHNIS | 64 |
| 11 | PUBLIKATIONEN..... | 74 |
| 12 | EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG | 75 |
| 13 | DANKSAGUNG | 76 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-----------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| Abs. | Absorption |
| AMPA | α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoazolepropionacid |
| BDNF | <i>brain derived neurotrophic factor</i> |
| ca. | circa |
| CCL21 | <i>CC-chemokine ligand 21</i> |
| CCR7 | <i>CC-chemokine receptor type 7</i> |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| CED | chronisch-entzündliche Darmerkrankung |
| CMP | Cytidinmonophosphat |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| COPD | <i>chronic obstructive pulmonal disease</i> |
| DAMP | <i>damage-associated molecular patterns</i> |
| dest. | destilliert |
| DMB | 1,2-Diamino-4,5-Methylendioxybenzol |
| DMEM | <i>Dulbecco's minimum essential medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DP | <i>degree of polymerization</i> |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EET | <i>eosinophil extracellular trap</i> |
| EndoN | Endoneuraminidase N |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ET | <i>extracellular trap</i> |
| et al. | et alia |
| EZM | Extrazelluläre Matrix |
| FBS | Fetales bovines Serum |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------------|---|
| FGF2 | <i>fibroblast growth factor 2</i> |
| g | Gramm |
| GNE/MNK | UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase |
| h | Stunde |
| HCl | Chlorwasserstoff, Salzsäure |
| HPLC | <i>High performance liquid chromatography</i> |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL1 β | Interleukin 1 beta |
| IMDM | <i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> |
| kDa | Kilodalton |
| KDN | Deaminoneuraminsäure |
| KL | Kettenlänge |
| LAL-Test | Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test |
| LDH | Lactatdehydrogenase |
| LM | Laufmittel |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| M | Mol |
| ManNAc | <i>N</i> -Acetylmannosamin |
| ManNAc-6P | <i>N</i> -Acetylmannosamin-6-Phosphat |
| MD | Molecular dynamics |
| MEM | <i>Minimum essential medium</i> |
| mg | Milligramm |
| min. | Minute |
| mL | Milliliter |
| mM | Millimol |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NAD | Nicotinamiddinucleotid |
| NADH | Nicotinamiddinucleotid, reduzierte Form |
| NANP | <i>N</i> -Acetylneuraminat-9-Phosphatase |
| NANS | Neu5Ac-9-Phosphat-Synthase |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------|---|
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NCAM | <i>neural cell adhesion molecule</i> |
| NET | <i>Neutrophil extracellular trap</i> |
| Neu5Ac | <i>N-Acetylneuraminsäure</i> |
| Neu5Gc | <i>N-Glykolyneuraminsäure</i> |
| nm | Nanometer |
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartat |
| ns | nicht signifikant |
| nsec | Nanosekunden |
| PBS | <i>Phosphat buffered saline</i> |
| PolySia | Polysialinsäure |
| RA | Rheumatoide Arthritis |
| RP | <i>reversed-phase</i> |
| rpm | <i>rounds per minute</i> |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| rt-PA | <i>recombinant tissue-type plasminogen activator</i> |
| SLE | Systemischer Lupus Erythematosus |
| sog. | sogenannt |
| SynCAM-1 | <i>synaptic cell adhesion molecule</i> |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |
| UDP | Uridindiphosphat |
| UDP-GlcNAc | UDP- <i>N</i> -Acetylglucosamin |
| UV | Ultraviolett |
| v.a. | vor allem |
| v/v | Volumenprozent |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |
| µl | Mikroliter |

1 EINLEITUNG

1.1 POLYSIALINSÄURE (POLYSIA) - EIN POLYMER AUS SIALINSÄUREN

1.1.1 Vorkommen und chemische Struktur von Sialinsäuren sowie der Polysialinsäure (PolySia)

Die Entdeckung der Sialinsäuren geht auf die Mitte der 1930er zurück als in zwei verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander zum einen Blix et al. die „Sialinsäure“ im Speichel der Unterkieferdrüse, zum anderen Klenk et al. die „Neuraminsäure“ im Hirngewebe beschrieben haben (Blix, 1936 und Lundblad, 2015). Einige Jahre später einigten sich beide Arbeitsgruppen darauf, dass Neuraminsäure als die unsubstituierte Variante bzw. das Grundgerüst bezeichnet werden soll (siehe **Abbildung 1**). Sialinsäure hingegen sei als Gruppenname für Neuraminsäure-Derivate z.B. *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), *N*-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc) und Diacetylneuraminsäure (KDN) zu verwenden (Blix, Gottschalk, & Klenk, 1957) (siehe **Abbildung 2**).

Das Vorkommen von Sialinsäuren ist ubiquitär. Sie wurde in der Natur in Wirbeltieren, Wirbellosen, Protozoen, Pilzen und Bakterien, besonders in der Zellwand von gram-negativen, beschrieben (Angata & Varki, 2002; Schauer, 2004).

In dieser Dissertation liegt das Hauptaugenmerk auf Sialinsäuren in Wirbeltieren, im Besonderen auf der Polysialinsäure (PolySia).

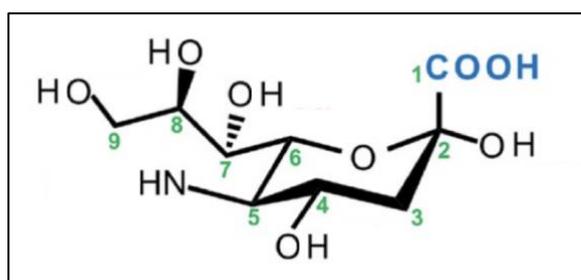


Abbildung 1: Neuraminsäure mit C9-Grundgerüst (modifiziert nach Paul, et al., 2018, CC BY-NC)

Auf molekularer Ebene sind Sialinsäuren α -Ketosäuren bzw. α -Ketocarbonsäuren. Sie weisen neben der Carboxylgruppe eine zusätzliche Ketogruppe als funktionelle Gruppe am direkt benachbarten C-Atom auf. Das Molekül besteht aus einem C9-Körper als Grundgerüst, welches durch diverse Substituenten, Modifikationen, Verknüpfungen und

unterschiedlich langen Kettenlängen zu einer hohen Vielfalt an Derivaten dieser Gruppe führt (Angata & Varki, 2002; Schauer, 2004; Sato, 2013).

Zurzeit besteht die Sialinsäure-Familie aus über 50 natürlich vorkommenden Mitgliedern. Die Neuraminsäure als unsubstituierte Form kommt in der Natur nicht vor (Traving & Schauer, 1998).

Die meisten Modifikationen sind am C5-Atom beschrieben. Am häufigsten findet man bei Wirbeltieren die *N*-Acetylneuraminsäure, *N*-Glykolyneuraminsäure und Deaminoneuraminsäure (siehe **Abbildung 2**).

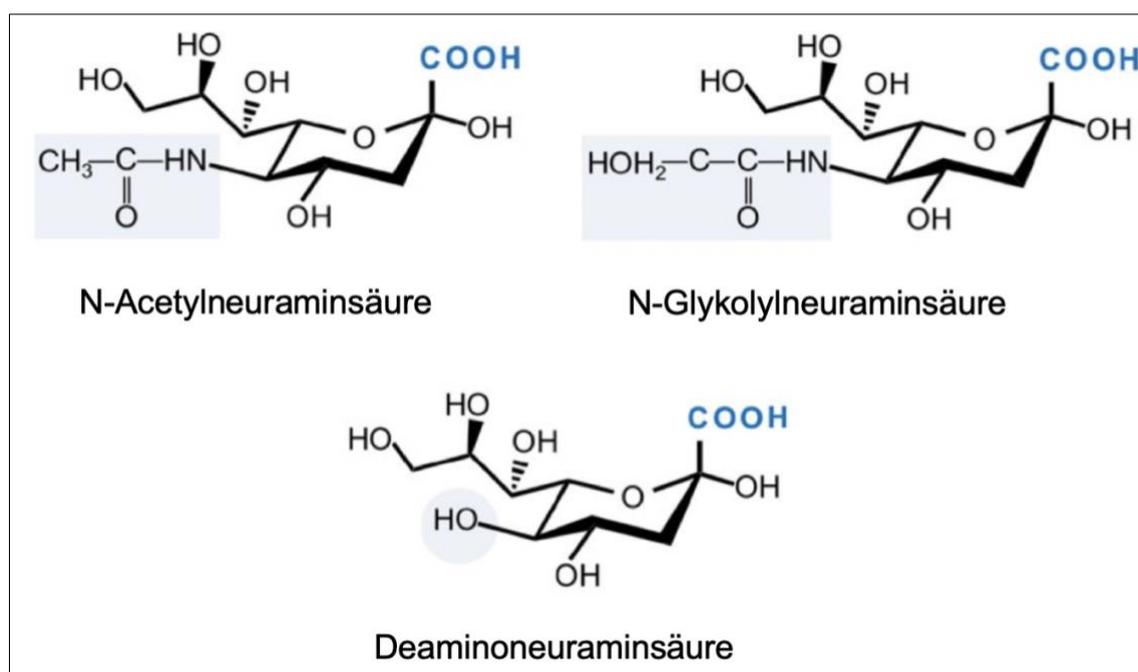


Abbildung 2: Die häufigsten in Wirbeltieren vorkommenden Sialinsäuren. N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), N-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc), Deaminoneuraminsäure (KDN) (modifiziert nach Paul, et al., 2018, CC BY-NC)

Eine Besonderheit beim Menschen ist, dass durch einen Gendefekt das Enzym Cytidinmonophosphat-N-acetylneuraminsäure-hydroxylase (CMH) inaktiv ist, welches Cytidinmonophosphat (CMP)-Neu5Ac in CMP-Neu5Gc umwandelt, so dass dieses Neu5Gc im Menschen nicht gebildet wird. In malignen Tumorzellen und in embryonalen Stammzellen konnte Neu5Gc aber nachgewiesen werden (Marquina, et al., 1996; Inoue & Kitajima, 2010; Martin, Moutri, & Varki, 2005). Ebenfalls im gesunden humanen Gewebe fand man Neu5Gc in geringen Mengen. Dies lässt vermuten, dass der Mensch diese Mengen am ehesten durch die Nahrung, meist rotes Fleisch und Milch, zu sich nimmt. Neu5Gc wird dann in manche Zellen aufgenommen und in die Zelloberflächen anstelle von Neu5Ac eingebaut, da die Sialyltransferasen beide Sialinsäuren als Substrat verwenden können (Tangvoranuntakul, et al., 2003). Des Weiteren wurden

EINLEITUNG

Antikörper gegen das nichthumane Neu5Gc im Serum von Menschen gefunden. Diese bezeichnet man als „Xenoautoantikörper“: Das Antigen (Neu5Gc) stammt zwar von einer anderen Art (=Xeno), löst aber, wegen dem Einbau in menschliche Zellen, eine Antikörperbildung gegen diese Zellen aus (=Autoantikörper). Man nimmt an, dass diese Antikörper die Entstehung und das Fortschreiten von chronischen Krankheiten wie Tumor- und Autoimmunerkrankungen sowie Atherosklerose begünstigen können (Varki & Varki, 2007; Taylor, et al., 2010; Pham, et al., 2009). Die am bedeutsamste und am meisten vertretene Sialinsäure in humanem Gewebe ist die Neu5Ac (Varki & Schauer, Sialic Acids, 2009).

Neben der Modifikation am C5-Atom können auch die Hydroxylgruppen in C4-, C7-, C8- und C9-Position durch Acetylierung, in C8-Position durch Methylierung und Sulfatierung und in C9-Position durch Lactoylierung und Phosphatierung substituiert werden (siehe **Abbildung 3**).

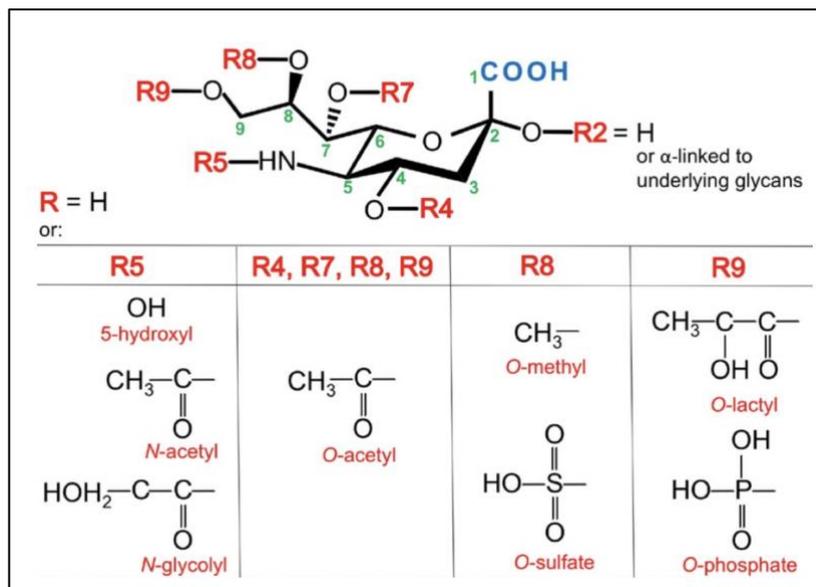


Abbildung 3: Modifikationen durch zusätzliche Substitution der Hydroxylgruppen. Acetylierung, Lactoylierung, Methylierung, Sulfatierung, Phosphatierung in C4-, C7-, C8 und C9-Position (modifiziert nach Paul, et al., 2018, CC BY-NC)

Zudem können Sialinsäuren unterschiedlich untereinander verknüpft sein. Beschrieben werden α 2,8-, α 2,9- sowie die alternierende Form α 2,8/2,9 oder aber bei OligoSia auch α 2,4-, welche in Gangliosiden vorkommen, und α 2,5-O-glykoly-Verknüpfungen in Glykoproteinen (Sato, 2013; Janas & Janas, 2011).

Neben den Verknüpfungsvarianten gibt es noch die Möglichkeit verschieden lange Sialinsäureketten zu synthetisieren. Man spricht von MonoSia bei einer Kettenlänge von

einem Molekül, DiSia bei einer Kettenlänge von zwei solcher Moleküle und OligoSia bei einer Kettenlänge von drei bis sieben Molekülen. Ab einer Kettenlänge von acht Sialinsäure-Molekülen spricht man gewöhnlich von Polysialinsäure (PolySia). Eine Polysialylierung ist für Neu5Ac, Neu5Gc und KDN beschrieben. Mit PolySia sind jedoch meist die Homopolymere der Neu5Ac mit einer α 2,8-Verknüpfung gemeint (siehe **Abbildung 4**).

Entdeckt und erforscht wurde ein solches Homopolymer zunächst in der Bakterienzellwand des Bakteriums *Escherichia coli* K1 (*E. coli*) und wurde Colominsäure genannt (Barry & Goebel, 1957; McGuire & Binkley, 1964). Seit der Entdeckung von dem α 2,8-verknüpften Sialinsäure-Polymer in Säugetieren spricht man von Polysialinsäure (Finne, 1982).

Das reduzierende Ende der PolySia ist an ein N- oder O- Glykan geknüpft. Die Polymerisierung erfolgt am nicht-reduzierenden Ende, dabei können bis zu 400 Neu5Ac-Moleküle synthetisiert werden (Sato, et al., 2011; Nakata & Troy, 2005).

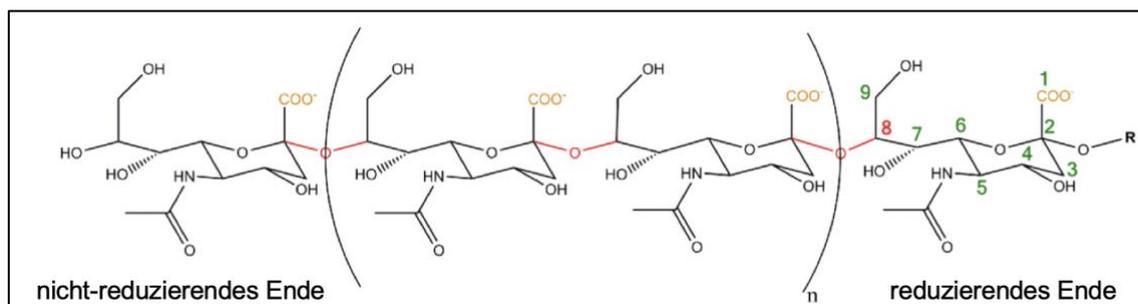


Abbildung 4: Chemische Struktur der Polysialinsäure (PolySia). In Säugetieren besteht die PolySia aus α 2,8-verknüpfter N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) (Verknüpfung rot dargestellt). Die α -Ketosaure mit einem C9-Gerüst (C-Atome in grün nummeriert) trägt unter physiologischen Bedingungen ein Carboxylat-Ion (orange); R: N-Glykan oder O-Glykan (modifiziert nach Galuska, et al., 2017, CC BY)

Bei einem niedrigen pH-Wert kann es zwischen zwei benachbarten Sialinsäuremolekülen zu einer reversiblen Veresterung der Carboxylgruppe in C1-Position mit einer Hydroxylgruppe am C9-Atom kommen. Hierdurch entsteht ein sechsgliedriger Ring. Dieser Vorgang wird Laktonisierung genannt. Es kann bei α 2,8- und α 2,9-verknüpften PolySia-Ketten vorkommen und führt ebenfalls zu einer Ausweitung der strukturellen Vielfalt von Sialinsäuren (Lifely, Gilbert, & Moreno, 1981). Besonders bei PolySia kommt es durch die Ringbildung zu einer Maskierung der Carboxylgruppe und somit zur Herabsetzung der hydrophilen Eigenschaften des Polymers. Der vorher anionische Charakter sinkt und der PolySia-Kette wird eine starre Struktur verliehen (Azurmendi, et al., 2007). Da dieser Vorgang reversibel ist kann die Gesamtanzahl der negativ geladenen Carboxylgruppen schnell reguliert werden. Die

Kettenlänge wird dabei nicht verändert. Eine weitere Besonderheit der Laktonisierung ist, dass sie die Immunogenität der PolySia signifikant senkt, dies wird als Möglichkeit für den Einsatz bei der Entwicklung von Impfstoffen gesehen (Azurmendi, et al., 2007). Während z.B. eines Entzündungsgeschehens *in vivo* ist der pH-Wert ebenfalls im sauren Bereich, was wiederum eine Laktonisierung der PolySia begünstigt (Azurmendi, et al., 2007; Galuska S., 2013).

Die Carboxylgruppe von Neu5Ac in C1-Position verleiht den Sialinsäuren mit einem pKa-Wert von 2,6 und bei einem physiologischem pH-Wert eine negative Ladung, wodurch die biochemischen Eigenschaften dieser Moleküle stark geprägt werden (Vimr, Kalivoda, Deszo, & Steenbergen, 2004). Dadurch wird die Dichte der negativen Ladungen einer Membran erhöht, der pH-Wert sinkt und das Membranpotential wird verändert (Janas & Janas, 2011). Je länger die PolySia-Kette ist umso ausgeprägter ist dieser Effekt.

1.1.2 Biosynthese der PolySia

PolySia wird am häufigsten als endständige Kette an N- und O-Glykanen sowie an Glykolipiden als Bestandteil von Zellmembranen gefunden (Tiralongo, 2013). Die häufiger vorkommenden polysialylierten N-Glykane sind durch N-Glykosylierung entstandene posttranslationale Modifikationen von Proteinen. Bei den N-Glykanen werden Kohlenhydrate an den Amin-Anteil der Aminosäure Asparagin im Protein gebunden. Im Gegensatz dazu findet bei O-Glykanen die Kohlenhydrat-Bindung unter anderem an der Hydroxylgruppe der Aminosäuren Serin und Threonin des Proteins statt. Die glykosylierten Proteine oder Lipide werden auch Glykokonjugate genannt. Sie sind als Strukturproteine oder mit einem Lipidanker in die Zellmembran eingebettet. Von Zellen können sie auch freigesetzt werden und erfüllen verschiedenste essentielle Funktionen wie Kommunikation und biologische Stabilität (Varki A., 1993). Die Glykokonjugate kommen in allen Gewebearten vor.

Die Verknüpfung von Neu5Ac-Monomeren zu PolySia an einem Glykokonjugat erfolgt durch die Sialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV im Golgi-Apparat. Sialyltransferasen sind Enzyme, welche, wie andere Glykosyltransferasen, Zuckermoleküle übertragen. Sie sind Teil der Membran des Golgi-Apparates und arbeiten verknüpfungsspezifisch (Varki & Schauer, Sialic Acids, 2009). Das Besondere an den Sialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV ist, dass nur diese biologischen Katalysatoren eine Sialinsäure-Kette von mehr als acht α 2,8-verknüpften Sialinsäure-Monomeren zu PolySia verbinden können (Angata & Fukuda, 2003). Hierfür tragen nur diese beiden Sialyltransferasen eine Polysialyltransferasedomäne (Nakata, Zhang, & FA, 2006). Die Bedeutsamkeit beider

EINLEITUNG

Enzyme wurde durch den letalen Phänotyp von ST8SialII und ST8SialIV Knockout-Mäusen gezeigt. Da die Polysialylierung von Proteinen eine große Rolle vor allem bei der neuronalen Entwicklung spielt, sind bei Verlust der ST8SialII und ST8SialIV, und damit der Polysialylierung, schwerwiegende neurologische Defekte vor allem bis hin zum Tod des Individuums beschrieben (Weinhold, et al., 2005; Galuska S., Geyer, Gerardy-Schahn, Mühlhoff, & Geyer, 2008; Rutishauser, 2008).

Um PolySia-tragende Glykokonjugate zu synthetisieren, bedarf es zunächst der Synthese von Sialinsäuren. Diese findet in verschiedenen Zellkompartimenten statt (siehe **Abbildung 5**). Zunächst wird im Zytosol durch die Glykolyse das Ausgangssubstrat Uridindiphosphat-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) bereitgestellt, welches dann durch verschiedene enzymatische Schritte letztlich zum Neuraminsäure-Molekül (Neu5Ac) weiterverarbeitet wird (Warren & Felsenfeld, 1962). Schließlich findet im Zellkern die enzymatische Aktivierung des neu generierten Neu5Ac-Moleküls mit dem Nukleotid Cytidinmonophosphat (CMP) statt. Die Aktivierung ist nötig damit Neu5Ac auf die Glykokonjugate übertragen werden kann (Galuska S., 2013; Varki & Schauer, 2009). Lediglich bei Sialinsäuren findet diese Aktivierung im Zellkern statt, bei anderen Kohlenhydraten passiert dies im Zytosol. Gleichzeitig wirkt das CMP-Neu5Ac als negativer Feedback-Mechanismus auf die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (GNE/MNK), so dass weniger *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) synthetisiert werden kann (Kornfeld, Kornfeld, Neufeld, & O'Brien, 1964; Varki & Schauer, Sialic Acids, 2009).

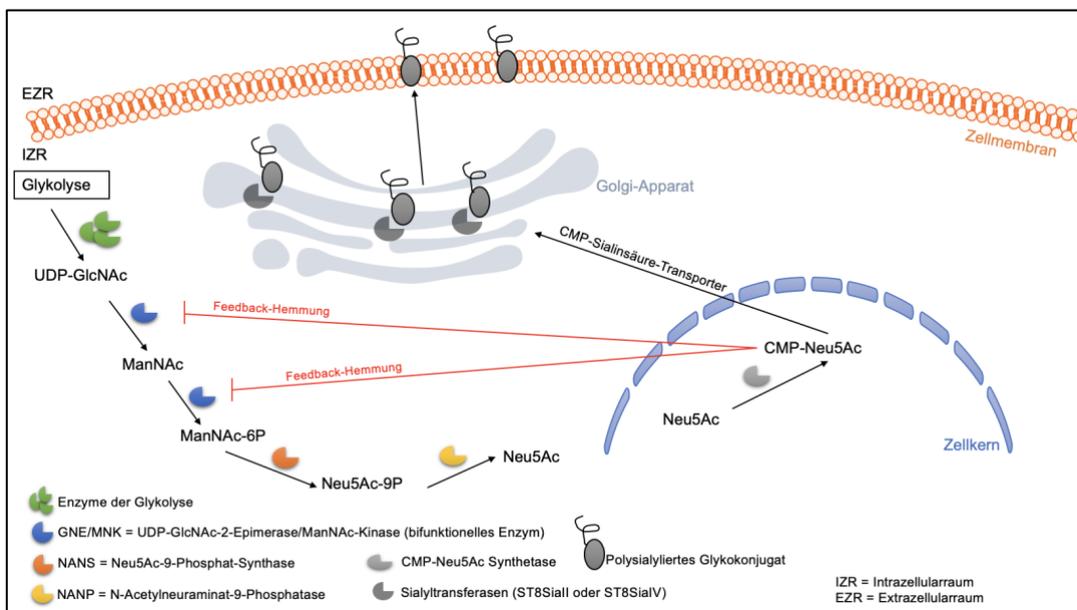


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Biosynthese von PolySia. Erläuterung siehe Text. (Grafik mit Hilfe von ©Motifolio erstellt)

EINLEITUNG

Danach erfolgt durch einen CMP-Sialinsäure-Transporter die Übergabe an den Golgi-Apparat, wo zunächst die Substitutionen der Hydroxylgruppen durch die entsprechenden Enzyme erfolgen können. Zuletzt findet ebenfalls im Golgi-Apparat durch die Sialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV die Polysialylierung am nicht-reduzierenden Ende der wachsenden Glykoprotein- oder Glykolipidkette statt. Die Glykokonjugate werden anschließend unter anderem durch Exozytose in die Zellmembran eingebaut und bilden wegen dem hohen Kohlenhydratanteil die Glykokalix der Zelle.

Der physiologische Abbau polysialylierter Proteine und Lipide bei Säugetieren ist noch nicht ausreichend erforscht. Vier sialinsäure-abbauende Enzyme sind bislang bekannt (Neuraminidase 1-4; NEU1-4). Die aktuelle Datenlage zeigt, dass die Neuraminidase 4 (NEU4) am Abbau der polysialylierten Proteine und Lipide vorrangig involviert ist (Takahashi, et al., 2012). Auch die Neuraminidase 1 (NEU1) ist in der Lage α 2,8-verknüpfte Neu5Ac-Polymere abzubauen. Defekte der NEU1 führen zu Speichererkrankungen auf lysosomaler Ebene, sog. Sialidosen oder Galactosialidosen genannt. Diese werden wiederum mit Neuroinflammation und Neurodegeneration in Verbindung gebracht. Ein fehlerhafter Auf- und Abbau der PolySia führe zudem zu psychiatrischen Krankheiten wie Schizophrenie, Bipolaren Störungen oder zu Autismus-Spektrum-Erkrankungen (Pshezhetsky & Ashmarina, 2018).

1.1.3 Vielfalt der biologischen Funktion von Sialinsäuren und PolySia bei Säugetieren

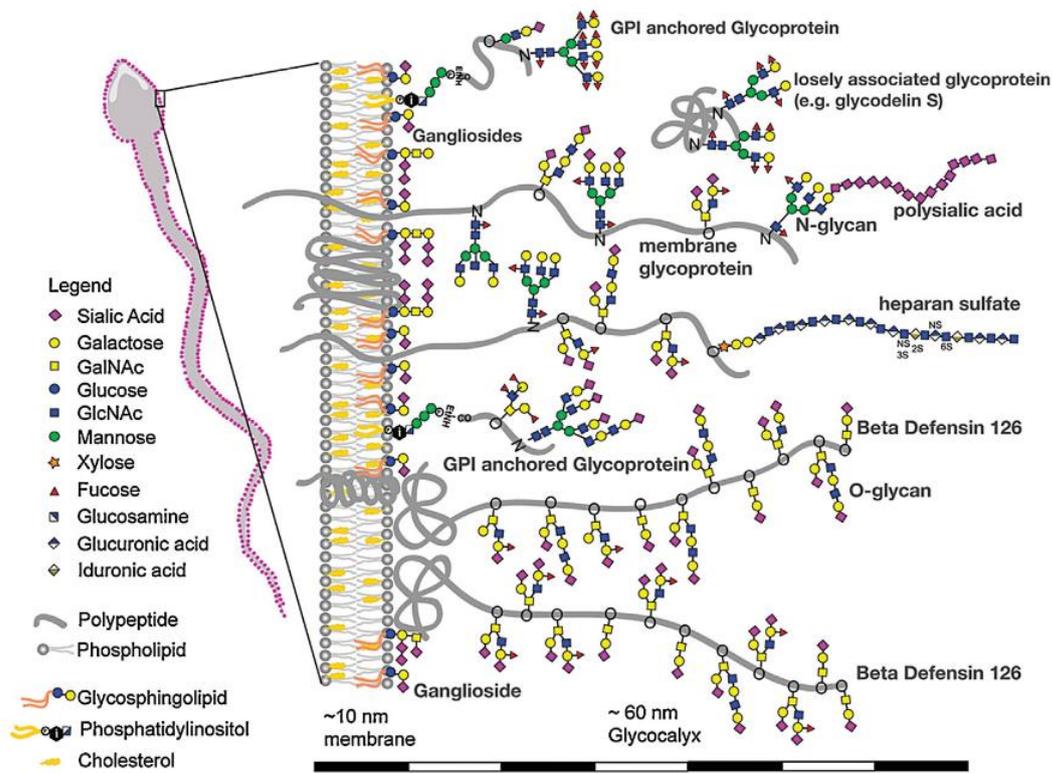


Abbildung 6: Ausschnitt aus einer Spermienmembran. Dargestellt sind Glykane und Glykokonjugate der Glykokalix eines Spermiums. Monosaccharide mit farbigen Symbolen gekennzeichnet, siehe Legende links. Proteine und Phospholipide sind grau, Cholesterol in gelb und Lipide der Glykosphingolipide in orange gezeichnet. (Abbildung aus Teclé & Gagneux, 2015, CC-BY-NC-ND 4.0)

Die durch glykosylierte Proteine und Lipide gebildete kohlenhydratreiche Hülle an der Zelloberfläche wird Glykokalix bezeichnet. Sie ist meist um ein Vielfaches größer als die Doppellipidschicht der Zellmembran selbst. Sie besteht neben der PolySia auch aus anderen Poly- und Oligosacchariden und kommt sowohl bei eukaryotischen als auch bei prokaryotischen Zellen vor.

Betrachtet man die Glykokonjugate in **Abbildung 6** so fällt auf, dass die Sialinsäure das häufigste endständige Kohlenhydrat ist. Exemplarisch sieht man auch ein polysialyliertes N-Glykan.

Zu den Glykolipiden zählen auch die Ganglioside, welche vor allem im Gehirn von Säugetieren vorkommen. Sie sind essentiell für die Myelinisierung, Neuritogenese, synaptische Plastizität und Übertragung von Nervenimpulsen. Die Ganglioside tragen ca. 65% aller Sialinsäuren des Gehirns von Säugetieren, was wiederum die besondere Stellung von Sialinsäuren im Nervensystem betont (Pshezhetsky & Ashmarina, 2018).

1.1.3.1 Sialinsäuren

Durch die endständige Lage der Sialinsäuren auf Glykoproteinen und Glykolipiden sind sie wesentlich an Interaktionen sowohl zwischen Zellen untereinander, ob fremd oder eigene, als auch zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix beteiligt. Sie sind somit das erste Bindeglied der Zelle vor jeglichen Zell-Kontakten. Sie dienen neben der Kommunikation auch als Schutz vor dem Eindringen von Pathogenen. Manche dieser Mikroorganismen (Viren, Bakterien und Protozoen) haben gelernt diesen Schutz zu umgehen und für sich zu nutzen. Zudem haben sie die Möglichkeit entwickelt Lektine, Proteine, die Sialinsäuren erkennen können, zu exprimieren. Lektine können membranständig oder auch löslich sein. Mit deren Hilfe werden die Zellen gebunden und das Eindringen in die Wirtszelle wird erleichtert (Angata & Varki, 2002). Gut bekannt und untersucht ist dies z.B. beim **Hämagglutinin des Influenza A Virus**. Durch das Hämagglutinin bindet das Virus an die Wirtszelle, schließlich sorgt die viruseigene Neuraminidase für die Spaltung der Sialinsäure und das Virus kann in die Zelle eindringen (Suzukui, et al., 2000). Die jährliche Impfung gegen Influenza A ist ein Neuraminidase-Hemmstoff, die das Ziel hat die Invasion der Wirtszelle durch das Virus zu verhindern. Weitere Mikroorganismen bzw. deren schädigende Faktoren, die die Sialinsäuren erkennen und für sich nutzen, sind das **Cholera-Toxin** (Richards, Moss, Alving, Fishman, & Brady, 1979), sowie die **Toxine von Clostridium tetani** (MacKenzie, Hlrama, Lee, Altman, & Young, 1997) und **Clostridium botulinum** (Y., Kozaki, Sakaguchi, Iwamori, & Nagai, 1986) und auch der Malaria auslösende **Plasmodium falciparum** (Orlandi, Klotz, & Haynes, 1992), nur um einige zu nennen.

Neben den Lektinen von Mikroorganismen gibt es auch in Wirbeltieren produzierte Sialinsäure-erkennende Proteine. Die meisten trifft man im Zusammenhang mit dem Immunsystem. Zu nennen sind hier zum einen der **Komplement Faktor H** (Ram, et al., 1998). Dieser schützt durch die Bindung an Sialinsäuren eigene Zellen vor einem Angriff durch das eigene Immunsystem (Angata & Varki, 2002). Zum anderen sind **Selektine** zu erwähnen (Bevilacqua, et al., 1991), die als Zellmembranbestandteile von Leukozyten, aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen bei der Wanderung der Leukozyten zum Ort eines Entzündungsgeschehens, beteiligt sind (Angata & Varki, 2002). Zuletzt sind die **Siglecs** (= *Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*) als wichtige Sialinsäure-bindende Proteine anzuführen (Crocker, et al., 1998). Diese sind Rezeptoren auf Zellen des Immunsystems, z.B. Makrophagen, B-Lymphozyten, Monozyten, natürliche Killerzellen und Granulozyten, aber auch auf Oligodendroglia und Schwannschen Zellen. Der extrazelluläre Teil dieser Rezeptoren bindet an die Sialinsäuren und gibt meist ein inhibitorisches Signal an die Zelle weiter, womit die

Immunantwort gebremst werden kann (Crocker & Varki, 2001; Bornhöfft & Galuska, 2019; Bornhöfft, Goldhammer, Rebl, & Galuska, 2018).

Das Vorkommen der Sialinsäuren auf der Membran von diversen Zellen, die zu einer Immunantwort beitragen, spiegelt die Wichtigkeit dieser Moleküle wieder. Sie nehmen Anteil an der Kommunikation der Immunzellen untereinander, an der Signalübertragung in das Zellinnere und auch bei der daraus resultierenden Rekrutierung weiterer Immunzellen und letztlich einer Immunantwort.

1.1.3.2 Polysialinsäure

Besonders die PolySia greift bei einer Kontaktaufnahme zwischen zwei Zellen ein, indem es durch ihre polyanionische Eigenschaft sowohl homophile Interaktionen, zwischen zwei gleichen Trägerproteinen, oder heterophile Interaktionen, zwischen PolySia-tragenden und Nicht-PolySia-tragenden Proteinen, beeinflussen kann. Im Allgemeinen kann man sagen, dass der Interzellularspalt vergrößert wird und somit die Zell-Zell- oder Zelle-EZM (Extrazelluläre Matrix)-Interaktionen, Zell-Adhäsion und auch die Zell-Migration beeinflusst werden. (Schnaar, Gerardy-Schahn, & Hildebrandt, 2014; Yang, Major, & Rutishauser, 1994; Johnson, Fujimoto, U., & D.E, 2005) (siehe **Abbildung 7**). Aufgrund dieser physikalisch-chemischen Eigenschaften von PolySia ist es Zellen möglich sich aus einem Zellverband leichter zu lösen. Durch diese Option ist es nicht verwunderlich, dass PolySia auch in einigen Tumoren (z.B. Neuroblastom, Wilms Tumor, kleinzelliges Lungenkarzinom) vertreten ist und dabei besonders bei der Metastasierung eine Rolle spielt (Sato & Kitajima, 2011).

Die Eigenschaft den Interzellularspalt zu vergrößern erklärt man sich wie folgt: unter physiologischen Bedingungen und neutralem pH-Wert liegt die Carboxygruppe am C1-Ende jeder Sialinsäureeinheit deprotoniert vor. Dadurch weist die PolySia eine negative Ladung sowie auch eine hohe Kapazität für die Bindung von Wasser auf (Yang, Major, & Rutishauser, 1994; Johnson, Fujimoto, U., & D.E, 2005; Rutishauser, 2008; Busch, 2016). Diese Disposition kann durch die Kettenlänge verstärkt werden und beeinflusst die Adhäsionskräfte zwischen den Zellen indem sich zwei benachbarte Zellen mit PolySia-tragenden Proteinen durch die negative Ladung abstoßen und so weiter voneinander entfernen. Es entsteht eine Dynamik zwischen den Zell-Zell-Kontakten (Gascon, Vutskits, & Kiss, 2007). Der Interzellularspalt verbreitert sich, so dass durch das leichtere Lösen aus dem Zellverband auch eine Zell-Migration ermöglicht wird. Dieser antiadhäsive Effekt wird als die wichtigste Funktion von polysialylierten Zellmembranproteinen gesehen (Sato & Kitajima, 2011).

EINLEITUNG

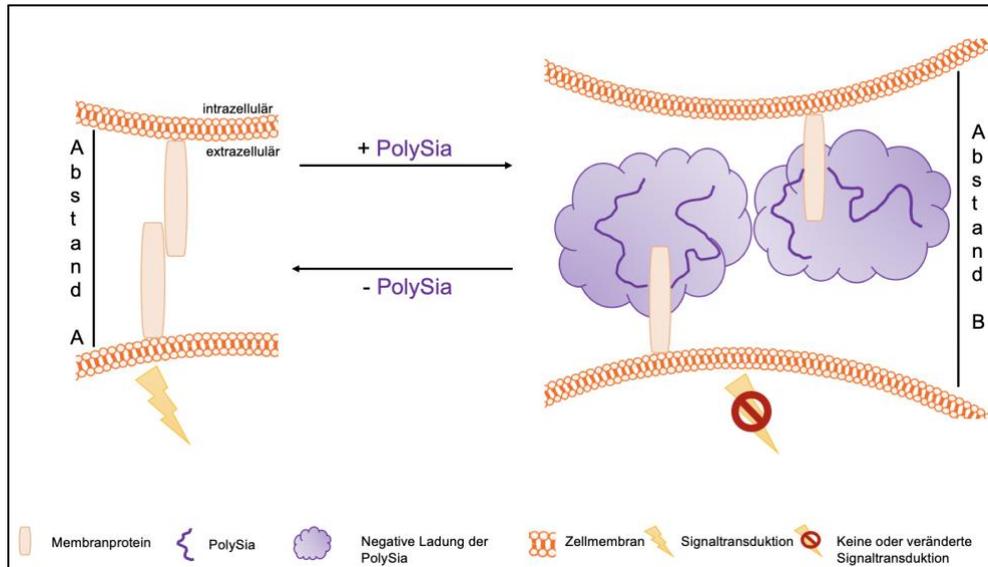


Abbildung 7: Antiadhäsiver Effekt von Polysialinsäure auf den Zell-Zell-Kontakt (vereinfachte Darstellung). Links: Kontakt zweier gleicher Zellmembranproteine (homophile Interaktion) ohne Polysialylierung führt zu einer Signaltransduktion in der Zelle (gelber Blitz). Rechts: homophile Interaktion mit Polysialylierung beider Zellmembranproteine führt zu keiner oder einer veränderten Signaltransduktion. Die Zellmembranen stoßen sich durch die hohe negative Ladung der PolySia (lila Wolke) ab. Der Abstand zwischen den Zellen vergrößert sich (Abstand A (ohne PolySia) < Abstand B (mit PolySia)). Grafik mit Hilfe von ©Motifolio erstellt.

Abgesehen von der antiadhäsiven Wirkung von PolySia wird auch eine „anziehende Wirkung“ beschrieben (Sato, 2017).

Damit ist die Bindung von verschiedenen Biomolekülen wie z.B. Neurotrophine (Nervenwachstumsfaktoren), Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter an PolySia gemeint (Sato & Kitajima, 2011; Kanato, K., & Sato, 2008). Besonders das *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) ist häufig Gegenstand der Forschung. Kanato, et al. haben 2008 gezeigt, das BDNF direkt an PolySia bindet und diese Bindung kettenlängenabhängig ist. Es ist eine PolySia-Kette von 12 Neu5Ac-Molekülen für die Bindung notwendig. Nicht nur BDNF sondern auch der Wachstumsfaktor *fibroblast growth factor 2* (FGF2) (Ono, Hane, Kitajima, & Sato, 2012) und der Neurotransmitter Dopamin (Isomura, Kitajima, & Sato, 2011) binden direkt an PolySia. Dabei wirkt PolySia als eine Art Speicher für diese Moleküle und regelt überdies die lokale Konzentration der Stoffe, greift so in die Signalwege von Zellen ein und verstärkt oder hemmt diese (Colley, Kitajima, & Sato, 2014). Die Freisetzung aus dem Reservoir erfolgt dann durch unterschiedliche Mechanismen, welche auch durch PolySia gelenkt werden, indem diese durch Sialidasen abgebaut wird (Sato, 2017) (siehe **Abbildung 8**).

EINLEITUNG

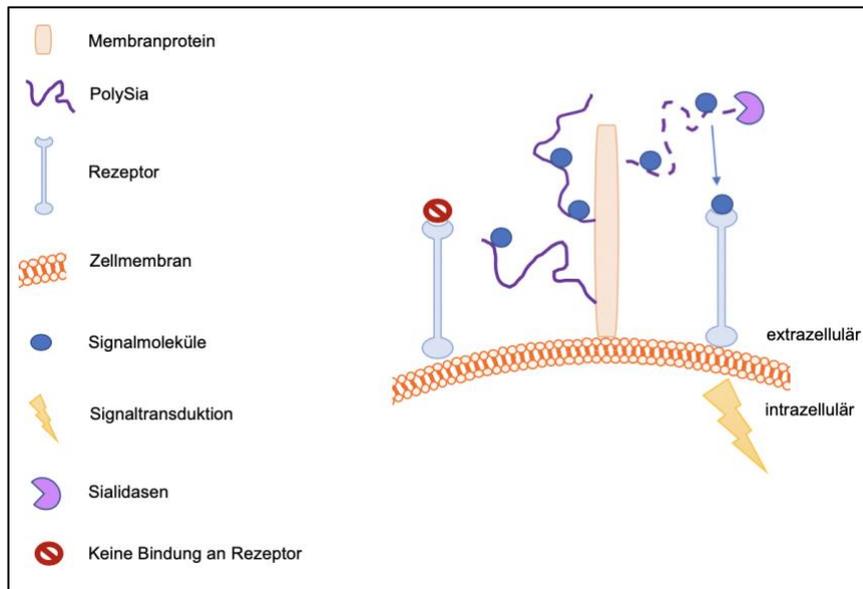


Abbildung 8: Adhäsiver Effekt von Polysialinsäure (PolySia). Signalmoleküle (Neurotrophine, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter), als blaue Kreise dargestellt, werden von PolySia (durchgehend lila) direkt gebunden und als gespeicherte Moleküle zunächst gehalten. Signalmoleküle können so nicht an den dazugehörigen Rezeptor binden. Wenn PolySia von Sialidasen (pink) abgebaut wird (gestrichelt lila), werden die Signalmoleküle aus dem Speicher entlassen und können an den entsprechenden Rezeptor binden und so zu einer Signaltransduktion führen (gelber Blitz). Angelehnt an Sato, et al., 2013. Grafik mit Hilfe von ©Motifolio erstellt.

Neben den Botenstoffen vermag es PolySia auch mit Ionenkanälen oder ihren Untereinheiten zu interagieren (siehe **Abbildung 9**). Beschrieben sind solche Interaktionen für den α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoazolepropionacid (AMPA) – Rezeptor und den N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) – Rezeptor im neuronalen Gewebe. In diesem Fall werden die Öffnungszeiten der verschiedenen Kanäle durch die Interaktion mit PolySia beeinflusst (Vaithianathan, et al., 2004; Hammond, et al., 2006; Sato & Kitajima, 2013).

EINLEITUNG

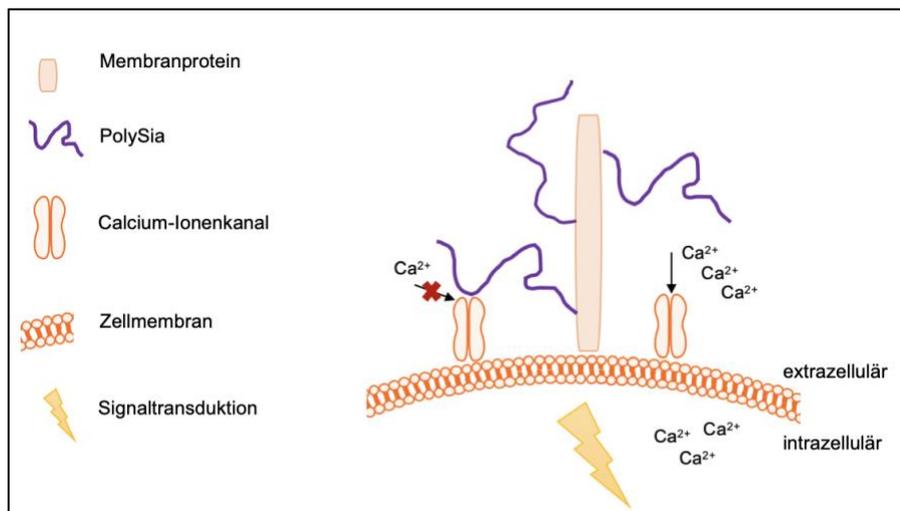


Abbildung 9: Beeinflussung des Ionenverkehrs durch Polysialinsäure (PolySia) am Beispiel des Calcium-Ionenkanals α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoazolepropionacid (AMPA). Links im Bild wird der Ionenkanal durch PolySia blockiert, so dass Calcium (Ca²⁺) nicht nach intrazellulär gelangen kann. Rechts im Bild stört die PolySia den Ionenkanal nicht. Auf diese Weise hat PolySia die Möglichkeit die Signalwege in der Zelle zu beeinflussen (gelber Blitz). Angelehnt an Sato, et al., 2013. Grafik mit Hilfe von ©Motifolio erstellt.

Es ist unverkennbar, dass je nach Kettenlänge der PolySia sowohl die adhäsive als auch die antiadhäsive Wirkung jeweils verstärkt werden können.

Abbildung 10 zeigt die Bedeutung der Kettenlänge beispielhaft für das Neurale Zelladhäsionsmolekül (*neural cell adhesion molecule* = NCAM). Eine Kettenlänge von 60 Neu5Ac-Einheiten überragt das Trägerprotein eindrücklich.

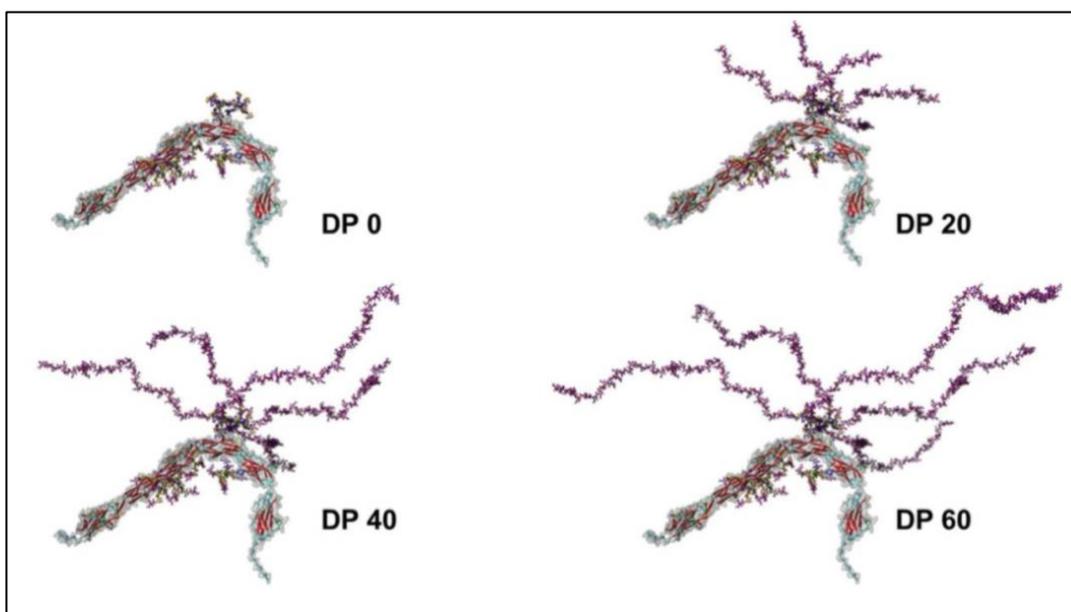


Abbildung 10: Polysialyliertes *neural cell adhesion molecule* (NCAM) mit unterschiedlich langen Kettenlängen im 3D-Modell. DP = degree of polymerisation (= Kettenlänge), Polysialinsäure ist lila dargestellt. (Abbildung aus Galuska, Lütke, & Galuska, 2017, CC-BY)

1.1.4 Trägerproteine von PolySia, Physiologie und Pathophysiologie

Man kennt in Säugern bislang neun PolySia-Träger (siehe **Abbildung 11**). Anhand der Funktion dieser Proteine kann man somit auch die Mannigfaltigkeit der PolySia besser nachvollziehen. Eines der erstentdeckten polysialylierten Proteine, ist die **α -Untereinheit eines spannungsabhängigen Natriumkanals**, welches im adulten Rattenhirn gefunden wurde (Zuber, Lackie, Catterall, & Roth, 1992).

Spannungsabhängige Natriumkanäle sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials von Zellen beteiligt, somit auch bei der Signalübertragung an Nervenzellen.

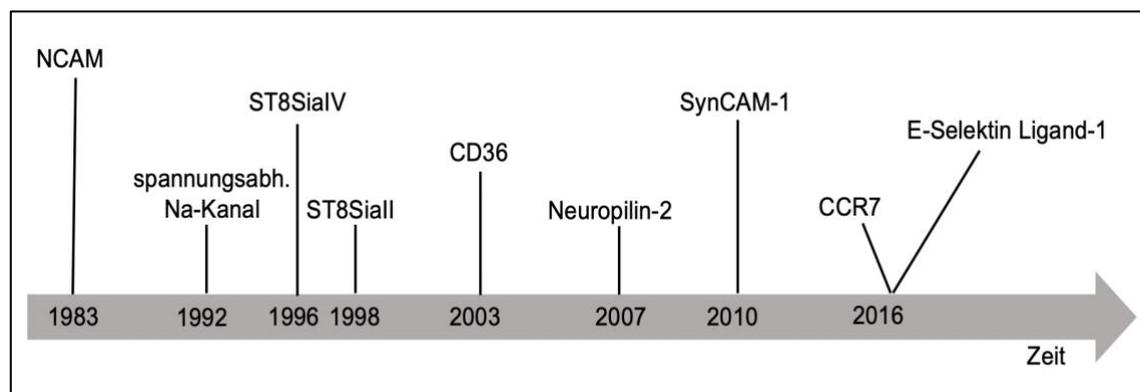


Abbildung 11: PolySia-Trägerproteine bei Säugtieren. Chronologisch nach dem Jahr der Entdeckung geordnet.

Es liegt also nahe, dass PolySia durch die Modifizierung des Natriumkanals es auch vermag die Leitfähigkeit dessen und folglich die Signalübertragung zu beeinflussen. Das die Leitfähigkeit von, mit Neuraminidase behandelten, Natrium-Kanälen aus Ratenhirn reduziert wird, geht aus den Versuchen von Scheuer, et al. 1988 hervor. Eine Rolle kann das z.B. bei Epilepsien spielen, wo es zu einer spontanen und übermäßigen synchronen Entladung von mehreren Nervenzellen der Hirnrinde kommt. Weitere Daten zur näheren Beschreibung der Polysialylierungseigenschaften dieses Proteins fehlen noch.

Mitte bzw. Ende der 90er Jahre wurde die **Autopolysialylierung der Sialyltransferasen ST8SialI und ST8SialV** *in vitro* von Mühlenhoff, et al., 1996 und Close, et al., 1998 beschrieben. Die Autopolysialylierung scheint die Wirkkraft bzw. den Grad der Polysialylierung des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls zu beeinflussen (Close, Tao, & Colley, 2000; Close, et al., 2001). 2013 wurde erstmals die polysialylierte Form von ST8SialI *in vivo* nachgewiesen (Simon, et al., 2013). Ausgedehntere Experimente diesbezüglich sind bislang noch nicht vorhanden.

CD (= cluster of differentiation) 36 ein Zelloberflächenantigen, welches in seiner löslichen Form in der Muttermilch von Menschen und Maus vorkommt, wurde ebenfalls als polysialyliert beschrieben. Dieses polysialyliertes Eiweiß konnte während der gesamten Laktationszeit nachgewiesen werden. Die höchsten Konzentrationen wurden aber im ersten Monat nach der Geburt detektiert (Yabe, Sato, Matsuda, & Kitajima, 2003). Man kann vermuten, dass dies zum Nestschutz des Neugeborenen beiträgt und das polysialyliertes CD36 somit auch an der Entwicklung des Immunsystems beteiligt ist. Dadurch, dass PolySia im Gehirn von Neugeborenen nachzuweisen ist und die Konzentration erst im adulten Hirn abnimmt, kann man auch annehmen, dass PolySia als Nährstoff in der Muttermilch eine wichtige Rolle in der Ausbildung des Nervensystems innehat, zumal Neugeborene sich vorerst nur von Muttermilch ernähren. Da die Sialinsäuren für die Entwicklung des zentralen Nervensystems von großer Bedeutung sind, konnte bereits in Versuchen mit Ferkeln deutlich gemacht werden. Durch die Zugabe von Sialinsäuren in die Milchnahrung hat sich die im Gehirn vorkommende Konzentration an Sialinsäuren erhöht. Damit war auch die Expression von zwei Genen, die das Lernen und das Gedächtnis betreffen, gesteigert (Wang, 2009). Wenn man die hohe Geschwindigkeit der Hirnentwicklung bei Neugeborenen und besonders bei Frühgeborenen berücksichtigt, ist es klar, dass hierfür ein steigender Bedarf an Nährstoffen besteht. Gegebenenfalls sind Sialinsäuren bzw. PolySia eine gute Möglichkeit diesen Bedarf zu decken.

Das **polysialylierte Neuropilin-2** ist ein Membranprotein auf gereiften dendritischen Zellen (Curreli, Arany, Gerardy-Schahn, Mann, & Stamos, 2007), Makrophagen und Mikroglia (Werneburg, Mühlenhoff, Stangel, & H., 2015; Stamos, et al., 2014). Diese Zellen sind antigenpräsentierende Zellen und leiten nach Kontakt mit einem Pathogen eine spezifische Immunantwort ein, indem sie das zu präsentierende Antigen den Zellen des spezifischen Immunsystems (B- oder T-Lymphozyten) zeigen. Bei den dendritischen Zellen z.B. erfolgt die Antigenpräsentation im Lymphknoten. Um dorthin zu gelangen, folgen die Zellen einem Konzentrationsgradienten des Chemokins CCL21. Dies wird Chemotaxis genannt. Polysialyliertes Neuropilin-2 auf gereiften dendritischen Zellen ist der Träger des Chemokins CCL21 (Rey-Gallardo, et al., 2010). Im Lymphknoten angekommen moduliert das polysialylierte Neuropilin-2 die Interaktion zwischen dem T-Lymphozyten und der dendritischen Zelle (Curreli, Arany, Gerardy-Schahn, Mann, & Stamos, 2007).

Der zum Chemokin CCL21 dazugehörige Rezeptor **CCR7** scheint ebenfalls polysialyliert zu sein (Kiermaier, et al., 2016). Durch diese Rolle der PolySia an der Chemotaxis der

dendritischen Zellen zu den Lymphknoten ist sie maßgebend an der Generierung einer Immunantwort beteiligt.

Das **synaptische Zelladhäsionsmolekül SynCAM-1** wurde von Galuska, et al., 2010 als weiteres polysialyliertes Molekül im postnatalen Mäusehirn identifiziert. Das polysialylierte SynCAM-1 ist ein Membranprotein auf Polydendrozyten, auch NG2-Zellen genannt. Der Anteil der NG2-Gliazellen beträgt etwa 5–10 % aller Zellen im Gehirn. Das Besondere an diesen Zellen ist, dass ein Großteil davon auch im erwachsenen Gehirn noch teilungsaktiv ist und so das Potential behält sich nach einer ZNS-Verletzung in Oligodendrozyten oder Astrozyten differenzieren zu können (Steinhäuser & Dietrich, 2015). Das polysialylierte SynCAM-1 scheint eine wichtige Funktion bei Zell-Zell-Interaktionen während der Entwicklung des ZNS im Mäusehirn im Speziellen bei der Einbindung der NG2-Zellen in das neuronale Netzwerk zu haben (Galuska, et al., 2010). Diese Zellen sind in der Lage spezielle Synapsen zwischen sich selbst und Neuronen zu bilden (Nishiyama, et al., 2009). Es wird vermutet, dass das polysialylierte SynCAM-1 die Ausbildung dieser speziellen Synapsen mit moduliert.

2016 ist ein weiterer PolySia-Träger identifiziert worden, das **E-Selektin Ligand 1**, ein Oberflächenprotein, welches an der Zelladhäsion von Neutrophilen Granulozyten und dem Endothel beteiligt ist, somit auch einen Teil der Immunreaktion darstellt (Werneburg, et al., 2016). Auch hier spielt die u.a. durch PolySia ermöglichte Wanderung der Granulozyten zum Entzündungsherd wahrscheinlich eine Rolle.

Das bisher am besten und am frühesten untersuchte polysialylierte Molekül ist **NCAM (*neural cell adhesion molecule*)** (Finne, Finne, Deagostini-Bazin, & Goridis, 1983; Rutishauser, 2008) (siehe **Abbildung 12**). Es ist wie auch SynCAM-1 und E-Selektin Ligand 1, ein Zelladhäsionsmolekül.

Das NCAM liegt besonders während der Entwicklung des Nervensystems polysialyliert vor. Entfernt man die PolySia mittels Endosialidasen, wird die Zellmigration sowohl von Neuronen als auch von Gliazellen während der Entwicklungsphase und das Axonwachstum im jungen und adulten Organismus verändert. Daraus kann gefolgert werden, dass polysialyliertes NCAM an der Ausbildung des **Nervensystems** und auch bei der Regeneration von Nerven nach einer Läsion maßgebend beteiligt ist (Kleene & Schachner, 2004). Des Weiteren wurde polysialyliertem NCAM auch eine Rolle in der neuronalen Plastizität bzw. während der Bildung des Langzeitgedächtnisses zugeschrieben (Kleene & Schachner, 2004). Im **Hippocampus** des adulten Hirns, der

Teil des Gehirns, welcher die Gedächtnisfunktion beherbergt, ist polysialyliertes NCAM weiterhin vertreten (Gascon, Vutskits, & Kiss, 2007).

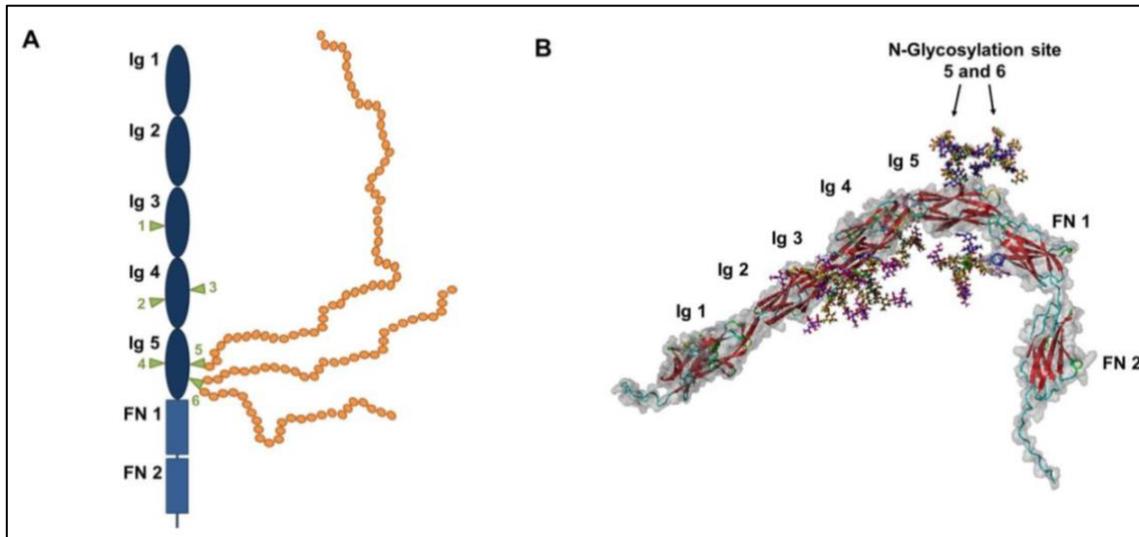


Abbildung 12: Neural cell adhesion molecule (NCAM). (A) Schematische Darstellung eines polysialylierten NCAM. Alle drei Isoformen des NCAM bestehen aus zwei Fibronectin (FN)- und fünf Immunglobulin (Ig)- Domänen. Es gibt sechs N-Glykosylierungsstellen (grüne Dreiecke), wovon nur die Stellen 5 und 6 polysialyliert (orange Kreise) werden. (B) Dargestellt ist ein 3D-Modell des NCAM. (Abbildung aus Galuska, Lütteke, & Galuska, 2017, CC-BY).

Ebenso findet man das Glykokonjugat auch noch in den **hypothalamischen Kerngebieten** und im **olfaktorischen System** (Kanato, K., & Sato, 2008; Theodosis, G., & Poulain, 1991; Seki & Y., 1991; Miragall, Kadmon, Husmann, & Schachner, 1988). Ergänzend ist PolySia-NCAM auch Gegenstand der Forschung bei psychiatrischen Erkrankungen und somit mutmaßlich auch bei höheren kognitiven Funktionen beteiligt (Gascon, Vutskits, & Kiss, 2007).

Drei Hauptisoformen von NCAM sind bekannt, die sich in ihrem Molekulargewicht unterscheiden: es sind Membranproteine mit ca. 120, 140 und 180 kDa. NCAM kommt auch in einer löslichen Form (NCAM-110) vor. Alle Isoformen können polysialyliert sein. Das polysialylierte NCAM kommt nicht nur auf neuronalen Zellen vor, obwohl diese bisher am besten untersucht wurden. In unserer Arbeitsgruppe konnten weitere Vorkommen von PolySia-NCAM identifiziert werden.

2013 haben Simon, et al. und Bäumner beschrieben, dass NCAM-140 und auch die Sialyltransferase ST8SialI polysialyliert **postakrosomal auf Säugerspermien** (bovin, murin und human) und in **Epididymosomen** (extrazelluläre Mikrovesikel im Nebenhodengang) vorkommen. 2014 beschäftigte sich Hänsch mit dem Nachweis von PolySia-NCAM im **Hoden von Rehböcken**. Hier wurde die Lokalisation von PolySia-NCAM während des Reproduktionszyklus des Rehbocks, welcher eine saisonale

Rhythmik zeigt, genauer charakterisiert. Anhand der Daten wurde postuliert, dass PolySia aufgrund des höchsten Expressionslevels während der immer wiederkehrenden Aktivierung und Deaktivierung der Spermatogenese maßgeblich an der morphologischen Umstrukturierung des Keimepithels beteiligt ist.

Wie Moller, et al. 1991 bereits sialyliertes NCAM in Gonaden von Mäusen nachweisen konnte, gelang es ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe polysialyliertes NCAM-140 in **Ovarien von Katzen** nachzuweisen und die Funktion genauer zu charakterisieren. Es wurde festgestellt, dass PolySia-NCAM-140 nur in der Granulosazellschicht von bereits atretischen Follikeln exprimiert wird. Ein Verlust an PolySia führt zu einer Hemmung der Apoptose der Follikel und greift somit in den Zyklus ein (Käse, et al., 2015).

Auch im **Lungengewebe** konnte PolySia detektiert werden. 1994 konnten Lackie et al. zeigen, dass polysialyliertes NCAM auf Epithelzellen von **embryonalem Lungengewebe** vorkommt. In unserer Arbeitsgruppe konnten Ulm et al. 2013 wiederum darlegen, dass auch **adultes Lungengewebe** polysialyliertes NCAM-140 enthält. Der Nachweis gelang mittels Immunhistologie auf peripheren Immunzellen, alveolaren Epithelzellen und vor allem auf bronchialen Epithelzellen (Ulm, et al., 2013). Desweiteren konnte auch PolySia-NCAM im Lungengewebe von COPD- sowie IPF-Patienten detektiert werden, so dass eine Polysialylierung in der Pathophysiologie der Lunge ebenfalls eine Rolle spielen kann (Müller, 2013; Ulm, et al., 2013).

Dabei wurde nicht nur die NCAM-140 Isoform sondern auch eine kleinere sekretierte Variante des NCAM (NCAM-110) nachgewiesen, welches vermutlich auf eine Stimulierung durch IL-1 β (erhöht bei COPD-Patienten) oder LPS (Lipopolysaccharid) hin durch *ectodomain shedding* mittels einer Metalloproteinase freigesetzt wird (Ulm, et al., 2013).

Im Zusammenhang mit der Arbeit von Ulm, et al. und in Kooperation mit Saffarzadeh, et al., (2012) konnte in Zellkulturversuchen mit Alveolarepithelzellen der Lunge eine weitere Eigenschaft von PolySia erkannt werden: **PolySia bindet extrazelluläre Histone und vermag es deren Zytotoxizität gegenüber Zellen signifikant zu reduzieren.**

1.2 HISTONE UND *NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAP* (NET)

1.2.1 Aufbau und Funktion von Histonen

Histone wurden bereits von Albrecht Kossel 1884 entdeckt (Doenecke, et al., 1984). Sie sind DNA-bindende Proteine mit einem hohen Gehalt an den basischen Aminosäuren Lysin, Arginin und Histidin, welche den Molekülen eine positive Ladung verleihen.

EINLEITUNG

Dadurch sind Histone anziehend für negativ geladene Substanzen. Es sind fünf Histonproteine, die in humanen Zellen vorkommen, bekannt: H1, H2A, H2B, H3 und H4. Sie sind maßgebend bei der Faltung des langen DNA-Strangs zu einer kompakten Form beteiligt und bilden mit der DNA das sog. Nukleosom. Dieses besteht aus den verschiedenen Histonproteinen (H2A, H2B, H3 und H4) und die darum gewundene DNA (siehe **Abbildung 13**). Die Histone H2A und H2B sowie H3 und H4 bilden ein Dimer, zwei Dimere tetramerisieren und schließlich verbinden sich die zwei Tetramere zu einem Oktamer.

Durch die positive Ladung der Histone ist eine feste Bindung an die stark negativ geladene DNA möglich. Letztlich wird ein Histonoktamer gebildet, um welches 146-147 Basenpaare gewunden sind. Das Histon H1 ist zwar nicht an der Bildung des Nukleosomen-Komplexes beteiligt, wird aber für die Stabilisierung dessen benötigt. Sie liegt als Verbindungsstück wie auch die *linker*-DNA als sog. *linker*-Histon zwischen den Nukleosomen (Montenarh & Löffler, 2007).

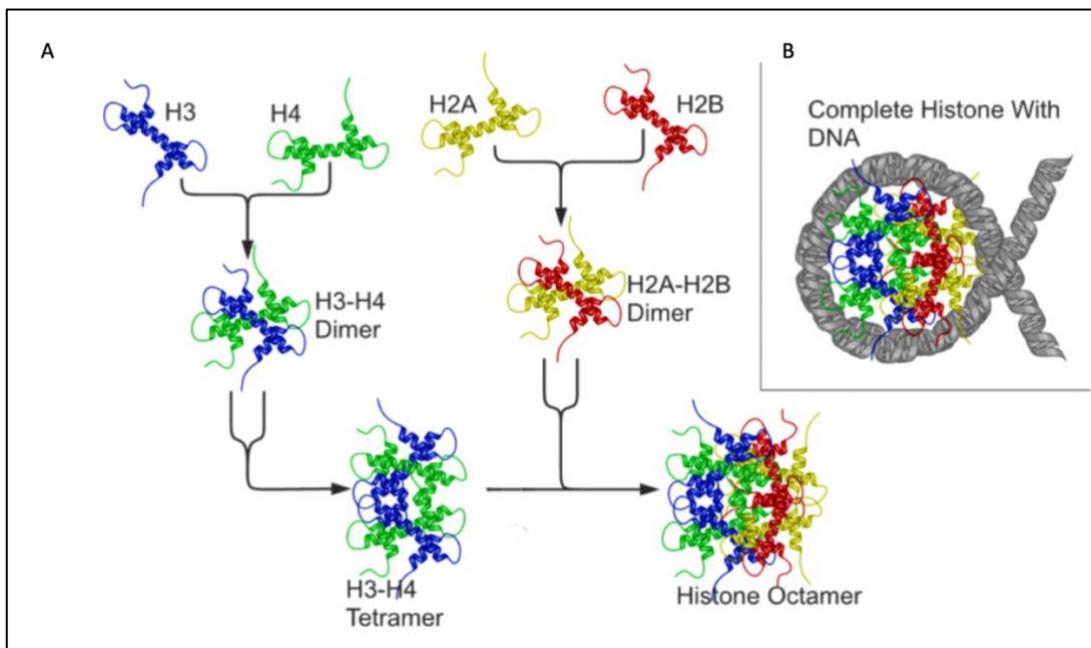


Abbildung 13: Histone. (A) Dimerisierung der Histonproteine zu einem Tetramer und schließlich zum Oktamer. (B) Schematische Darstellung eines Nukleosom-Komplexes aus Histonoktamer und der darum gewundenen DNA. (Modifiziert nach <https://de.wikipedia.org/wiki/>, Richard Wheeler, CC-BY-SA)

Aufgrund ihrer Bindung an die DNA sind sie auch an der Regulierung der Transkription, Replikation und DNA-Reparatur beteiligt. Das Chromatin wird aufgelockert, indem die Histone posttranslational modifiziert werden (Citrullinierung, Acetylierung, Methylierung,

Phosphorylierung, Ubiquitylierung, Biotinylierung, Sumoylierung). Aufgrund der Modifikationen nimmt die Stärke der Bindung zwischen DNA und Histon ab und ein besserer Zugang zur DNA wird gewährt, so dass die entsprechenden Enzyme für Transkription, Replikation oder Reparatur binden können (Zentner & Henikoff, 2013).

1.2.2 Extrazelluläre Histone

Neben der oben beschriebenen Funktion ist eine weitere Aufgabe der Histonproteine bekannt. Als eine Art antimikrobielles Peptid, welches in den Extrazellularraum gelangt, fungiert es als Teil des angeborenen Immunsystems (Kawasaki & Iwamuro, 2008; Rose, et al., 1998; Miller, Abrams, Dorfman, & Klein, 1942). Antimikrobielle Peptide sind aktuell vielsprechender Gegenstand der Forschung, sie werden u.a. als Biozide untersucht und als Ersatz oder Ergänzung für Antibiotika bei multiresistenten Erregern diskutiert (Lavery, Gorman, & Gilmore, 2011; Hancock & Patrzykat, 2002).

Durch unterschiedliche Stimuli, wie eine Entzündung durch Mikroorganismen sowie auch sterile Entzündungsvorgänge wie Traumata, Hypoxie und Autoimmunerkrankungen, können Histone freigesetzt werden (Chen, Kang, Fan, & Tang, 2014; Silk, Zhao, Weng, & Ma, 2017). Es werden drei verschiedene Formen beschrieben, wie Histone im extrazellulären Raum vorkommen: zum einen **frei**, zum anderen an die DNA gebunden als **Nukleosom-Komplex** und zuletzt als **Bestandteil von neutrophil extracellular traps (NETs)** (Silk, Zhao, Weng, & Ma, 2017). Damit ist die Sekretion einer fadenartigen Matrix aus DNA-Komponenten hauptsächlich Histonen, und weiteren antimikrobiellen Peptiden aus den Granula der Neutrophilen gemeint (Brinkmann, et al., 2004; Fuchs, et al., 2007). Neben der Nekrose und Apoptose von Gewebe bzw. Tod von Zellen ist die NETose ein weiterer Mechanismus für die Freisetzung von Histonen in den Extrazellularraum. Die freiwerdenden Histone bewahren die DNA vor einem frühzeitigen Abbau (Allam, Kumar, Darisipudi, & Anders, 2014).

Für Histone ist jedoch auch die Kehrseite der o.g. Abwehrfunktion bekannt: sie fungieren im Extrazellularraum als sog. *damage-associated molecular patterns* (DAMP). Diese sind zytotoxisch und führen über die Aktivierung bzw. Überaktivierung des Immunsystems und durch die Veränderung der Durchlässigkeit der Zellmembran zu weiteren Schäden im Organismus (Xu, et al., 2009; Chen, Kang, Fan, & Tang, 2014; Silk, Zhao, Weng, & Ma, 2017). Endothelschäden, akute Organdysfunktion (Leber, Niere, Gehirn und Lunge) und eine erhöhte Krankheitsaktivität durch mikrovaskuläre Komplikationen sowie höhere Sterblichkeit bei Patienten mit einer Sepsis sind die Folge

(Xu, et al., 2009; Fuchs, Bhandari, & Wagner, 2011; Allam, Kumar, Darisipudi, & Anders, 2014). Auch die Begünstigung von Thrombosen wird Histonen zugeschrieben, zumal sie die Thrombozytenaggregation aktivieren können und prokoagulatorisch wirken (Fuchs, et al., 2010) (siehe **Abbildung 14**).

Erste Experimente in einem Mausmodell zeigen, dass neutralisierende Antikörper gegen Histone den Organismus gegen Schäden schützen können (Abrams, et al., 2013).

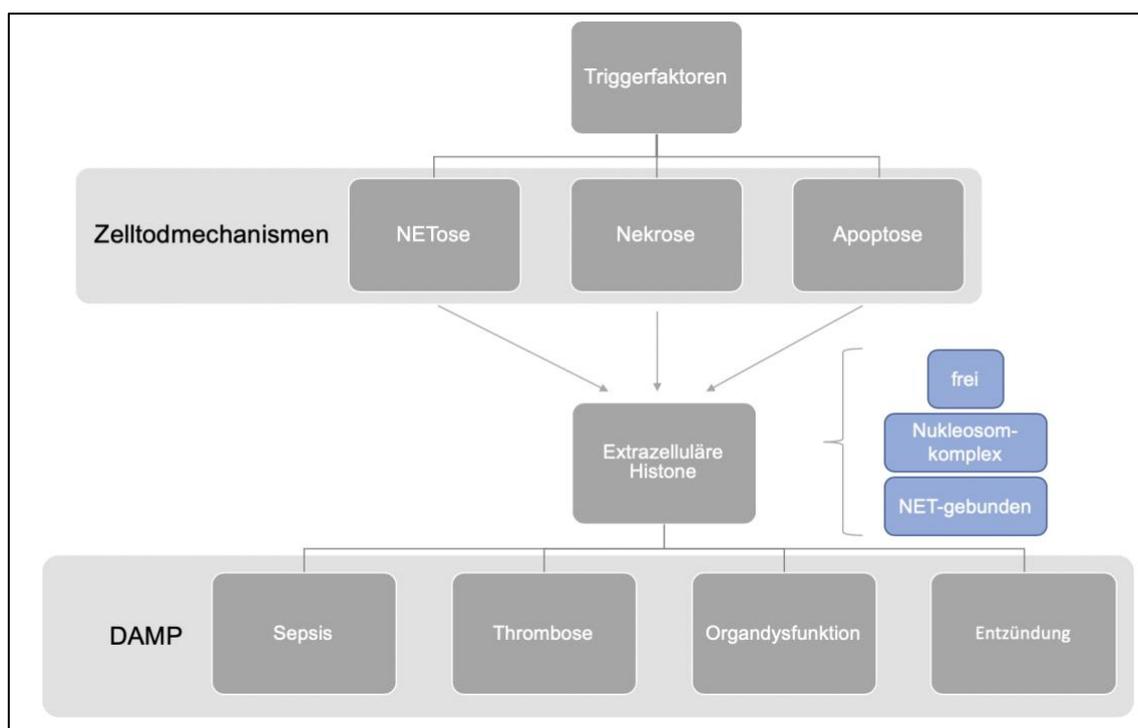


Abbildung 14: Freisetzung und Eigenschaften von extrazellulären Histonen. Durch Triggerfaktoren/Stressoren wie Hypoxie, Infektionen, Traumata und Chemikalien kommt es zu verschiedenen Zelltodmechanismen, bei denen extrazelluläre Histone freigesetzt werden. Extrazelluläre Histone führen als toxische *damage-associated molecular patterns* (DAMP) zu einer Überaktivierung des Immunsystems und schließlich zu verschiedenen Pathologien. Entzündungen, Sepsis, Thrombosen und diversen Organdysfunktionen sind die Folge.

1.2.3 Aufbau und Funktion von *neutrophil extracellular traps* (NETs)

Neutrophile Granulozyten, die mengenmäßig größte Gruppe der Leukozyten im Blutkreislauf, darunter auch Basophile und Eosinophile, gehören dem angeborenen Immunsystem an. Sie sind neben den physikalisch-chemischen Barrieren (z.B. Haut, Schleimhaut, Flüssigkeitsfilm des Auges, Urinfluss, Speichel, Scheidenflüssigkeit und Magensäure) gegenüber Pathogenen die erste Verteidigungslinie. Neben der Beseitigung von Mikroorganismen aktivieren sie weitere Immunzellen zur Bildung einer spezifischen Immunantwort und sind an der Reparatur von geschädigtem Gewebe beteiligt (Branzk & Papayannopoulos, 2013). Dabei haben sie drei Möglichkeiten den

Organismus gegen Krankheitserreger zu schützen: **Phagozytose, Sekretion von antimikrobiellen Peptiden** aus ihren Granula und die im Jahre 2004 von Brinkmann, et al. entdeckte **NETose**. Während diesem Vorgang werden sog. *neutrophil extracellular traps* (NETs) freigesetzt und der neutrophile Granulozyt opfert sich dabei, begeht einen sog. „beneficial suicide“ (= nutzbringender Selbstmord) (Brinkmann & A., 2007; Galuska S., 2013) (siehe **Abbildung 15**). Heute ist auch eine vitale NETose bekannt, bei dieser ein mit NET gefülltes Vesikel aus der Zelle exozytiert wird. Der verbliebene Neutrophile ist dabei noch in der Lage Mikroorganismen zu phagozytieren (Clark, et al., 2007; Pilszczek, et al., 2010; Yipp & Kubes, 2013).

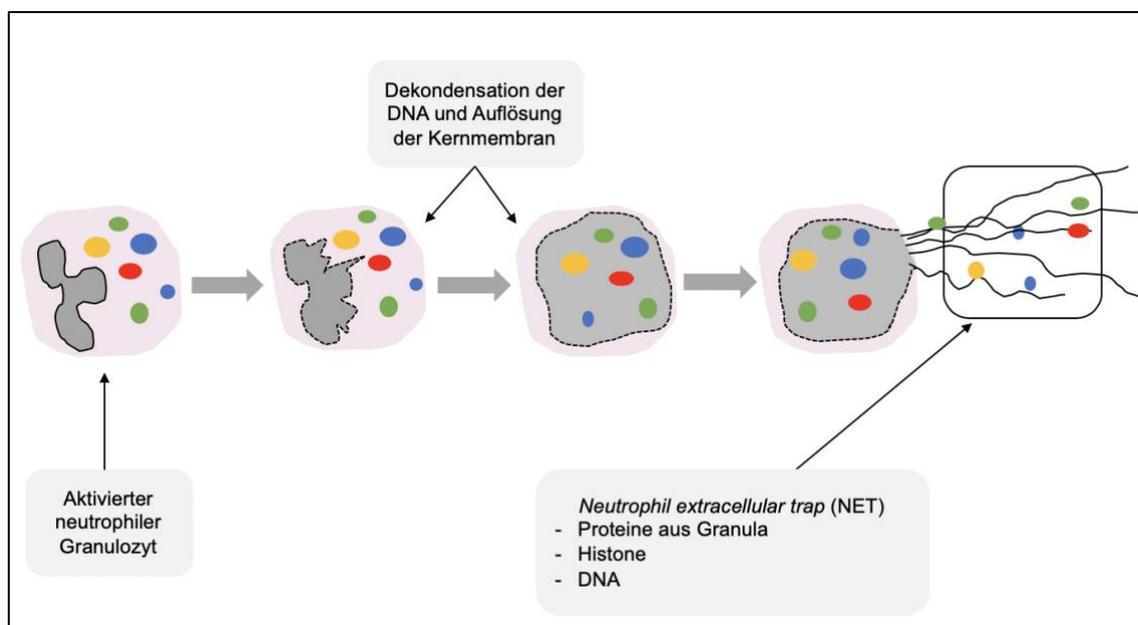


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Bildung von *Neutrophil extracellular traps* (NETs) mit dem Zellysemechanismus. Antimikrobielle Granula sind farbig, Zellkern grau, DNA als schwarze Linien dargestellt. NETose-Mechanismus: Triggerfaktoren aktivieren neutrophile Granulozyten. Es kommt zur Dekondensation des Chromatins, die Kernmembran löst sich auf und der Zellkerninhalt vermischt sich mit den zytoplasmatischen Granula. Schließlich löst sich auch die Zellmembran auf und der Zellinhalt wird nach außen befördert.

Die NETose kann durch verschiedene Triggerfaktoren ausgelöst werden. Zu den Faktoren zählen z.B. Lipopolysaccharide, Zytokine, Autoantikörper, Immunkomplexe, Thrombozyten, Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten), Urate, Cholesterin und Phorbolmyristatacetat (PMA) (Hasler, Giaglis, & Hahn, 2016; Gupta & Kaplan, 2016).

NETs bestehen hauptsächlich aus Histonen und die darum gewundene DNA sowie antimikrobiellen Peptiden wie die neutrophile Elastase, Cathepsin G, Defensine und Myeloperoxidase, welche in den verschiedenen Granula der neutrophilen Granulozyten enthalten sind. Die NETs können Erreger abtöten, nicht nur Bakterien sondern auch

Pilze, Parasiten und Viren, sowie dessen Virulenzfaktoren bzw. Toxine neutralisieren, indem sie die lokale Konzentration von antibakteriellen Molekülen erhöhen, die Schädlinge damit in Schach halten und so außerdem die weitere Verbreitung dieser verhindern (Brinkmann, et al., 2004; Urban, Reichard, V., & A., 2006; Papayannopoulos & A., 2009; Hasler, Giaglis, & Hahn, 2016).

Nicht nur die neutrophilen Granulozyten, sondern auch die weniger zahlreich vertretenen eosinophilen (Yousefi, et al., 2008; Dworski, Simon, Hoskins, & Yousefi, 2011) und basophilen Granulozyten (Morshed, et al., 2014) sind zur Bildung von *extracellular traps* (ETs) fähig. Auch bei weiteren Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen (Doster, Rogers, Gaddy, & Aronoff, 2018), Monozyten (Webster, et al., 2010) und bei Mastzellen (von Kockritz-Blickwede, et al., 2008) ist dieser Vorgang beschrieben worden.

1.2.4 Beteiligung extrazellulärer Histone und *neutrophil extracellular trap* (NET) an verschiedenen Pathologien

Neben der oben beschriebenen Schutzfunktion fungieren NETs, wie im Übrigen auch die Histone, wie ein „zweischneidiges Schwert“. Sie sind an verschiedenen zum Teil schwerwiegenden Erkrankungen beteiligt. Als erstes wurde die Gegenwart von NETs bei einer Shigellen-Infektion von Kaninchen und einer spontanen Appendizitis beim Menschen nachgewiesen (Brinkmann, et al., 2004). Diese krankmachende Funktion wird vor allem den Nukleosomen bzw. extrazellulären Histonen geschuldet (Saffarzadeh, et al., 2012; Fuchs, Bhandari, & Wagner, 2011; Chen, Kang, Fan, & Tang, 2014). Darüber hinaus wird das Ungleichgewicht zwischen NET-Bildung und NET-Beseitigung für die Pathogenese verantwortlich gemacht. Die negativen Folgen sind weitreichend, relevant sind sie z.B. beim Multiorganversagen im Rahmen einer Sepsis, da die NET-Bildung mit Endothel- und Gewebdysfunktion in Zusammenhang gebracht wird (Clark, et al., 2007). Zudem fungieren die in den NETs befindlichen Proteine und Substanzen vor allem DNA und Histone als Autoantigene, die das Immunsystem zur Bildung von Auto-Antikörpern aktivieren (Allam, Kumar, Darisipudi, & Anders, 2014; Grayson & Kaplan, 2016).

Ihre Mitwirkung ist daher vor allem für **Autoimmunerkrankungen** (Grayson & Kaplan, 2016) wie z.B. Systemischer Lupus Erythematosus (SLE) (Villanueva, et al., 2011) und Rheumatoide Arthritis (RA) (Khandpur, et al., 2013) aber auch für **Tumorerkrankungen** beschrieben (Papayannopoulos, 2018; Erpenbeck & Schön, 2017; Berger-Achituv, et al., 2013; Park, et al., 2016; Cools-Lartigue, et al., 2013). Daneben spielen sie ebenfalls eine

Rolle bei **Vaskulitiden** (Kessenbrock, et al., 2009) und der **tiefen Beinvenenthrombose** (Fuchs, et al., 2010; Brill, et al., 2012).

Auch in **chronischen Entzündungen** wie bei der zystische Fibrose (Marcos, et al., 2010) sind NETs vertreten. Bei **allergischen Erkrankungen** wie Asthma bronchiale und Atopische Dermatitis gelang der Nachweis von EETs und zum Teil auch NETs. Welche Rolle diese in der Pathogenese spielen, ist bislang allerdings unklar (Dworski, Simon, Hoskins, & Yousefi, 2011; Simon, et al., 2011; Simon, Simon, & Yousefi, 2013).

Interessant ist auch die Tatsache, dass es während der **Befruchtung im weiblichen Genitaltrakt** zur Aktivierung von Neutrophilen und letztlich zur Bildung von NETs kommt. Dieser Mechanismus dient als Abwehr körperfremder Spermien sowie Mikroorganismen, welche bei der Insemination in den weiblichen Genitaltrakt gelangen. Damit die Spermien den Fängen der NETs entkommen können, enthält die Samenflüssigkeit das Enzym DNAse. Durch dessen Einsatz werden die NET-Bestandteile soweit abgebaut, dass es den Spermien gelingt weiter zur Eizelle vorzudringen (Alghamdi & Foster, 2005).

2 ZIELSETZUNG

Die durch Histone und NET verursachten Pathologien sind umfangreich und die Therapiemöglichkeiten noch Gegenstand der Forschung. Vorrangende Publikationen (unter anderem unserer Arbeitsgruppe) zeigen, dass PolySia die Eigenschaft besitzt die durch NETs oder auch durch Histone induzierte Zell- und Gewebeschädigung zu kompensieren (Saffarzadeh, et al., 2012; Ulm, et al., 2013; Simon, et al., 2013).

Ziel dieser Arbeit war es, diese Eigenschaft von PolySia genauer zu analysieren und zu charakterisieren, mit der Absicht PolySia zukünftig als Therapeutikum einsetzen zu können.

Aus unseren Überlegungen haben sich folgende Fragestellungen ergeben:

- Welche Konzentration wird benötigt damit PolySia die Histon-vermittelte Zytotoxizität kompensiert?
- Welche Kettenlänge der PolySia ist notwendig um die Histon-vermittelte Zytotoxizität zu kompensieren?
- Ist der terminale Sialinsäurerest am nicht-reduzierenden Endes der PolySia-Kette in den Inaktivierungsprozess der Histon-vermittelten Zytotoxizität involviert?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

In den Versuchen dieser Arbeit wurde als PolySia-Äquivalent die Colominsäure verwendet, da diese die gleiche Struktur aufweist wie Polysialinsäure (PolySia) in Säugetieren. Die Colominsäure stammt aus den Zellwänden von *Escherichia Coli* (*E. coli*) und ist ein α 2,8-verknüpftes *N*-Acetyl-Neuraminsäure-Polymer. Anstatt Colominsäure wird hier fortan PolySia als Synonym weiterverwendet.

Alle Versuche bei denen Wasser benötigt wurde, wurden mit Reinstwasser durchgeführt. Dieses wurde durch eine Elix UV5 Anlage vorgereinigt und mit dem Milli-Q entsalzt und analysenrein weiterverarbeitet. Das gereinigte Wasser wird im Rahmen dieser Arbeit als Aqua dest. bezeichnet.

| Verbrauchsmaterial/Laborbedarf | Hersteller/Lieferant |
|---|--------------------------|
| Kryo-Röhrchen | Greiner |
| Deckgläser | Sarstedt |
| Dialyse Cups MWCO 2000Da | Thermo Fisher Scientific |
| Mikrotiterplatten | Greiner, Roth |
| Objektträger für Zellzählung | Biorad |
| Pasteurpipetten | VWR |
| Pipetten (steril mit Stopfen) | VWR |
| Pipettenspitzen (verschiedene Größen) | Eppendorf, Sarstedt |
| Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL) | Eppendorf |
| Spritzen (2 mL, 5 mL) | Braun |
| Zellkulturflaschen | Greiner, Sarstedt |
| Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 48- und 96-well) | Greiner, NUNC, Sarstedt |
| Zellkulturschalen | Greiner, Sarstedt |
| Zentrifugenröhrchen, Falcon® | VWR, Sarstedt |

Tabelle 1: Laborbedarf und Verbrauchsmaterialien

| Geräte | Hersteller/Lieferant |
|--|-----------------------|
| Alpha 1-4 Gefriertrockner | Christ |
| Analysenwaage | Mettler Toledo |
| Autosampler | Midas |
| CO ₂ -Inkubator (MCO-17AIC) | Sanyo |
| Fluoreszenzdetektoren | Jasco, Merck-Hitachi |
| HPLC-Anlagen | Knauer, Merck-Hitachi |
| HPLC-Säulen | Dionex, Merck-Hitachi |

MATERIAL UND METHODEN

| | |
|---|------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> • DNAPac® PA100 • Superspher® 100 RP (reversed phase) C-18 | |
| Kühl-/Gefrierschränke | Bosch, Liebherr, Sanyo |
| Inverses Mikroskop (Typ Wilovert 30) | Hund Wetzlar |
| pH-Meter (Five Easy) Mettler | Mettler |
| Pipetten (verschiedene Größen) | Eppendorf |
| Reinstwasser-Anlage (Milli-Q ®) | Millipore |
| Schüttler (Thermomixer comfort) | Eppendorf |
| SpeedVac RC 10.22 | Jouan |
| Spektrometer UVIKON 922 | Kontron |
| Sterilbank (Holten LaminAir) | Thermo Scientific |
| Ultraschallbad (Bandelin SONORE) | Bandelin |
| Vortexer (Reax top) | Heidolph |
| Wasserbad (WB-14) | Memmert |
| Zellzähler (<i>TC 10™ Automated Cell Counter</i>) | Biorad |
| Zentrifuge (Labofuge 400R, Heraeus) | Kendro |

Tabelle 2: verwendete Geräte

| Rohstoffe | Hersteller/Lieferant |
|--|----------------------|
| 1,2-Diamino-4,5-Methylenedioxybenzol (DMB) | Dojindo |
| Acetonitril | Merck |
| Ammoniumacetat | Sigma-Aldrich |
| Ammoniumbicarbonat | Sigma-Aldrich |
| Colominsäure (α 2,8- <i>N</i> -Acetyl-Neuraminsäure-Polymer) | Sigma-Aldrich, Gerbu |
| Ethylenglykol | Merck |
| Histone | Sigma-Aldrich |
| KDN (Deaminoneuraminsäure) | Sigma-Aldrich |
| Lipopolysaccharid (LPS) | Sigma-Aldrich |
| Methanol | Roth |
| Natriumchlorid (NaCl) | Sigma-Aldrich |
| Natriumcyanoborohydride | Sigma-Aldrich |
| Natriumhydrosulfit | Sigma-Aldrich |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Merck |
| Natriummetaperjodat | Sigma-Aldrich |
| Neu5Ac (<i>N</i> -Acetyl-Neuraminsäure) | Sigma-Aldrich |
| Neu5Gc (<i>N</i> -Glykolyneuraminsäure) | Sigma-Aldrich |
| Salzsäure 30%ig (HCl) | Merck |
| β -Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich |
| Trifluoressigsäure (TFA) | Pierce |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich |

Tabelle 3: verwendete Rohstoffe

MATERIAL UND METHODEN

| Medien/Puffer/Zellkulturzusätze | Lieferant |
|--|--------------------------------------|
| 0,2%ige Trypanblau-Lösung (sterilfiltriert) | Sigma-Aldrich |
| 0,4%ige Trypanblau-Lösung | Biorad |
| <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA; IgG frei) | Carl Roth |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich |
| <i>Dulbecco's Minimal Essential Medium</i> (DMEM) | Gibco |
| <i>Dulbecos Phosphate-Buffered Saline</i> (ohne Calcium und Magnesium) (PBS) | Gibco |
| Erythrozyten-Lyse-Puffer | AG Preissner |
| Fetales bovines Serum (FBS) Gold | Gibco |
| Gentamicin | Gibco |
| <i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> (IMDM) | Gibco |
| <i>Minimal Essential Medium</i> (MEM) mit L-Glutamin | PAA, Gibco, Thermo Fisher Scientific |
| Penicillin/Streptomycin | Gibco |
| <i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS-Puffer) | Thermo Fisher Scientific |
| RPMI-Medium 1640 (mit Glutamin, mit und ohne Phenolrot) | Gibco |
| Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraacetat) | Roth |

Tabelle 4: verwendete Medien, Puffer und Zellkulturzusätze

| Zelllinie | Herkunft | Referenz |
|-----------|---------------------------------|-----------------------|
| A549 | humanes Lungen-Adenocarcinom, ♂ | (Giard, et al., 1973) |

Tabelle 5: verwendete Zellen

3.2 METHODEN

3.2.1 High performance liquid chromatography (HPLC)

Das Grundprinzip der *High performance liquid chromatography* (= Hochleistungsflüssigkeitschromatographie; HPLC) beruht auf der Trennung von Substanzen, die, gelöst in einer mobilen Phase, durch mehr oder weniger starke Wechselwirkungen mit einer stationären Phase (spezifische Trennsäule) anhand ihrer Retentionszeit mit einem entsprechenden Detektor analysiert werden können. Mit Hilfe von Standards ist es möglich die zu trennenden Stoffe zu identifizieren und zu quantifizieren, indem man die Chromatogramme anhand der erhaltenen Retentionszeiten und Absorptionspeaks miteinander vergleicht.

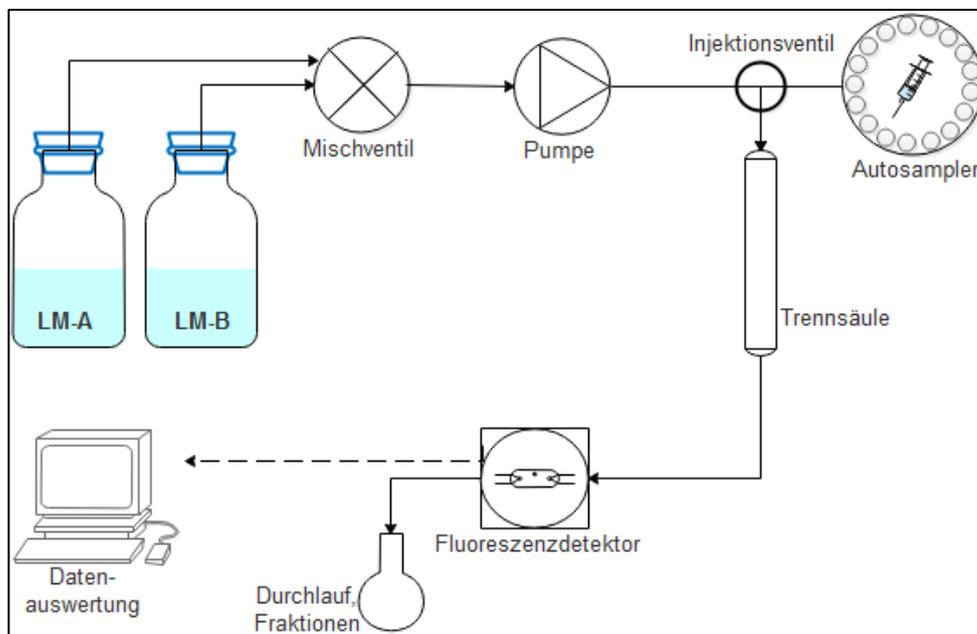


Abbildung 16: HPLC-Anlage (schematisch). Erläuterung siehe Text. Schema mit Hilfe von ©Motifolio erstellt.

3.2.1.1 Aufbau und Funktionsweise der HPLC-Anlage

Wie oben bereits erwähnt ist die HPLC eine sensitive Methode um lösliche Stoffgemische voneinander zu trennen und quantitativ sowie qualitativ zu bestimmen. Die chromatographische Methode wurde in dieser Arbeit zur Kettenlängenbestimmung bzw. Fraktionierung sowie zur Quantifizierung von PolySia verwendet (siehe weiter unten).

Zum Aufbau der HPLC-Anlage (siehe **Abbildung 16**) gehören die Laufmittel A (LM-A) und B (LM-B), auch als mobile Phase bezeichnet, die über eine Gradientenelution in das System eingebracht werden. Ein Gradientenlauf bedeutet, dass die Zusammensetzung des Laufmittelgemischs während des HPLC-Laufes verändert wird. Ferner zählt die eigentliche Trennsäule ebenfalls zu den Hauptbestandteilen einer HPLC-Anlage. Die Trennsäule ist die stationäre Phase einer HPLC-Anlage und besteht meist aus eng gepackten Partikeln, die je nach Säule mit unterschiedlichen chemischen Gruppen beladen sind. Wichtige Vertreter sind z.B. die Anionenaustauschersäule, die mit positiv geladenen Partikeln gefüllt ist, oder die Umkehrphase. Letztere ist mit langen hydrophoben Kohlenwasserstoffketten ausgestattet.

Die mobile Phase wird über ein Mischventil sowie eine Pumpe, die dafür sorgt, dass ein hoher Druck auf der Trennsäule erzeugt wird, Richtung Säule weitergeleitet. Zwischen der Pumpe und der Trennsäule befindet sich ein Injektionsventil, welches zum Einbringen der Probe in das System zuständig ist. Die eigentliche Probenaufgabe erfolgt vollautomatisiert durch den Autosampler. Durch den aufgebauten Druck, die chemischen Eigenschaften der HPLC-Säule und der verwendeten Laufmittel werden die PolySia-Moleküle anhand ihrer Retentionszeit getrennt und mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors identifiziert. Hier wird nach Anregung der DMB-Derivate bei 372 nm die Emission bei 456nm vermessen und aufgezeichnet. Die Daten wurden in einem Personal Computer (PC) mit Hilfe des Programms Eurochrom 2000 als Chromatogramm dargestellt und weiter ausgewertet. In der Regel entspricht einem einzelnen Bestandteil der Probe ein Absorptionsspek im Chromatogramm.

3.2.1.2 Kettenlängenbestimmung von PolySia mit (und ohne) 1,2-Diamino-4,5-Methylendioxybenzol (DMB)-Markierung

Die Kettenlängenbestimmung von PolySia mit und ohne 1,2-Diamino-4,5-Methylendioxybenzol (DMB)-Markierung diente im Rahmen dieser Arbeit als Vorbereitung der Fraktionierung bestimmter PolySia-Kettenlängen zur Weiterverwendung in den anschließenden Zellkulturversuchen.

Zur Kettenlängenbestimmung wird die HPLC-Säule DNAPac® PA100, eine Anionenaustauschersäule, als stationäre Phase verwendet. Die positiv geladenen Gruppen der stationären Phase ziehen in Lösung befindliche Anionen an, so wird die starke negative Ladung von PolySia für die Bindung an die Säule genutzt. In Abhängigkeit vom Polymerisierungsgrad der PolySia-Moleküle und der Ionenstärke des Gradienten ergibt sich jeweils eine unterschiedliche Retentionszeit. Je länger die Kettenlänge ist umso länger bindet PolySia an die Säule bzw. umso höhere Salzkonzentrationen sind nötig, um die die Interaktion mit der stationären Phase

aufzuheben. Mit dieser Methode ist es möglich kleinste Mengen von langkettigen (bis zu 90) PolySia zu detektieren und zu trennen (Inoue, Lin, Lee, & Inoue, 2001).

Zur Fluoreszenzmarkierung erfolgt eine spezifische Derivatisierung mit DMB. Die Spezifität beruht auf der Reaktivität des DMB, genauer seiner zwei Amingruppen, mit der α -Ketosäure, am reduzierenden Ende der Neuraminsäure-Kette (Sato, Inoue, Matsuda, & Kitajima, 1999; Lin, Inoue, & Inoue, 2000) (siehe **Abbildung 17**).

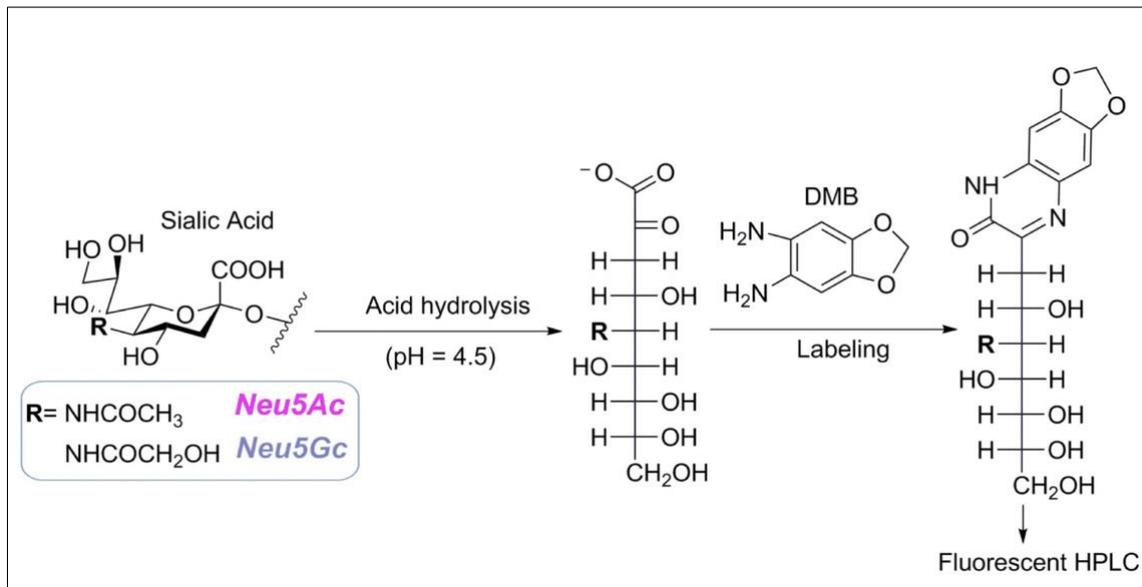


Abbildung 17: DMB-Markierung von Sialinsäuren. Erläuterung siehe Text. (Gebrehiwot, et al., 2018, CC BY)

Vorbereitung der Proben und des Arbeitsreagenzes

Zunächst wurde der **DMB-Puffer** aus den folgenden Rohstoffen hergestellt:

| Rohstoff | Konzentration |
|--------------------------|---------------|
| Natriumhydrosulfit | 0,018 M |
| β -Mercaptoethanol | 1 M |
| TFA (Trifluoressigsäure) | 0,04 M |

➔ in 1mL Portionen aliquotieren und bei -20°C lagern

Anschließend wurde vor jeder Kettenlängenbestimmung ein 1 mL Aliquot des DMB-Puffers zur Herstellung des Arbeitsreagenzes (**DMB-Reagenz**) mit 0,0054 M DMB verwendet.

Es folgte die Markierung der PolySia mit DMB. Dazu wurde die gewünschte Menge an PolySia in 80 μ L verdünntem DMB-Reagenz (1 + 1 mit Aqua dest. verdünnt) aufgenommen und über 24 h bei 11°C oder alternativ 1 h bei 55°C auf einem Schüttler

inkubiert. Die Derivatisierung wurde durch Zugabe von 20 μL 1 M NaOH gestoppt. Die Probe wurde vor Einsatz an der HPLC 1 h bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen. Durch die Zugabe einer Base wird die Laktonisierung der PolySia, welche unter sauren Bedingungen abläuft, aufgehoben (Galuska S. P., et al., 2012).

HPLC-Bedingungen und Lauf

Die Aufgabe der gewünschten Probenmenge auf die Säule erfolgte mit Hilfe des Autosamplers. Die Analyse fand unter folgenden Bedingungen statt:

| | |
|-----------------------|--------------------|
| Temperatur | RT |
| Laufmittel A (LM-A) | Aqua dest. |
| Laufmittel B (LM-B) | 4 M Ammoniumacetat |
| Fluss-Geschwindigkeit | 1 mL/min. |
| Anregungswellenlänge | 372 nm |
| Emissionswellenlänge | 456 nm |

Die Analyse erfolgte bei folgendem Gradienten: $T_{0 \text{ min}} = 0\%$ (v/v) LM-B; $T_{15 \text{ min}} = 7\%$ (v/v) LM-B; $T_{20 \text{ min}} = 14\%$ (v/v) LM-B; $T_{40 \text{ min}} = 20\%$ (v/v) LM-B; $T_{55 \text{ min}} = 24\%$ (v/v) LM-B; $T_{115 \text{ min}} = 35\%$ (v/v) LM-B; $T_{116 \text{ min}} = 100\%$ (v/v) LM-B. Die wurde anschließend für 5 min mit 100% LM-B und danach für ca. 1 h mit 100% LM-A gespült.

3.2.1.3 Fraktionierung von PolySia in verschiedene Kettenlängen

Die Auftrennung von PolySia in verschieden lange Kettenlängen wird fortan als Fraktionierung bezeichnet. Der Fraktionierung von PolySia in die entsprechenden Kettenlängen ging ein Standard-Lauf mit einer mit DMB markierten PolySia-Probe einer bekannten Konzentration voraus (siehe **Abbildung 18**). Dieser fand unter den in 3.2.1.2 genannten Bedingungen statt. Anhand dieses Standards konnte man die Kettenlängen bestimmten Retentionszeiten zuordnen. Die Retentionszeit einer Substanz ist bei den gleichen chromatographischen Bedingungen immer gleich groß, daher war es möglich anschließend unmarkierte PolySia für die Fraktionierung zu verwenden und an der Laufzeit orientierend die Fraktionierung durchzuführen.

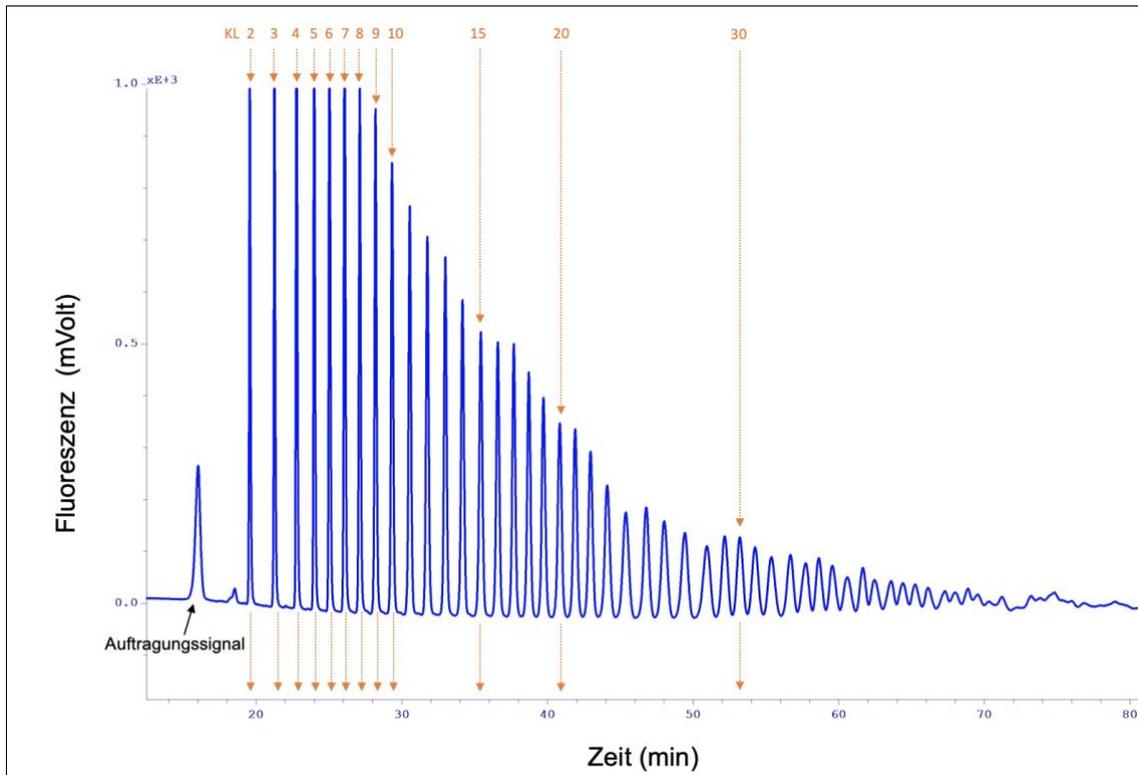


Abbildung 18: HPLC-Chromatogramm eines DMB-markierten Colominsäure-Standards. KL = Kettenlänge; orangene Pfeile markieren jeweils die Sialinsäure-Polymere (mit entsprechender Nummerierung der Kettenlänge) sowie die dazugehörigen Retentionszeiten.

Auf die DMB-Markierung wurde verzichtet, da angenommen wurde, dass sie eventuell die nachfolgenden Zellkulturversuche stört. Die unmarkierte PolySia-Probe wurde gleich der markierten Probe behandelt, d.h. die gleiche Konzentration an PolySia, die gleichen Inkubationszeiten und die gleichen HPLC-Bedingungen. Um die Fraktionierung anschließend zu kontrollieren, wurde ein Teil der gesammelten Proben für eine Re-Chromatographie mit DMB-Markierung verwendet.

Es wurden folgende Kettenlängen (KL)-Gruppen in Rundkolben gesammelt: KL 8-20, KL 21-30, KL 31-40, KL 41-50, KL 51-60, KL 61-70, KL 71-80, KL >81. Die gesammelten Fraktionen wurden bei -20°C vorgekühlt, anschließend mit flüssigem Stickstoff gefroren und über Nacht im Gefriertrockner lyophilisiert, um so eine Konzentrierung der Proben zu erreichen. Durch die Gefriertrocknung wurde das Wasser wieder entzogen. Die getrockneten PolySia-Fraktionen wurden in 2 mL Aqua dest. gelöst und erneut einem Lyophilisierungsvorgang unterzogen. Zur Endlagerung bis zur Weiterverarbeitung wurden die gefriergetrockneten Proben in ca. 700 µL Aqua dest. rekonstituiert, in der SpeedVac getrocknet und bei 4°C gelagert.

3.2.1.4 Quantifizierung der PolySia-Fractionen

Um zu wissen welche Konzentration an verschiedenen PolySia-KL in den Proben, aus den in den Abschnitten 3.2.1.2 und 3.2.1.3 beschriebenen Probenvorbereitungen, vorhanden sind, muss man eine Quantifizierung dieser durchführen. Dieser Schritt bedarf erneut eines HPLC-Laufs.

Für die Quantifizierung wurde eine Superspher® 100 RP C-18 HPLC-Säule verwendet. Diese Säule ist eine sogenannte Reversed-Phase (RP) Säule (Umkehrphase). Damit meint man eine stationäre Phase, die wenig polar ist. Der unpolare Teil der Trennsäule ist hier eine aus 18 Kohlenstoffatomen bestehende Alkylkette, welches an das Trägermaterial der Säule gekoppelt wurde. Diese RP-Säule sorgt dafür, dass die Probe in Abhängigkeit von ihrer Polarität an der Oberfläche festgehalten wird. D.h. je unpolarer sie ist, umso stärker wird sie retadiert. Anhand von Standards definierter Konzentration ist es möglich eine Kalibrationskurve zu erstellen und so die genaue Konzentration der PolySia-KL der Proben zu berechnen. Als Standard wurde hier eine Mischung aus Neu5Ac, Neu5Gc und KDN gewählt und den gleichen Bedingungen ausgesetzt wie die Proben (siehe **Abbildung 19**).

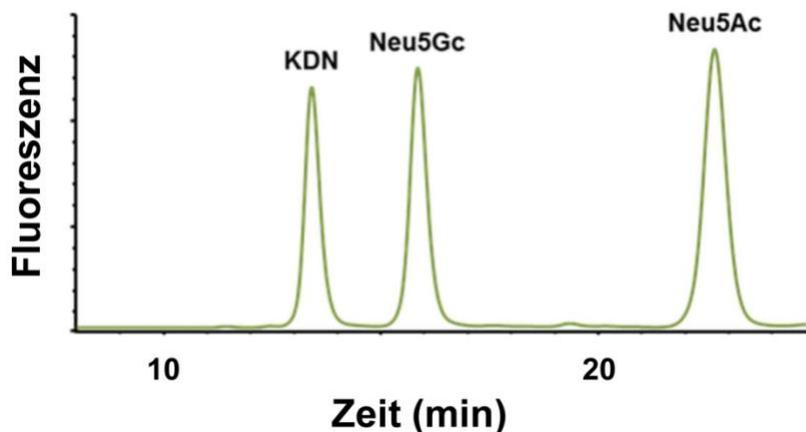


Abbildung 19: Quantifizierung von PolySia. Die drei Sialinsäuren KDN, Neu5Gc und Neu5Ac werden nach Fluoreszenzmarkierung mittels HPLC getrennt (HPLC-Lauf veröffentlicht in Galuska S. P., et al., 2017).

Vorbereitung der Proben und des Arbeitsreagenzes

Zunächst erfolgt eine Hydrolyse der Proben mit 0,2 N TFA, dafür wurden die getrockneten Proben in 200 µL TFA aufgenommen und für 4 h bei 80 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Trocknung in der SpeedVac.

Der Hydrolyse folgte die Markierung der Proben mit DMB analog wie in Kapitel 3.2.1.2 bereits beschrieben wurde. Im Unterschied zur Kettenlängenbestimmung wurde hier 2 h bei 55°C inkubiert und der Reaktionsstopp mit 20 µl einer 0,2 M NaOH herbeigeführt (Galuska et al. 2012).

HPLC-Bedingungen und Lauf

Auch hier erfolgte die Aufgabe der Proben mittels Autosampler. Die Analyse fand unter folgenden Bedingungen statt:

| | |
|-----------------------|-----------------------------------|
| Temperatur | Probenteller: 8°C, Reaktion: 45°C |
| Laufmittel A (LM-A) | siehe unten |
| Laufmittel B (LM-B) | siehe unten |
| Fluss-Geschwindigkeit | 0,3 mL/min. |
| Anregungswellenlänge | 372 nm |
| Emissionswellenlänge | 456 nm |

Als Laufmittel zur Trennung wurden ein Methanol/Acetonitril/Wasser/TFA-Gemisch (LM-A) (4:4:92:0,1 v/v) sowie Methanol/Acetonitril/Wasser/TFA (45:45:10:0,1 v/v) als LM-B verwendet. Die Analyse erfolgte bei folgendem Gradienten: $T_{0 \text{ min}} = 0\%$ (v/v) LM-B; $T_{2 \text{ min}} = 0\%$ (v/v) LM-B; $T_{20 \text{ min}} = 5\%$ (v/v) LM-B; $T_{25 \text{ min}} = 9\%$ (v/v) LM-B; $T_{30 \text{ min}} = 15\%$ (v/v) LM-B; $T_{35 \text{ min}} = 100\%$ (v/v) LM-B; $T_{40 \text{ min}} = 100\%$ (v/v) LM-B. Die wurde anschließend für 15 min mit 100% LM-B und danach für ca. 1 h mit 100% LM-A gewaschen/gespült.

3.2.2 Modifizierung der PolySia durch Oxidation am nicht-reduzierenden Ende

10 mg der PolySia wurden mit einer frisch hergestellten 0,1 M Natriummetaperjodat-Lösung versetzt. Das Gemisch wurde für vier Stunden bei 4°C auf einem Rüttler im Dunkeln inkubiert. Mit der zweifachen Menge an Ethylenglykol (3%ig) wurde die Reaktion gestoppt, indem die Probe für weitere 30 min bei 20°C auf dem Rüttler belassen wurde.

Um die Probe von überschüssigen Reaktionsreagenzien zu befreien wurde sie gegen eine 25 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung über 24 h dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

3.2.3 Zellkultur

3.2.3.1 Kultivierung von A549-Zellen

Der Arbeitsablauf im Umgang mit der Kultivierung von Zelllinien beinhaltet gewöhnlich folgende Schritte:

- das Auftauen von Zellen
- das „Füttern“ oder Mediumwechsel der Zellen
- die Subkultivierung oder das Passagieren von Zellen

- Zellzählung für nachfolgende Versuche
- Inkubation der Zellen mit PolySia und Histonen
- ggf. das Einfrieren (Kryokonservierung) von Zellen

Bei der A549 Zelllinie handelt es sich um adhärent wachsende Zellen, die aus einem humanen Lungen-Adenocarcinom stammen. In vorangehenden Arbeiten wurde bereits mit dieser Zelllinie bei ähnlicher Fragestellung gearbeitet (Saffarzadeh, et al., 2012; Ulm, et al., 2013). Die Kultivierung erfolgte mit den zuvor genannten Medien (siehe **Tabelle 4**) mit den Zusätzen L-Glutamin, 10%iges fetales Kälberserum (FCS) sowie, als Prophylaxe vor mikrobiellen Kontaminationen, mit einer 1%igen Kombination aus Penicillin und Streptomycin. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt bebrütet. Alle Reagenzien (Zellkulturmedien, Zellkulturzusätze, Puffer etc.) wurden vor Beginn ihrer Anwendung auf 37°C im Wasserbad vortemperiert.

Das Auftauen von A549 Zellen

Gelagert wurden die A549 Zellen bis zu ihrer Verwendung in dafür vorgesehene Kryoröhrchen in einem Stickstofftank bei bis zu -196°C. Im Gegensatz zum Einfrieren von Zelllinien sollte das Auftauen möglichst ohne Verzögerungen und Überhitzung erfolgen, so können eventuelle Zellschäden vermieden werden. Direkt nach Entnahme der eingefrorenen Zellen aus dem Stickstoffbehälter wurden die Zellen für wenige Sekunden im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Um das Frostschutzmittel, in diesem Fall Dimethylsulfoxid (DMSO), zu entfernen wurde die aufgetaute Zellsuspensionen in 9 mL vorgewärmtem Medium aufgenommen und bei 1000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem Medium vorsichtig resuspendiert. Diese Suspension wurde schließlich je nach Bedarf in einer Zellkulturschale oder Zellkulturflasche ausgesät. Um restliches DMSO zu entfernen, wurde das Medium nach 24 h gewechselt.

Der Mediumwechsel bei A549 Zellen

Damit die Zellen wachsen und sich vermehren können wurde ca. zweimal pro Woche das Medium gewechselt um den Verbrauch an Nährstoffen und die Produktion von Stoffwechselendprodukten, die zu Zellschäden und vorzeitigem Zelltod führen können, zu kompensieren. Außerdem berücksichtigt man damit auch die Halbwertszeit der Antibiotika, die im Medium vorhanden sind.

Bevor das frische Medium zu den Zellen gegeben wurde, wurde das alte Medium vorsichtig abgesaugt, zu der Zellkulturplatte anschließend auf 37°C temperiertes *Phosphate Buffered Saline* (PBS) hinzu pipettiert. Nach mehrmaligem Schwenken

wurde das PBS ebenfalls abgesaugt und das frische Medium hinzugegeben. Es besteht auch die Möglichkeit nur einen Teil des Mediums zu wechseln, da so die Wachstumsfaktoren, die von den Zellen selbst produziert werden, erhalten bleiben.

Das Subkultivieren von A549 Zellen

Die A549 Zellen verdoppeln sich innerhalb von 22-40 Stunden und wachsen rasenartig auf der Oberfläche von Zellkulturgefäßen, bedecken diese also bis sie Platz haben. Dann folgt gewöhnlich ein Wachstumsstopp oder auch Zelltod. Damit die Zellen sich weiter vermehren können bedarf es einer Subkultivierung oder auch eines Umsetzens in andere Zellkulturgefäße. Dafür müssen die Zellen von der Zellkulturschale sowie auch voneinander gelöst werden. Die hier verwendeten A549 Zellen wurden alle 3-4 Tage passagiert. Dies erfolgte mit einer Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Lösung. Trypsin ist eine Protease und löst Zell-Matrix-Verbindungen, die zwischen dem Zellkulturgefäß, Medium und Zellen besteht. Das EDTA ist ein Calcium-Fänger, der dafür sorgt, dass die Zell-Zell-Bindeproteine kein Calcium zur Verfügung haben um an die Nachbarzelle zu binden. Es wurde zunächst wie oben beim Mediumwechsel beschrieben vorgegangen: eine zu 80-90% mit Zellen bedeckte Platte (konfluent) wurde verwendet, altes Medium wurde abgesaugt und mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe von ca. 2-4 mL (je nach Größe des Kulturgefäßes) einer 0,2 %igen Trypsin/EDTA-Lösung zu den Zellen, die anschließend im Brutschrank für 1-3 Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Danach wurde vorsichtig gegen die Zellkulturschale geklopft, um auf mechanische Weise eine Lösung der Zellen von der Schale zu bewirken. Zusätzlich wurden 4-8 mL an vorgewärmten Medium (doppelte Menge an Medium wie Trypsin/EDTA-Lösung) der Zellkulturschale hinzugefügt um das Detachment zu stoppen. Gleichzeitig konnten mit dieser Lösung die Zellen durch Spülen vom Boden besser gelöst werden. Dieses gesamte Gemisch wurde in ein Falconröhrchen überführt und 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann vorsichtig abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 1 mL vorgewärmten Medium achtsam resuspendiert und erneut mit Medium auf 10 mL aufgefüllt und homogenisiert.

Zwischenzeitlich wurden neue Zellkulturgefäße vorbereitet, 10-15 mL (je nach Größe des Kulturgefäßes) Medium hinzugegeben und die Zellen, je nach Bedarf und Zellzahl, auf die vorbereiteten Zellkulturschalen ausgesät.

Zellzählung

Für die folgenden Versuchsansätze (siehe Kapitel 3.2.3.2), war es notwendig die Zellen zu zählen, um genormte Bedingungen herzustellen und um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei mehrfach durchgeführten Versuchen gewährleisten zu können. Es wurden zwei verschiedene Methoden zur Zellzählung verwendet:

- manuelle Zellzählung mit Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer
- automatisierte Zellzählung mit einem Zellzählgerät (hier: *TC 10™ Automated Cell Counter*)

a) manuelle Zellzählung mit Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer

Trypanblau hat sich als Zellfarbstoff in der Zellkultur bewährt. Es ist ein saurer Farbstoff aus der Gruppe der Azofarbstoffe, dessen Anionen an Zellproteine binden können. Der Farbstoff dringt nur in tote Zellen ein, dessen Membran durchlässig geworden ist, so dass sie auch als eine Ausschlussfärbung bezeichnet wird. Entsprechend werden bei der Färbung die toten Zellen blau angefärbt und die lebenden Zellen leuchten im Mikroskop hell auf. Wenn die Inkubationszeit mit Trypanblau zu lang wird, wirkt der Farbstoff zytotoxisch und die Zellen werden fälschlicherweise als avital gesehen und nicht bei der Zellzählung mitgezählt (Schmitz, 2011).

Mit der **Neubauer-Zählkammer** meint man ein Messgerät, das aus Spezialglas hergestellt ist und der Bestimmung der Teilchenzahl pro Volumeneinheit einer Lösung dient. Sie besteht aus einer dicken Grundplatte von der Größe eines Objektträgers, in welche drei Stege durch Längsrillen hineingefräst sind. Die glattgeschliffenen Seitenstege sind 0,1 mm höher als der Mittelsteg, in welchen meist zwei sich gegenüberliegende Zählnetze eingraviert sind.

Dieses Zählnetz besteht aus neun großen Quadraten (3 x 3), deren Fläche je 1 mm² beträgt. Bei einer Tiefe von 0,1 mm ergibt das ein Volumen von 0,1 µl. Die Zellen werden unter dem Mikroskop (Phasenkontrast) ausgezählt.

Gewöhnlich werden die vier großen Außenquadrate für die Zellzählung verwendet und der Mittelwert errechnet. Dabei ist darauf zu achten, dass Zellen, die auf den Linien liegen, nicht doppelt gezählt werden (siehe **Abbildung 20**).

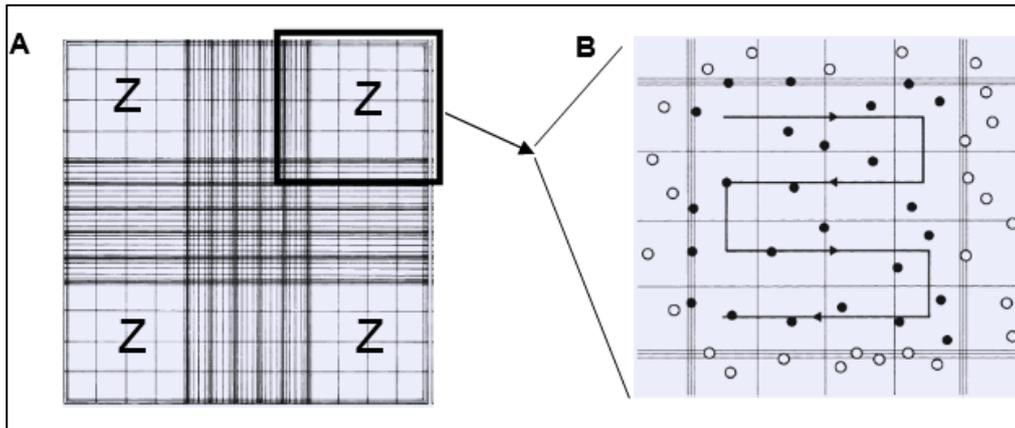


Abbildung 20: Neubauer-Zählkammer. (A) neun Quadrate, (Z) Eckquadrate zum Auszählen der Zellen. (B) Auszählung der lebenden Zellen (schwarze Punkte), Zellen außerhalb des Zählfeldes und tote Zellen werden nicht berücksichtigt. Dabei werden zwei Ränder vom Zählen ausgeschlossen, hier: unterer und rechter Rand. (Modifiziert nach Gstraunthaler & Lindl, 2013)

Um die Zellen zählen zu können, wurde zunächst ein Deckglas auf die Kammer angebracht. Die richtige Lage bestätigte das Erscheinen von „Newtonringen“. Anschließend wurde die Kammer mit der zu zählenden Zellsuspension bestückt. Dafür wurde ein Teil der vorher geernteten Zellsuspension je nach Dichte der Zellen 1:3 oder 1:4 mit einer 0,2%igen Trypanblau-Lösung verdünnt. 10 µL dieser Suspension wurden durch Ansetzen der Pipette an die Kante des Mittelstegs gesetzt und mit Hilfe von Kapillarkräften in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Kammer gesaugt.

Zuletzt erfolgten die Zellzählung und die Berechnung der Zellzahl (Formel 1).

$$Z \times VF \times V \times 10^4 = \text{Gesamtzellzahl/mL}$$

Formel 1: Berechnung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer. Z = Mittelwert der 4 großen Eckquadrate, VF = Verdünnungsfaktor (mit Trypanblau-Lösung), V = Volumen der Zellsuspension, 10^4 = Konversionsfaktor

b) automatisierte Zellzählung mit dem TC 10™ Automated Cell Counter

Das Prinzip der automatischen Zellzählung am TC 10™ Automated Cell Counter beruht auf einer Autofokussierung mit Hilfe von Mikroskopie. Dabei werden multiple Flächen untersucht, um die beste herauszufiltern und so Zelldebris von vitalen Zellen besser unterscheiden zu können.

Zur Ausrüstung gehörten ein spezieller Objektträger und eine 0,4%ige Trypanblau-Lösung. Die Zellsuspension wurde hier 1 + 1 mit der Trypanblau-Lösung versetzt und gut vermischt. Anschließend wurden 10 µL dieser Mischung in den dafür vorgesehenen Bereich der Objektträger pipettiert. Der beladene

Objektträger wurde in das Gerät eingeführt und die Zellzahl wurde anhand von Algorithmen automatisch bestimmt.

3.2.3.2 Inkubation von A549-Zellen mit PolySia und Histonen

Die zuvor eingefrorenen A549-Zellen wurden aufgetaut und in einer 96-well Platte mit jeweils 30.000 Zellen/well in RPMI-Medium ausgesät sowie für 24 h (bei 37°C, 5% CO₂) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und über Nacht mit jeweils 100 µL RPMI-Medium (ohne den Farbstoff Phenolrot, dieser stört die Zytotoxizitätsmessung) sowie:

- mit und ohne Zusatz von Histonen (in verschiedenen Konzentrationen)
- mit verschiedenen KL der zuvor fraktionierten PolySia

versetzt, um jedes Mal den Einfluss der KL auf die Histon-vermittelte Zytotoxizität aufzuzeigen. Als Negativ-Kontrolle galten unbehandelte Zellen. Die Zytotoxizität wurde photometrisch gemessen (siehe unten).

Probenvorbereitung (Reinigung der Colominsäure und Endotoxintest)

Das PolySia-Äquivalent Colominsäure, welche für die Versuche verwendet wurde, ist aufgrund ihrer bakteriellen Herkunft kontaminiert mit Lipopolysacchariden (LPS). Diese wiederum wirken störend auf die durchgeführten Zellkulturversuche, so dass die Colominsäure von LPS gereinigt werden musste. Die Reinigung erfolgte mit einer Festphasenextraktion mit Hilfe einer C18 ec Kartusche (Macherey-Nagel™, Thermo Fisher Scientific). Aufgrund der unpolaren C18-Ketten ist sie besonders geeignet für die Bindung von hydrophoben Verbindungen wie LPS. LPS aus der Probe bindet an die Säule, so dass die im Durchlauf befindliche Colominsäure letztlich LPS-frei war. Dies konnte in einem Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) bestätigt werden. Der Test (hier verwendet: *Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit*, Thermo Fisher Scientific) dient dem Nachweis von Endotoxinen aus Gram-negativen Bakterien (wie z.B. LPS) und beruht auf einem kinetischen Assay, in welchem ein photometrisches Signal in Anwesenheit von Endotoxinen erzeugt wird. Das Signal wird vermessen und anschließend die Endotoxinkonzentration mit Hilfe einer Standardkurve berechnet.

3.2.4 Zytotoxizitätsmessung

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein zytoplasmatisches Enzym, welches in jeder Zelle vorkommt. Bei Schäden der Zellmembran gelangt LDH schnell in das extrazelluläre

Milieu, in diesem Fall in das Zellkulturmedium. Aufgrund dieser Eigenschaft eignet sich das Enzym gut als Marker für die Zytotoxizität bzw. Vitalität von Zellen.

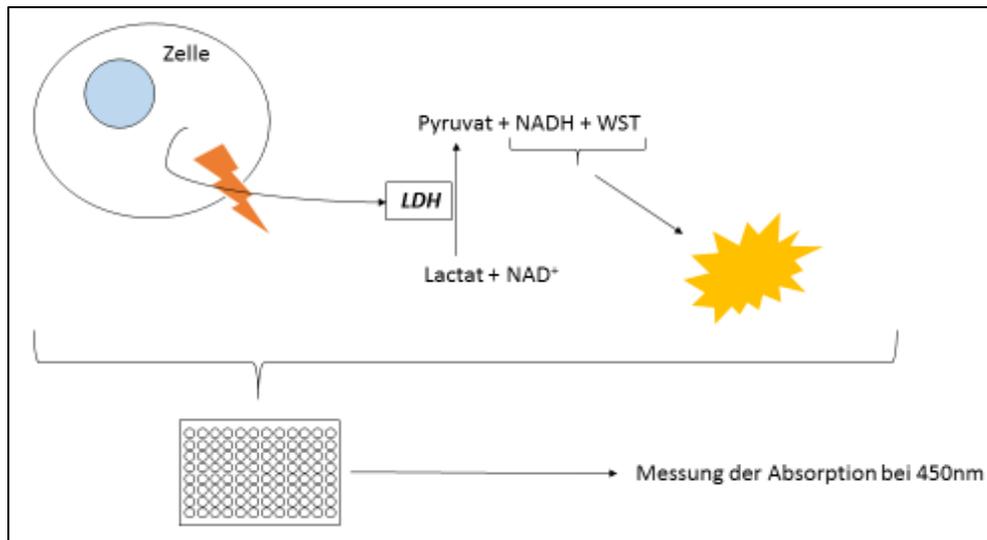


Abbildung 21: Prinzip des LDH-Assays. Schematisch dargestellt ist eine Zelle mit einem Schaden an der Zellmembran (Blitz), dadurch gelangt LDH aus der Zelle. Dieses oxidiert Laktat zu Pyruvat und reduziert dadurch NAD^+ zu NADH . Das NADH wiederum reagiert mit dem WST-Farbstoff und es entsteht eine gelbe Farbe. Diese ist proportional zur LDH-Aktivität in der Probe. Gemessen wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 450nm an einem Photometer. (WST= water soluble tetrazoline).

Das Prinzip des Testes beruht auf einer enzymgekoppelten kinetischen Reaktion, die in Abhängigkeit von der Aktivität der LDH letztendlich zur Generierung eines gelben Farbstoffes führt, dessen Intensität an einem Photometer gemessen werden kann (siehe **Abbildung 21**).

3.2.4.1 Material und Durchführung

In dieser Arbeit wurde für die Zytotoxizitätsmessung der *LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay Kit II* von BioVision (Milpitas, USA) verwendet und die Messungen jeweils am Absorptions-Reader ELx800™ von Bio-Tek® durchgeführt.

In dem *LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay Kit II* von BioVision war enthalten:

- Farbstoff-Gemisch (enthält WST)
- LDH-Assay Puffer
- Zell-Lyse-Lösung
- Stopp-Lösung
- LDH als Positiv-Kontrolle

Vorbereitung des Arbeitsreagenzes:

Zunächst erfolgte die Rekonstitution des Farbstoff-Gemisches (WST) mit 1,1 mL Reinstwasser. Nach einer zehn minütigen Inkubationszeit wurde dieses Reagenz mit dem LDH-Assay Puffer in einem Verhältnis von 1:51 gemischt.

Probenvorbereitung und Messung:

Als Probe dienten die Zellkulturüberstände von in 96-well Mikrotiterplatten kultivierten sowie stimulierten Zellen (siehe Kapitel 3.2.3.2). Zur internen Qualitätskontrolle und Berechnung der Zytotoxizität wurden verschiedene Kontrollen mitgeführt. Zur Hintergrundkontrolle wurden Vertiefungen lediglich mit Medium, d.h. ohne Zellen verwendet. Bei der hohen Kontrolle bedurfte es einer Vorbehandlung der Zellen mit 10 µL Zell-Lyse-Lösung. Bei der niedrigen Kontrolle war keine Vorbehandlung notwendig. Nach einem leichten Schwenken erfolgte eine Inkubation bei RT über 30 min. Anschließend wurde die Zellkulturplatte für 10 min bei 600 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurden jeweils 10 µL des Überstandes der Zellkulturplatte sowie 11 µL der hohen Kontrolle in eine neue 96-well Mikrotiterplatte überführt und zusätzlich pro Vertiefung 100 µL des Arbeitsreagenzes hinzupipetiert und vorsichtig gemischt. Es folgte eine lichtgeschützte Inkubation bei RT für 30 min und danach die Messung am Absorptions-Reader ELx800™ von Bio-Tek®.

Berechnung der Zytotoxizität:

Die Proben wurden in vierfacher Bestimmung vermessen. Die Werte der Proben konnten für die Berechnung verwendet werden, wenn die hohe Kontrolle eine Extinktion von ca. 2 hatte und die niedrige Kontrolle bei 0,6-0,8 lag. Die Zytotoxizität in % wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{(\text{Abs. [Probe]} - \text{Abs. [niedrige Kontrolle]})}{(\text{Abs. [hohe Kontrolle]} - \text{Abs. [niedrige Kontrolle]})} \times 100$$

Formel 2: Berechnung der Zytotoxizität in %. Abs. = Absorption

Für die statistische Auswertung wurde die Software Prism (Version 7.03, GRAPHPAD) verwendet. Die Daten wurden mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (*Analysis of Variance*, ANOVA) in Kombination mit dem Tukey-Test ausgewertet.

4 ERGEBNISSE

4.1 DIE INHIBITION DER ZYTOTOXISCHEN EIGENSCHAFTEN VON HISTONEN DURCH POLYSIALINSÄURE (POLYSIA) IST KONZENTRATIONSABHÄNGIG

Das die PolySia es vermag die zellschädigenden Eigenschaften von extrazellulären Histonen zu kompensieren und zu reduzieren, wurde bereits bei Ulm, et al., 2013 und Saffarzadeh, et al., 2012 gezeigt. Im Rahmen dieser Arbeit galt es zunächst herauszufinden, ob die Inhibition der zytotoxischen Eigenschaften von Histonen zunächst von der PolySia-Konzentration abhängt.

Hierzu wurden Zellkulturexperimente mit einer humanen Lungenepithelzelllinie (A549-Zellen) mit verschiedenen PolySia-Verdünnungen und fester Konzentration an Histonen (HistonMix aus den Histonen H1, H2A, H2B, H3 und H4) durchgeführt.

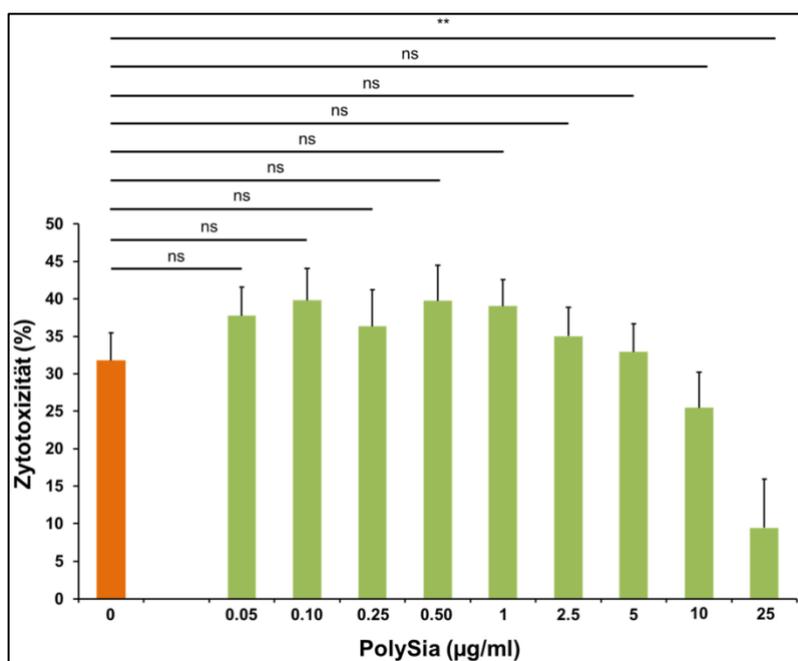


Abbildung 22: Inhibition der Histon-vermittelten Zytotoxizität ist konzentrationsabhängig. Dargestellt ist die Zytotoxizität in % nach Inkubation von A549 Zellen mit Histon und Polysialinsäure (PolySia); grüne Balken: Inkubation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an PolySia + jeweils Histon (75 µg/mL); oranger Balken: Inkubation der Zellen nur mit Histon (75 µg/mL); ns = nicht signifikant; **: signifikant, $p < 0,01$. Die Daten wurden in Galuska, et al., 2017 veröffentlicht).

Die Zellen wurden zunächst kultiviert, anschließend 30.000 Zellen/well ausgesät und mit 0 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL und 25 µg/mL PolySia sowie jeweils 75 µg/mL Histon versetzt. Es folgte eine Inkubation über 24 h unter optimalen Zellkulturbedingungen (37°C, 5%CO₂).

Nach einer photometrischen Messung mit dem *LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay Kit* // wurde die Zytotoxizität berechnet und in % angegeben. Da die Inkubation mit Histonen eine Zellschädigung an den hier verwendeten A549 Zellen auslöste, wurde dies als Referenz bzw. Ausgangswert verwendet. Die übrigen Versuchsansätze mit unterschiedlicher Konzentration an PolySia in Kombination mit Histonen wurden mit der Referenz verglichen (siehe **Abbildung 22**).

Eine Inkubation mit Histonen (oranger Balken) in einer Konzentration von 75 µg/mL ergab in diesem Versuchsaufbau eine Zytotoxizität von ca. 32% gegenüber unbehandelten Zellen. Das bedeutet: 32% der Zellen setzten LDH frei. Wenn die Zellen aber mit PolySia (in verschiedenen Konzentrationen) und Histonen inkubiert wurden (grüne Balken), sah man zunächst einen Anstieg der Zytotoxizität im Vergleich zu den nur mit Histon behandelten Zellen. Ab einer Konzentration von 10 µg/mL PolySia erkennt man einen leichten Rückgang der Zytotoxizität. Diese Reduktion ist erst ab einer Konzentration von 25 µg/mL an PolySia statistisch signifikant. Mit dieser Konzentration an PolySia erreicht man eine Minimierung der Zellschädigung von 32% auf ca. 9%.

4.2 DIE INAKTIVIERUNG DER HISTON-VERMITTELTEN ZYTOTOXIZITÄT HÄNGT VON DER KETTENLÄNGE DER POLYSIA AB

Der Einsatz von Neuraminidasen, welche für den enzymatischen Abbau der PolySia-Polymere bis hin zu Monomeren verantwortlich sind (Stummeyer, et al., 2005), führt auch zu einem Verlust der kompensatorischen Eigenschaften der PolySia (Ulm, et al., 2013). Es stellt sich folglich die Frage, ob und inwieweit die Kettenlänge der PolySia eine Rolle bei der Inaktivierung der Histon-vermittelten Zytotoxizität spielt.

Um diese Frage nachzugehen, wurde die PolySia in Form von Colominsäure mit dem Fluoreszenzfarbstoff DMB markiert und mit Hilfe eines Anionenaustauschchromatographen (HPLC) in verschiedene Kettenlängen aufgetrennt.

ERGEBNISSE

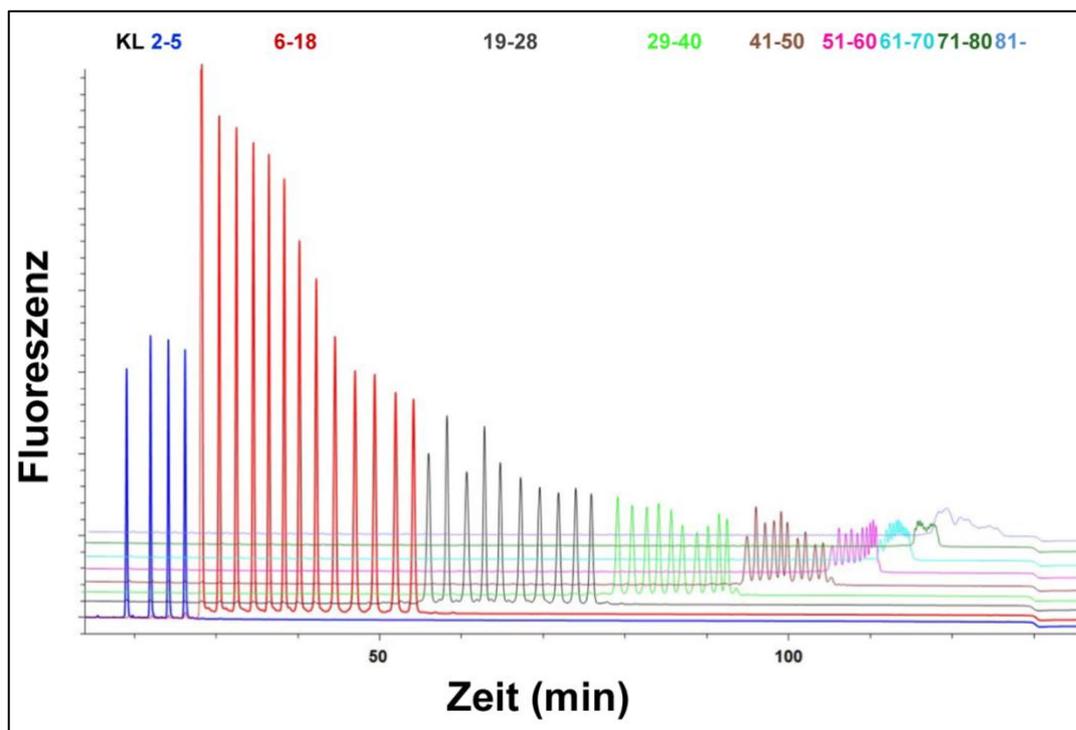


Abbildung 23: Auftrennung der Polysialinsäure in verschiedene Kettenlängen. DP = degree of polymerisation (=Kettenlänge); Bis ca. 20 min. wurden die PolySia-Moleküle mit 2-5 *N*-Acetylneuraminssäure-Einheiten, d.h. mit 2-5 Kettenlängen (blauer Teil der Kurve), gesammelt, anschließend wurde das Auffanggefäß gewechselt und es wurden die Kettenlängen 6-18 bis zur ca. 55. Minute gesammelt (roter Teil der Kurve), die Kettenlängen 19-28 (schwarzer Teil der Kurve) bis zur 78. Minute, die Kettenlängen 29-40 (hellgrüner Teil der Kurve) bis zur 92. Minute, die Kettenlängen 41-50 (brauner Teil der Kurve) bis zur 105. Minute, die Kettenlängen 51-60 (pinker Teil der Kurve) bis zur 110. Minute, die Kettenlängen 61-70 (türkiser Teil der Kurve) bis zur 115. Minute, die Kettenlängen 71-80 (dunkelgrüner Teil der Kurve) bis zur 118. Minute. Hellgrau dargestellt sind die PolySia-Moleküle ab einer Kettenlänge von 81. In den dargestellten Chromatogrammen wurden die fraktionierten Gruppen einzeln rechromatografiert (Veröffentlicht in Galuska, et al., 2017).

Es wurden verschieden lange PolySia Kettenlängen (KL) in Fraktionen nach den entsprechenden Retentionszeiten nach dem Durchlauf der HPLC-Säule in verschiedenen Auffanggefäßen gesammelt: KL 2-5, KL 6-18, KL 19-28, KL 29-40, KL 41-50, KL 51-60, KL 61-70, KL 71-80, KL > 80 und rechromatografiert (siehe **Abbildung 23**).

Anschließend wurde zu den gleichen Zeitintervallen die gleiche Konzentration an PolySia auf die Säule aufgetragen, diesmal unmarkiert (daher hier nicht gezeigt), und analog zu den Zeiten mit DMB-markierter PolySia gesammelt. Jeweils ein Aliquot der unmarkierten gesammelten Fraktionen wurde schließlich zur Kontrolle mit DMB markiert und die Kettenlänge bestimmt (siehe **Abbildung 24**). Es ist dabei zu berücksichtigen, dass es bei der DMB-Markierung unter den sauren Bedingungen zu internen Strangbrüchen kommt, sodass auch Degradationsprodukte der Hauptfraktion visualisiert werden.

ERGEBNISSE

Die übrigen Proben wurden zunächst quantifiziert und im Zellkulturversuch in einer Konzentration von 50 µg/mL in Kombination mit Histonen verwendet. Bei den übrigen Proben handelt es sich letztlich um die unmarkierten Fraktionen, die hauptsächlich Ketten in folgenden Kettenlängenbereichen enthalten: 2-7, 8-20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, >80. Es wurden native, sprich unmarkierte, PolySia-Ketten eingesetzt, da auch DMB einen Einfluss auf die Zytotoxizität und somit auf das Ergebnis der Versuche haben könnte. Die Inkubation der A549 Zellen erfolgte mit den verschiedenen langen PolySia-Kettenlängen-Fraktionen und Histonen analog zum vorangehenden Versuch. Die rein durch Histone bedingte Zytotoxizität wurde auch hier als Referenz verwendet. Die darauffolgende Zytotoxizitätsmessung erfolgte wie bereits beschrieben am Photometer.

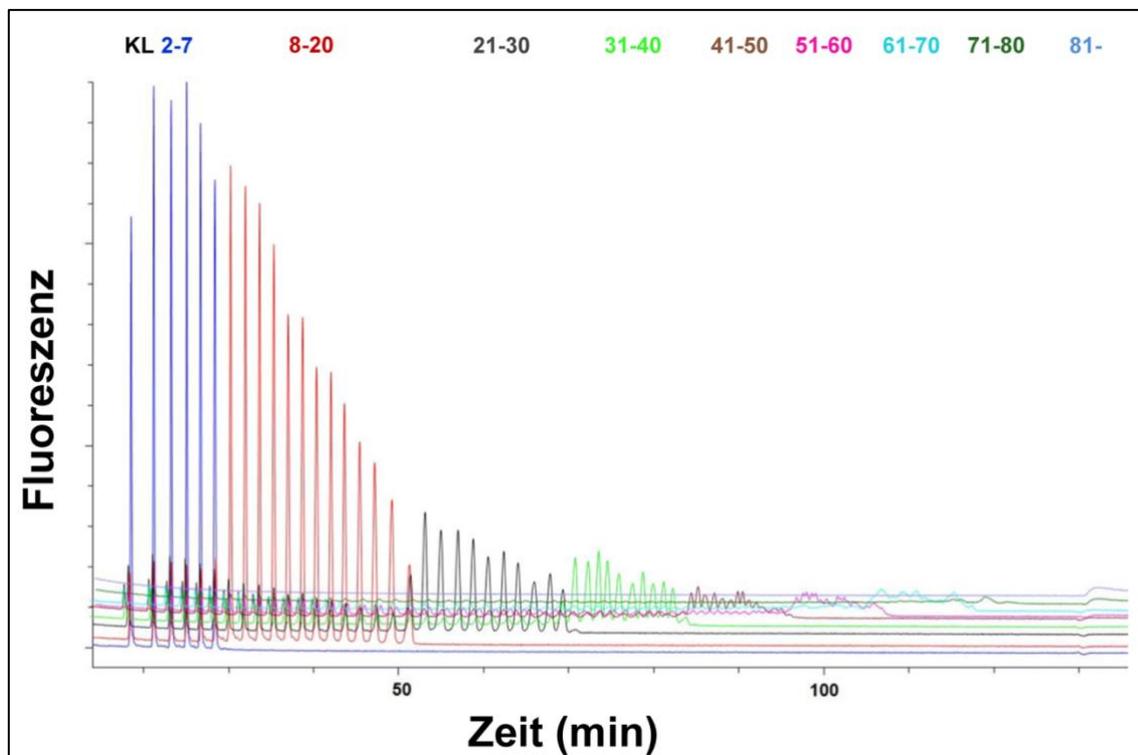


Abbildung 24: Rechromatographie von fraktionierten PolySia-Kettenlängen. DP = degree of polymerisation (= Kettenlänge) (Galuska, et al., 2017)

Die Inkubation der Zellen mit Histonen (75µg/mL) erreichte in diesem Versuch eine Zytotoxizität von ca. 34% (oranger Balken in **Abbildung 25**). **Abbildung 25** zeigt, dass ab einer Kettenlänge von ca. 21 Neu5Ac-Einheiten allmählich eine Reduktion der Histonevermittelten Zellschädigung eintritt. Eine statistisch signifikante Wirkung wird ab einer Kettenlänge von 31 erreicht. In dieser Fraktion (KL 31-40) sprechen wir noch von einer

ERGEBNISSE

ca. 10%igen Zytotoxizität im Vergleich. In den Fraktionen 41-50 und 51-60 ist eine weitere Abnahme der Zytotoxizität detektierbar.

Die Vermutung, dass die kompensatorische Eigenschaft der PolySia gegenüber der Zellschädigung durch extrazelluläre Histone nicht nur konzentrations- sondern auch kettenlängenabhängig ist, konnte mit diesem Versuch gezeigt werden.

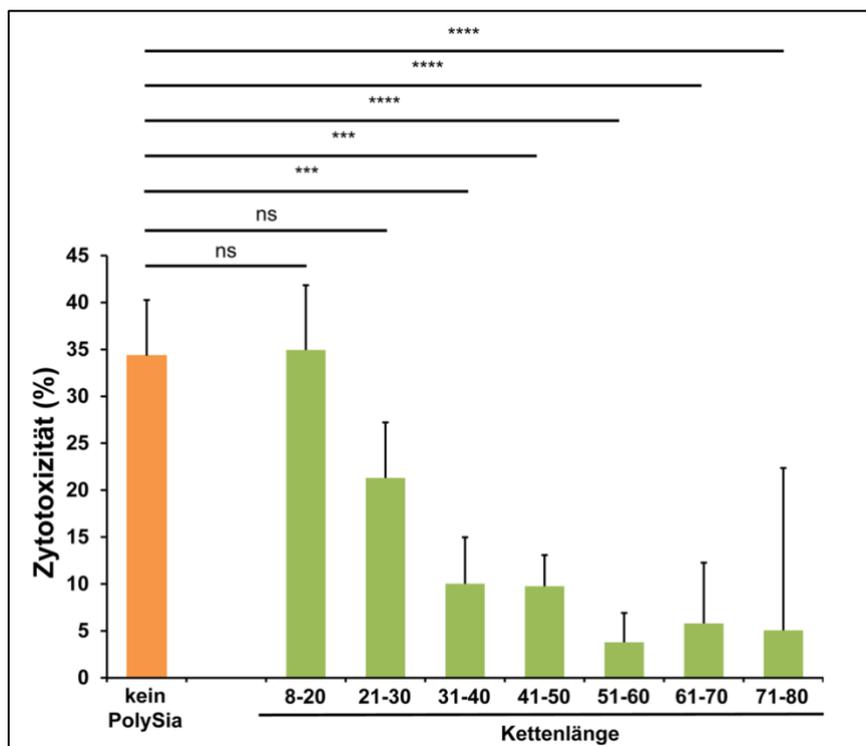


Abbildung 25: Inhibition der Histon-vermittelten Zytotoxizität ist von der Kettenlänge der PolySia abhängig. Grüne Balken: Inkubation der Zellen mit verschiedenen langen PolySia-Ketten + jeweils Histon (75 µg/mL); Oranger Balken: Inkubation der Zellen nur mit Histon (75 µg/mL); ns: nicht signifikant; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$. Die Daten wurden in Galuska, et al., 2017 veröffentlicht.

4.3 OXIDIERTER POLYSIA VERMAG EBENFALLS DIE HISTON-VERMITTELTE ZYTOTOXIZITÄT ZU REDUZIEREN

Es stellte sich zudem die Frage, ob die terminale Sialinsäure am nicht-reduzierenden Ende einer PolySia-Kette bei der Inaktivierung beteiligt ist. Die Oxidation des nicht-reduzierenden Endes der PolySia-Kette erfolgte mit Natriummetaperiodat (siehe **Kapitel 3.2.2**) Hierdurch wurde der terminale Rest der PolySia-Kette am nicht-reduzierenden Ende von einem C9- in einen C7-Körper mit einer Aldehydgruppe umgewandelt (siehe **Abbildung 26**).

ERGEBNISSE

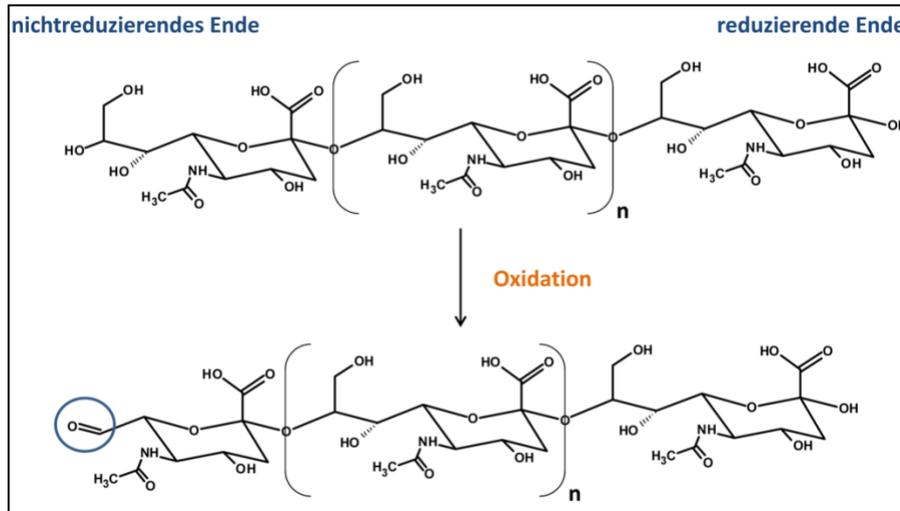


Abbildung 26: Struktur der oxidierten PolySia. Blauer Kreis = Aldehydgruppe. (Abbildung aus Galuska, et al., 2017, CC BY).

Die von mir durch Oxidation modifizierte PolySia wurde im Hinblick auf dessen Vermögen die Histon-vermittelte Zytotoxizität zu reduzieren im Vergleich zu nativer unveränderter PolySia innerhalb der Arbeitsgruppe im Zellkulturversuch getestet (siehe **Abbildung 27**).

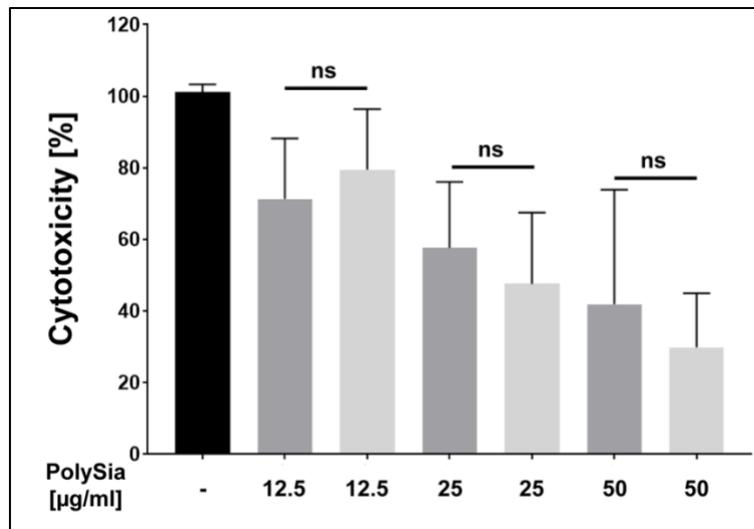


Abbildung 27: Reduktion der Zytotoxizität durch oxidierte PolySia vs. native PolySia. Die Wirkung von unterschiedlichen Konzentrationen an oxidierte (hellgrauer Balken) und nativer PolySia (dunkelgrauer Balken) gegenüber den zytotoxischen Eigenschaften von Histonen (60 µg/mL) wurde mittels LDH-Test analysiert. ns = nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die Zellkulturversuche wurden von C. E. Galuska durchgeführt (Abbildung aus Galuska C.E., et al., 2017, CC-BY).

Es wurden verschiedene Konzentrationen (0 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL und 50 µg/mL) an nativer und oxidierte PolySia für die Zellversuche mit jeweils 60 µg/mL Histon

ERGEBNISSE

eingesetzt. Die Inkubation mit Histonen wurde auch hier als Referenz verwendet und die Zytotoxizität gleich 100% gesetzt (schwarzer Balken in **Abbildung 27**).

Aus **Abbildung 27** geht demnach hervor, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen oxidiertem (hellgrauer Balken) und nativem PolySia (dunkelgrauer Balken) in Bezug auf dessen Kompensationsmöglichkeiten gibt. Außerdem sinkt die Zytotoxizität bei Zugabe höherer Konzentrationen an PolySia (oxidiert und nativ). Somit kann auch die oxidierte Form von Neu5Ac-Polymeren verwendet werden.

5 DISKUSSION

5.1 POLYSIA ALS GEGENSPIELER DER HISTON- BZW. NET-INDUZIERTEN ZYTOTOXIZITÄT

Seit der Entdeckung der *neutrophil extracellular traps* (NET) 2004 durch die Arbeitsgruppe von Brinkmann und Zychlinsky sind mittlerweile viele Eigenschaften dieser netzartigen Strukturen genauer erforscht und kontrovers diskutiert worden. Die ETose, so wird der Vorgang genannt, wenn Granulozyten ihren Zellinhalt nach extrazellulär befördern, wird neben den neutrophilen auch von den eosinophilen sowie den basophilen Granulozyten betrieben (Yousefi, et al., 2008; Morshed, et al., 2014; Schorn, et al., 2012).

Treffend werden diese extrazellulären Komponenten als „zweischneidiges Schwert“ bezeichnet (Kaplan & Radic, 2012). Zum einen sind sie als Teil des angeborenen Immunsystems einer der ersten Verteidiger gegen Mikroorganismen. Zum anderen wirken sie zell- bzw. gewebeschädigend (siehe **Abbildung 28**).

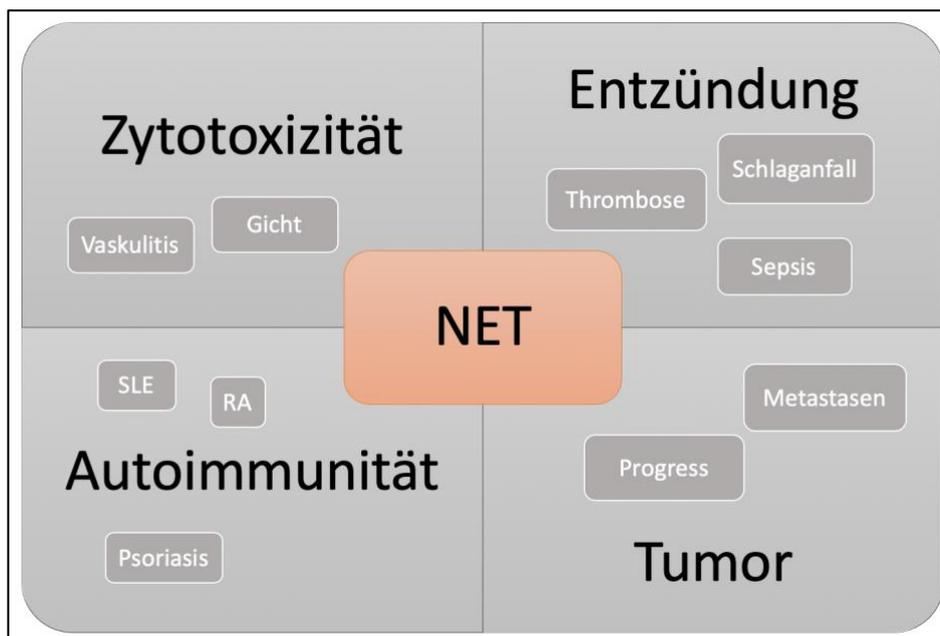


Abbildung 28: Durch NET ausgelöste Pathologien. Erläuterung siehe Text.

Grundsätzlich kommt es zunächst durch die Freisetzung von NET, wenn kein Gleichgewicht von NET-Produktion und NET-Abbau herrscht, zu einem Zell- und Gewebeschaden. Bedingt ist dies durch die Zusammensetzung des Netzwerks: DNA, Histone, antimikrobielle Peptide. Diese Bestandteile sind alleine bereits zellschädigend (Saffarzadeh & Preissner, 2013). Auf eine weiter fortschreitende Zellschädigung folgt

wiederum die Chronifizierung. Daher ist es nicht verwunderlich, dass *extracellular traps* bei unzähligen chronischen Erkrankungen vertreten sind. Zu nennen sind die zytische Fibrose (Marcos, et al., 2010), chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (= CED, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) (Gottlieb, et al., 2018), Asthma bronchiale (Dworski, Simon, Hoskins, & Yousefi, 2011), Atherosklerose (Megens, et al., 2012) und auch Thrombosen (Fuchs, et al., 2010; Brill, et al., 2012; Martinod & Wagner, 2014). Eine besondere Rolle scheinen die *extracellular traps* bei Autoimmunerkrankungen wie beim Systemischen Lupus Erythematosus (SLE) (Villanueva, et al., 2011), der Rheumatoiden Arthritis (RA) (Khandpur, et al., 2013) und Psoriasis (Lin, et al., 2011) zu spielen. Neben den autoimmunen sind auch die autoinflammatorischen Erkrankungen wie Vaskulitiden (Kessenbrock, et al., 2009) und Gicht (Mitroulis, et al., 2011) zu nennen. *Extracellular traps* werden aber nicht nur bei chronischen Pathologien sondern auch bei akuten Krankheitsgeschehen gefunden, hier sind der ischämische Schlaganfall (Laridan, et al., 2017) und Sepsis (Clark, et al., 2007) anzuführen. Zum Schluss seien noch Tumor, Tumorprogress und Metastasen erwähnt (Papayannopoulos, 2018; Erpenbeck & Schön, 2017; Berger-Achituv, et al., 2013; Park, et al., 2016; Cools-Lartigue, et al., 2013). Das Feld der Erkrankungen, an denen *extracellular trap* involviert sind, ist manigfaltig. NETs sind daher Ziel bei der Therapeutikaentwicklung, um die zellschädigenden Komponenten zu neutralisieren bzw. zu bekämpfen.

Saffarzadeh et al. haben in Zellkulturversuchen mit Endothelzellen und Lungenalveolarepithelzellen die Komponenten der NET auf ihre Zytotoxizität hin untersucht und festgestellt, dass vor allem Histone für diese Zellschäden verantwortlich sind. Zusammen mit unserer Arbeitsgruppe konnte zudem gezeigt werden, dass PolySia die von Histonen sowie von den NET verursachte Zytotoxizität herabsetzt. Innerhalb meiner Arbeit konnte nun dargestellt werden, dass es zu einer konzentrationsabhängigen Reduzierung kommt. Um zu untersuchen, ob PolySia einen bestimmten Polymersierungsgrad für die Inaktivierung von Histonen benötigt, wurden mittels Anionenaustauscherchromatographie Gruppen von unterschiedlichen Kettenlängen präparativ aufgereinigt. Die anschließenden Versuche zeigten, dass man bzgl. der Zytotoxizität der extrazellulären Histone, welche wir als Äquivalent für die zytotoxischen Eigenschaften von NET verwendeten, eine Kettenlänge von mindestens 30 Neu5Ac-Einheiten braucht um eine statistisch signifikante kompensierende Wirkung zu erreichen. Es wurde jedoch auch bereits mit Kettenlängen zwischen 21 und 29 Sialinsäuren eine Reduktion beobachtet. Um zu untersuchen, inwieweit die terminale Sialinsäure am nicht-reduzierenden Ende involviert ist, wurde sie oxidiert, sodass sie nur

noch aus einem C7-Grundgerüst besteht. Interessanterweise zeigten auch die chemisch modifizierten Ketten vergleichbare Effekte.

Es ist bekannt, dass freie PolySia durch Sialidasen vom nicht-reduzierenden Ende aus abgebaut wird. Um PolySia vor einem Abbau durch Sialidasen zu bewahren, bedarf es einer Maskierung am nicht-reduzierenden Ende. Da kein signifikanter Unterschied zwischen oxidiertem und nativem PolySia zu erkennen ist, lässt sich vermuten, dass das nicht-reduzierende Ende nicht in die Bindung und Inaktivierung von Histonen involviert ist. Dies ermöglicht, dass oxidierte PolySia weiter modifiziert werden kann, um sie vor Exosialidasen, die sowohl von pathogenen Keimen als auch körpereigenen Zellen gebildet werden können, zu schützen. Diese Enzyme benötigen nämlich ein freies nicht-reduzierendes Ende für die sequentielle Degradierung einer linearen PolySia-Kette. Die resultierende Aldehydgruppe am nicht-reduzierenden Ende ermöglicht z.B. eine chemische Kopplung an Nanopartikel oder anderen Makromoleküle, um PolySia vor Degradierung zu schützen und um die gekoppelten Komponenten an NET zu akkumulieren. PolySia in Entzündungsherden mit hoher Konzentration an NET einzusetzen ist bereits in Diskussion (Simon, et al., 2013; Ulm, et al., 2013).

Da die Ergebnisse mit der von mir chemisch oxidierten Form von PolySia darauf schließen lassen, dass wohl für die Inaktivierung und somit Bindung von Histonen die Enden der Zuckerketten nicht beteiligt sind, wurden *Molecular dynamics* (MD) Simulationen durchgeführt. Mit Hilfe dieser und einer ‚docking study‘ wurde dieser Frage annäherungsweise, in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Thomas Lütke, nachgegangen. Es konnten weitere Bindungseigenschaften zwischen PolySia und Histonen auf molekularer Ebene aufgezeigt werden. Bei diesem Versuch wurden vier PolySia-Moleküle mit mind. 20 Neu5Ac-Einheiten verwendet, da diese Kettenlänge für eine erste Reduzierung der Histon-vermittelten Zytotoxizität notwendig war. Als Rezeptor wurde ein Histon-DNA-Komplex verwendet. Die DNA-Struktur wurde vor Hinzugabe der PolySia-Moleküle entfernt. Nach dem Hinzufügen der PolySia-Moleküle in eine Wasser-Box konnte festgestellt werden, dass nach 6 ns alle vier Moleküle an die benachbarten Orte an den Histon-Komplex wanderten, welche an DNA binden (siehe **Abbildung 29**).

Die beiden Enden (reduzierend und nicht-reduzierend) der PolySia-Kette scheinen nicht an der Bindung beteiligt zu sein. Sie stehen damit zur Verfügung um weitere Modifizierungen wie z.B. Kopplung an Nano-Partikel durchführen zu können, so dass diese Kopplung als möglicher Träger von Therapeutika fungieren kann.

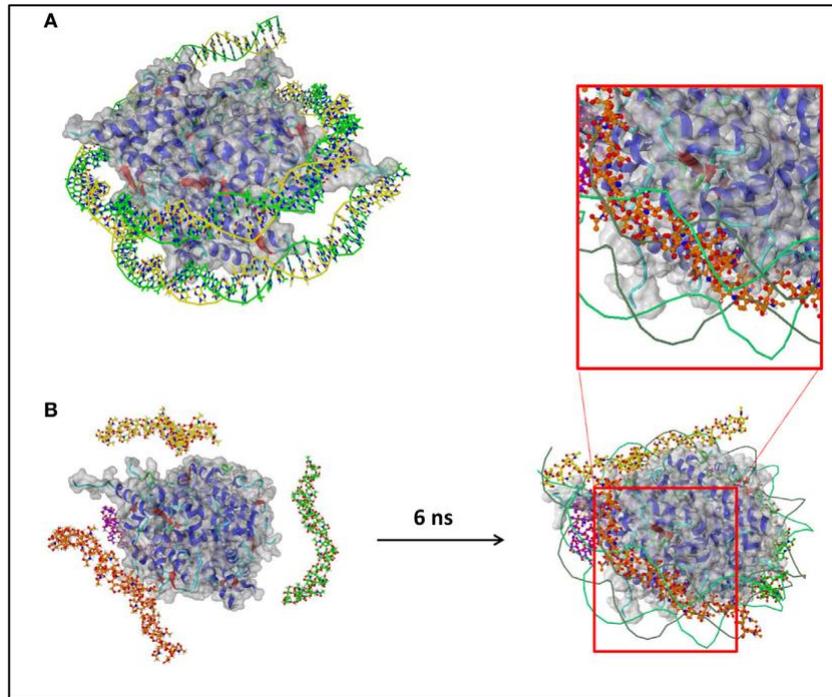


Abbildung 29: MD-Simulation (Molecular Dynamics) von PolySia Ketten und Histon. Der DNA/Histon-Komplex ist in A dargestellt. B) Ein Histon-Oktamer interagiert mit vier PolySia-Ketten, die eine Kettenlänge von 20 besitzen. Abbildung aus Galuska, et al., 2017 CC BY.

5.2 KOPPLUNG VON POLYSIA AN NANO-PARTIKEL

Die innerhalb meiner Arbeit erzielten Resultate sind als Grundstein essentiell für weiterführende Experimente bezüglich der Bindungseigenschaften von Histonen mit PolySia zu sehen. Basierend auf meinen Ergebnissen konnte bereits gezeigt werden, dass man trotz einer Kopplung von PolySia an bestimmte Trägersubstanzen (z.B. Nano-Beads) die kompensatorischen Eigenschaften von PolySia gegenüber Histonen behalten werden (Galuska, et al., 2017).

Hierzu wurden in unserer Arbeitsgruppe Versuche durchgeführt, in denen das zuvor oxidierte nicht-reduzierende Ende der PolySia-Kette an Nano-Partikel gekoppelt wurde (Galuska, et al., 2017). Diese modifizierten PolySia-Moleküle wurden schließlich ebenfalls in Zellkulturversuchen eingesetzt. Es konnte auch hier präsentiert werden, dass die PolySia-Nano-Partikel die Zytotoxizität durch Histone mindern.

Durch die positive Eigenschaft der PolySia an Histone zu binden und die durch diese und NET-vermittelte Zytotoxizität zu reduzieren sowie die Möglichkeit PolySia in gewünschter Konzentration und Kettenlänge an Nano-Partikel als Träger zu koppeln, eröffnet sich die Chance an diese Trägersubstanz ggf. noch weitere Therapeutika zu

knüpfen (siehe **Abbildung 30**). Diese könnten dann lokal ins Gewebe z.B. mit erhöhter NET-Bildung injiziert werden (Galuska, et al., 2017).

Neben PolySia als Therapeutikum sind auch die Histonproteine von immer größer werdender Bedeutung. Wie bereits erwähnt haben Histone nicht nur negative Eigenschaften, sie werden heute auch als zukünftige vielversprechende „Antibiotika“ diskutiert (Lavery, Gorman, & Gilmore, 2011; Hancock & Patrzykat, 2002). In unserer Arbeitsgruppe wurde der Frage nachgegangen, inwieweit PolySia die bakterizide Wirkung von Histonen neben der zytotoxischen beeinflusst. Basierend auf den Versuchen meiner Arbeit bzgl. der Bindung zwischen unterschiedlich langen PolySia-Ketten und den Histonen wurde in weiteren Experimenten zunächst die Bindung zwischen PolySia und den einzelnen Histonen (H1, H2A, H2B, H3 und H4) näher charakterisiert. Es wurden große Unterschiede in der kettenlängenabhängigen Bindung zwischen den Histonen und PolySia gefunden (Zlatina, Lütteke, & Galuska, 2017).

Weiterführende Versuche zeigten wiederum auch, dass PolySia die zytotoxischen Eigenschaften von Lysin-reichen Histonen (Histon H1, H2A und H2B) auf eukaryotische Zellen zwar hemmt, aber die antimikrobiellen Eigenschaften nicht inaktiviert werden (Zlatina & Galuska, 2019). Diese Erkenntnisse können letztlich ebenfalls als eine Möglichkeit betrachtet werden, Histone als z.B. Antibiotika an PolySia-Ketten zu binden und sie lokal in entzündetes Gewebe zu applizieren. PolySia schützt das eukaryotische Gewebe vor der histonbedingten Zytotoxizität und die Histone können ihre bakterizide Wirkung direkt vor Ort entfalten (Zlatina & Galuska, 2019).

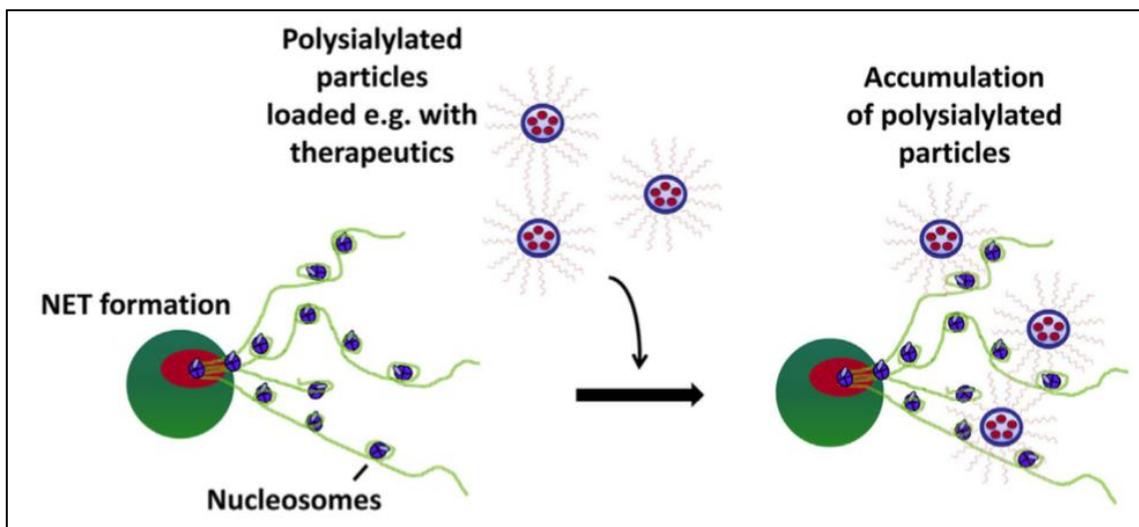


Abbildung 30: Polysialylierte Nano-Partikel binden an Nucleosomen aus *neutrophil extracellular traps* (NETs). (Galuska, et al., 2017)

5.3 KLINISCHE BEDEUTUNG VON POLYSIA

Das Bestreben dieser Arbeit war es die Eigenschaft von PolySia eine Histon-vermittelte Zytotoxizität zu mildern genauer zu charakterisieren. Mit unseren Versuchen haben wir bewiesen, dass sowohl die Kettenlänge als auch die Konzentration von PolySia für die Bindung an extrazelluläre Histone von großer Bedeutung sind. Durch unsere Experimente konnten wir auch zeigen, dass mögliche Modifikationen (Oxidation des nicht-reduzierenden Endes) der PolySia die positiven Eigenschaften bzgl. Kompensation von Zytotoxizität nicht beeinflussen. Beide Enden der PolySia-Kette stehen zur Bindung bzw. Modifizierung bereit und werden nicht für die Bindung der Histone benötigt. Dies impliziert die Möglichkeit das nicht-reduzierende Ende der PolySia für eine Oxidation und anschließender weiterer Modifizierung als Schutz vor Sialidasen zu verwenden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit eine Trägersubstanz (z.B. Nano-Partikel) an die entstandene Aldehydgruppe zu koppeln. Die PolySia könnte so als vor Sialidasen geschütztes Therapeutikum appliziert werden.

Eine lokale Applikation in entzündeten Bereichen, wo man eine hohe Konzentration von NET oder extrazellulären Histonen vorfindet, könnte von Vorteil sein. Die mit PolySia gekoppelte Trägersubstanz könnte durch ihre hohe negative Ladung an Histone binden und die Zellschädigung lokal minimieren.

5.3.1 Möglichkeiten für den Einsatz von PolySia als direktes Therapeutikum – Beispiele: Zystische Fibrose und Schlaganfall

Zystische Fibrose (= Mukoviszidose)

Bei der autosomal rezessiv vererbten zystischen Fibrose kommt es durch einen genetischen Defekt an einem Chloridkanal unter anderem zu einem zähen Sputum. Dieser verhindert den respiratorischen Selbstreinigungsmechanismus (mukoziliäre Clearance) der Patienten, so dass es für Mikroorganismen einfacher ist sich im Respirationstrakt anzusiedeln und zu einer chronischen Entzündung zu führen (McIntosh & Cutting, 1992). Das zähe Sputum besteht hauptsächlich aus dekondensierten DNA-Filamenten als Produkt der fortschreitenden Entzündung mit Zellzerfall und auch einer übermäßigen NETose (Marcos, et al., 2010). Neben DNA kommen auch antimikrobielle Peptide und F-Aktin-Filamente vor (Rubin, 2007). Diese F-Aktine sind Strukturproteine und Komponenten des Zytoskeletts einer jeden Zelle. Sowohl Aktin-Filamente als auch DNA sind polyanionische Moleküle, die durch ihre hohe negative Ladung kationische Moleküle binden, z.B. antimikrobielle Peptide und Histone.

Die so entstandenen Bündel tragen zum größten Teil der Zähigkeit des Sputums bei Mukoviszidose-Patienten bei.

Therapeutisch bedient man sich bei der Zystischen Fibrose unter anderem eines inhalativen Mittels, welches DNase enthält. Dadurch wird der Schleim verdünnt und der Patient kann viel leichter abhusten, da die mukoziliäre Clearance wieder verbessert wird (Vetter, 1994).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Konjugation von PolySia an DNase, einen positiven Effekt im Hinblick auf eine längere Stabilität der DNase gegenüber Proteasen und thermalem Stress zeigt (Meng, et al., 2018).

Zudem ist durch eine andere Arbeitsgruppe nachgewiesen worden, dass Moleküle mit polyanionischem Charakter, wie z.B. Polyasparaginsäure, als Zusatz zur DNase-Behandlung, zu einer besseren DNase-Funktion führen. Zurückzuführen ist dies darauf, dass die Polyasparaginsäure mit ihrem polyanionischen Charakter mit der Bindung der ebenfalls negativ geladenen DNA an die oben genannten Bündel konkurriert. So sei es einfacher die DNA-Filamente aus dem Bündel zu lösen und zugänglicher für die DNase zu machen, so dass die DNA besser abgebaut werden kann (Bucki, et al., 2015).

Da PolySia ebenfalls polyanionischen Charakter aufweist, lässt sich hieraus eine mögliche Fragestellung für zukünftige Versuche ableiten: Hat die lokale Verwendung von PolySia als Zusatz in Kombination mit DNase als Inhalativum, nicht auch einen positiven Effekt auf den zähen Schleim und vor allem die chronische Entzündung?

Schlaganfall

Ein weiteres Beispiel, in welcher NETs Gegenstand der Forschung sind, sind Thromben bei Schlaganfallpatienten. Durch die mechanische Rekanalisation eines akuten Gefäßverschlusses bei Schlaganfallpatienten ist es mittlerweile möglich die Zusammensetzung der Thromben bei ischämischen Hirninfarktpatienten zu untersuchen. Laridan et al. haben in ihrer Publikation aus 2017 gezeigt, dass in den untersuchten Thromben durchweg Neutrophile zu finden waren. Zudem wiesen sie in fast allen diesen Thromben das citrullinierte Histon 3 nach. Durch eine Kollokalisierung von extrazellulärer Neutrophilen-DNA und Histonen folgerten sie die Anwesenheit von NETs. Aufgefallen ist ergänzend, dass ältere Thromben im Vergleich zu frischeren eine höhere Konzentration an Neutrophilen und Histonen aufwiesen (Laridan, et al., 2017). Bislang gibt es zwei verbreitete Therapieformen für einen akuten ischämischen Schlaganfall:

- a. Die systemisch applizierte Lyse-Therapie mit Alteplase (rekombinanter gewebespezifischer Plasminogenaktivator, *recombinant tissue-type plasminogen activator* (rt-PA)).

DISKUSSION

b. Die interventionelle mechanische Thrombektomie als Rekanalisationstherapie. Die systemische Lyse-Therapie ist nur innerhalb von 4,5 Stunden möglich, die mechanische Thrombektomie in Ausnahmefällen auch über 6 Stunden.

Der Slogan „Time is brain“ spielt bei der Schlaganfallversorgung eine herausragende Rolle, denn innerhalb kurzer Zeit kommt es zum irreversiblen Nervenzelluntergang mit konsekutiven schweren Behinderungen. Dabei spielt das Ausmaß der Nervenzellschädigung im Gehirn eine große Rolle.

Um also die Ausdehnung der Zellschädigung zu minimieren muss schnell gehandelt werden. Es gilt die sog. Penumbra, das Risikogewebe, zu retten (siehe **Abbildung 31**). Das ist der Bereich bei einem ischämischen Schlaganfall, der direkt dem bereits abgestorbenen Gebiet, dem Infarktkern, anliegt aber noch lebende Zellen enthält. Hier reduziert sich der Blutfluss so weit, dass die Zellen noch nicht vollständig geschädigt sind, jedoch bereits gefährdet und durch den relativen Sauerstoffmangel funktionsgestört (Ringleb, Veltkamo, & Hacke, 2016).

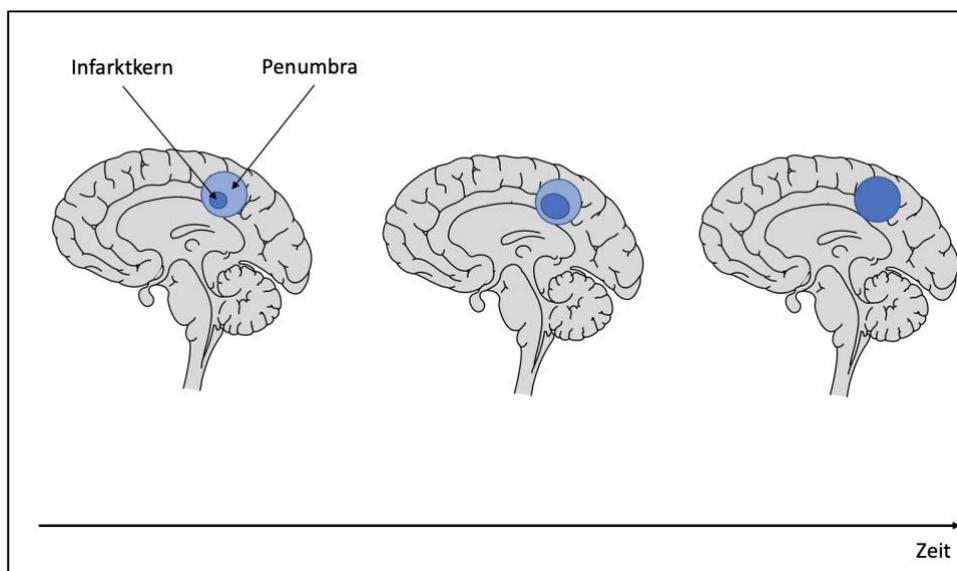


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Penumbra eines ischämischen Hirninfarktes. Die Penumbra (hellblau) ist das Risikogewebe und liegt dem Infarktkern (dunkelblau) direkt an. Es enthält lebende Nervenzellen, die man noch retten kann. Wenn es nicht zu einer Rettung kommt, stirbt auch dieses Gewebe ab und das Ausmaß der Nervenzellschädigung und die daraus resultierenden Behinderungen sind größer. Grafik mit Hilfe von ©Motifolio erstellt.

Die Penumbra kann im Verlauf weiter zu Grunde gehen oder aber gerettet werden. Durch das bei einem Hirninfarkt bereits abgestorbene Gewebe werden extrazelluläre Histone frei, welche wiederum zusätzlich zum Sauerstoffmangel toxisch auf die Nachbarzellen wirken. So kann sich das Infarktareal vergrößern. Hier könnte der Einsatz von PolySia denkbar sein. Es könnte die extrazellulären Histone, die bereits frei geworden sind, neutralisieren und die Ausbreitung des Infarktgebietes minimieren. De

DISKUSSION

Meyer, et al. haben bereits 2012 beschrieben, dass zumindest Histon-neutralisierende Antikörper die Infarktgröße reduzieren. Der Vorteil von PolySia gegenüber den Antikörpern ist z.B. ihre minimale Immunogenität (Azurmendi, et al., 2007) und durch Kopplung an z.B. Nano-Partikel Stabilität gegenüber einem Abbau durch Sialidasen (Galuska, et al., 2017). Die mögliche neuroprotektive Eigenschaft von PolySia scheint ein interessanter Gegenstand zukünftiger Untersuchungen zu sein.

5.4 AUSBLICK

Neben den oben aufgeführten Beispielen als möglichen Einsatz von PolySia als Therapeutikum, gibt es noch weitere denkbare Fragestellungen, die aus den Ergebnissen dieser Arbeit resultieren können.

- (1) Saffarzadeh, et al. haben 2012 bereits darauf hingewiesen, dass die positiven Eigenschaften von NETs nicht gänzlich gehemmt werden sollten, dies führe zu schweren Infektionen, Karzinogenese und anderen Effekten auf zelluläre Prozesse. Daher gilt es ein Gleichgewicht zwischen der Hemmung der Zytotoxizität und der positiven Eigenschaften zu finden. Neben Histonen sind auch weitere positiv geladene Proteine in NETs vorhanden (Saffarzadeh & Preissner, 2013). Hier könnte die Bindung der PolySia an diese Proteine genauer charakterisiert werden: Welche Proteine binden PolySia? Gibt es positive Effekte auf die Zytotoxizität durch PolySia? Besteht auch hier eine Kettenlängen- und Konzentrationsabhängigkeit?
- (2) Abgesehen von den neutrophilen Granulozyten sind auch weitere Zellen zur *extracellular traps*-Bildung fähig. Im Hinblick auf z.B. allergische Erkrankungen, könnten eosinophile Granulozyten sowie auch Mastzellen in Kombination mit PolySia untersucht und die Bindungseigenschaften gegenüber von diesen Zellen gebildeten *extracellular traps* genauer beschrieben werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Als meist endständige Komponente von Glykokonjugaten haben Sialinsäuren und deren Polymere, die Polysialinsäuren (PolySia), zahlreiche besondere Funktionen wie z.B. bei der Modulation von Interaktionen zwischen Zellen untereinander. PolySia übernimmt verschiedene Rollen in der Kommunikation auf zellulärer oder molekularer Ebene. Dadurch hat sie eine regulative Rolle bei der Zellproliferation und -differenzierung, sowie Migration und Adhäsion von Zellen. Interessanterweise können PolySia-Ketten Histone binden. Histone kommen u.a. an DNA gebunden als Nukleosomen vor und sind Komponenten von *Neutrophil extracellular traps* (NETs), einem Netzwerk aus extrazellulären Fasern bestehend aus DNA, Histonen und dem Inhalt der Granula aus neutrophilen Granulozyten. Histone sind nicht nur für die kompakte Verpackung der DNA und die damit verbundene Regulation der um die DNA passierenden Prozesse (Replikation, Transkription, Reparatur) verantwortlich, sondern sie sind auch eine Art antimikrobielles Peptid. Der Nachteil der letztgenannten Funktion ist seine Zytotoxizität gegen den Organismus selbst.

Die Entdeckung der Eigenschaft von PolySia, eine durch Histone hervorgerufene Zytotoxizität *in vitro* zu kompensieren, ist kürzlich geglückt. Diese Funktion galt es in meiner Arbeit weiter zu charakterisieren. Dabei konnte dargestellt werden, dass PolySia konzentrationsabhängig Zellschädigungen durch Histone inhibiert. Ebenso zeigten die Versuche, dass es einer Mindestkettenlänge von PolySia bedarf, damit es zur Inaktivierung der Histone kommt. Für diese Versuche wurden unterschiedliche Polymerisierungsgrade mittels Anionenaustauscherchromatographie präparativ aufgereinigt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das nicht-reduzierende Ende der PolySia-Kette nicht für die Inhibition nötig ist. Hierfür wurden innerhalb meiner Arbeit PolySia-Ketten chemisch oxidiert, was unter anderem zur Bildung einer Aldehydgruppe am nicht-reduzierenden Ende führte. Diese chemische Modifizierung ermöglicht zudem die Kopplung von PolySia-Ketten an andere Makromoleküle oder Nanopartikel, um diese z.B. an NET anzureichern. Zudem kann so auch eine Maskierung des nicht-reduzierenden Endes erfolgen, um als ein Schutz gegen den enzymatischen Abbau von PolySia durch Exosialidasen zu fungieren, die sowohl von pathogenen Keimen als auch von körpereigenen Zellen freigesetzt werden können.

Aus diesen Erkenntnissen können nun weitere Studien bezüglich des Einsatzes von PolySia als mögliches Therapeutikum in Erkrankungen mit erhöhter Histon-Konzentration folgen.

7 SUMMARY

Since sialic acids are frequently present at the terminal ends of glycoconjugates, these sugars and their polymers, polysialic acids (PolySia), are involved in numerous processes like the modulation of the interaction between cells. PolySia plays different roles at cellular or molecular levels. Thus, polySia has a regulatory function during cell proliferation, cell differentiation and also migration and adhesion. Interestingly, polySia chains can bind histones. Histones can form complexes with DNA, called nucleosomes, and are part of neutrophil extracellular traps (NETs), a network consisting of extracellular DNA fibers, histones and the content of the granules of neutrophil granulocytes. Histones are not only important for the packaging of the DNA and to this related regulation of the processes around the DNA (replication, transcription and reparation), but they are also a kind of antimicrobial peptide. However, the disadvantage of extracellular histones is the cytotoxicity against the organism itself.

Recently it was described that polySia compensates the histone mediated cytotoxicity. This ability of polySia was characterized in more detail during my thesis demonstrating that polySia reduces the histone mediated cytotoxicity in a concentration dependent manner. In addition, polySia counteracts the negative outcomes of extracellular histones in a chain length dependent manner. In order to characterize the impact of the degree of polymerization, groups with different chain lengths were purified by preparative anion-exchange chromatography. Furthermore, the experiments demonstrated that the non-reducing end of the polySia is not involved in the inactivation of histones. For these experiments, polySia chains were chemically oxidized leading among other changes to the formation of an aldehyde at the non-reducing end. This chemical modification allows the linkage of polySia to other macromolecules or nanoparticles to enrich the resulting conjugates on NET-filaments. Moreover, the masking of the non-reducing end protects against the enzymatically degradation of polySia chains by exosialidases, which can be released by body own cells as well as pathogens.

Based on these findings novel studies can be developed to design novel polySia based tools as potential therapeutics against diseases, which come along with high concentration of extracellular histones.

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| ABBILDUNG 1: NEURAMINSÄURE MIT C9-GRUNDGERÜST | 1 |
| ABBILDUNG 2: DIE HÄUFIGSTEN IN WIRBELTIEREN VORKOMMENDEN SIALINSÄUREN. | 2 |
| ABBILDUNG 3: MODIFIKATIONEN DURCH ZUSÄTZLICHE SUBSTITUTION DER HYDROXYLGRUPPEN. | 3 |
| ABBILDUNG 4: CHEMISCHE STRUKTUR DER POLYSIALINSÄURE (POLYSIA)..... | 4 |
| ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER BIOSYNTHESE VON POLYSIA. | 6 |
| ABBILDUNG 6: AUSSCHNITT AUS EINER SPERMIENMEMBRAN. | 8 |
| ABBILDUNG 7: ANTIADHÄSIVER EFFEKT VON POLYSIALINSÄURE AUF DEN ZELL-ZELL-KONTAKT. | 11 |
| ABBILDUNG 8: ADHÄSIVER EFFEKT VON POLYSIALINSÄURE (POLYSIA). | 12 |
| ABBILDUNG 9: BEEINFLUSSUNG DES IONENTRANSPORTS DURCH POLYSIALINSÄURE (POLYSIA) AM BEISPIEL DES CALCIUM-IONENKANALS A-AMINO-3-HYDROXY-5-METHYL-4-ISOAZOLEPROPIONACID (AMPA). | 13 |
| ABBILDUNG 10: POLYSIALYLIERTES <i>NEURAL CELL ADHESION MOLECULE</i> (NCAM) MIT UNTERSCHIEDLICH LANGEN KETTENLÄNGEN IM 3D-MODELL. | 13 |
| ABBILDUNG 11: POLYSIA-TRÄGERPROTEINE BEI SÄUGETIEREN. | 14 |
| ABBILDUNG 12: <i>NEURAL CELL ADHESION MOLECULE</i> (NCAM)..... | 17 |
| ABBILDUNG 13: HISTONE. | 19 |
| ABBILDUNG 14: FREISETZUNG UND EIGENSCHAFTEN VON EXTRAZELLULÄREN HISTONEN. | 21 |
| ABBILDUNG 15: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER BILDUNG VON <i>NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS</i> (NETs) MIT DEM ZELLYSEMECHANISMUS. | 22 |
| ABBILDUNG 16: HPLC-ANLAGE (SCHEMATISCH). | 29 |
| ABBILDUNG 17: DMB-MARKIERUNG VON SIALINSÄUREN. | 31 |
| ABBILDUNG 18: HPLC-CHROMATOGRAMM EINES DMB-MARKIERTEN COLOMINSÄURE-STANDARDS. ... | 33 |
| ABBILDUNG 19: QUANTIFIZIERUNG VON POLYSIA. | 34 |
| ABBILDUNG 20: NEUBAUER-ZÄHLKAMMER. | 39 |
| ABBILDUNG 21: PRINZIP DES LDH-ASSAYS..... | 41 |
| ABBILDUNG 22: INHIBITION DER HISTON-VERMITTELTEN ZYTOTOXIZITÄT IST KONZENTRATIONSABHÄNGIG..... | 43 |
| ABBILDUNG 23: AUFTRENNUNG DER POLYSIALINSÄURE IN VERSCHIEDENE KETTENLÄNGEN. | 45 |
| ABBILDUNG 24: RECHROMATOGRAPHIE VON FRAKTIONIERTEN POLYSIA-KETTENLÄNGEN. | 46 |
| ABBILDUNG 25: INHIBITION DER HISTON-VERMITTELTEN ZYTOTOXIZITÄT IST VON DER KETTENLÄNGE DER POLYSIA ABHÄNGIG. | 47 |
| ABBILDUNG 26: STRUKTUR DER OXIDIERTEN POLYSIA..... | 48 |
| ABBILDUNG 27: REDUKTION DER ZYTOTOXIZITÄT DURCH OXIDIERTE POLYSIA VS. NATIVE POLYSIA. ... | 48 |
| ABBILDUNG 28: DURCH NET AUSGELÖSTE PATHOLOGIEEN..... | 50 |
| ABBILDUNG 29: MD-SIMULATION (MOLECULAR DYNAMICS) VON POLYSIA KETTEN UND HISTON. | 53 |
| ABBILDUNG 30: POLYSIALYLIERTE NANO-PARTIKEL BINDEN AN NUKLEOSOMEN AUS <i>NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS</i> (NETs). | 54 |
| ABBILDUNG 31: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PENUMBRA EINES ISCHÄMISCHES HIRNINFARKTES. | 57 |

9 TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| TABELLE 1: LABORBEDARF UND VERBRAUCHSMATERIALIEN | 26 |
| TABELLE 2: VERWENDETE GERÄTE | 27 |
| TABELLE 3: VERWENDETE ROHSTOFFE | 27 |
| TABELLE 4: VERWENDETE MEDIEN, PUFFER UND ZELLKULTURZUSÄTZE | 28 |
| TABELLE 5: VERWENDETE ZELLEN | 28 |

10 LITERATURVERZEICHNIS

- Abrams, S., Zhang, N., Manson, J., Lui, T., Dart, C., . . . C-H. (2013). Circulating Histones are Mediators of Trauma-associated Lung Injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187(2), pp. 160-169.
- Alghamdi, A., & Foster, D. (2005). Seminal DNase frees Spermatozoa entangled in Neutrophil Extracellular Traps. *Biology of Reproduction*, S. 1174-1181.
- Allam, R., Kumar, S., Darisipudi, M., & Anders, H. (2014). Extracellular histones in tissue injury and inflammation. *Journal of Molecular Medicine*, 92(5), pp. 465-472.
- Angata, K., & Fukuda, M. (2003). Polysialyltransferases: major players in polysialic acid synthesis on the neural cell adhesion molecule. *Biochimie*, 85(1-2).
- Angata, T., & Varki, A. (2002). Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chemical reviews* 102, S. 439-469.
- Ansorge, S. (2006). Immunsystem. In L. G., P. P.E., & H. P.C, *Biochemie und Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer.
- Azurmendi, H., Vionnet, J., Wrightson, L., Trinh, L., Shiloach, J., & Freedberg, D. (2007). Extracellular structure of polysialic acid explored by on cell solution NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(28), pp. 11557-11561.
- Bäumner, R. (2013). Nachweis von polysialylierten Glykoproteinen auf bovinen und humanen Spermien. *Dissertation*.
- Barry, G., & Goebel, W. (1957). Colominic Acid, a Substance of Bacterial Origin related to Sialic Acid. *Nature*.
- Berger-Achituv, S., Brinkmann, V., Abu Abed, U., Kühn, L., Ben-Ezra, J., Elhasid, R., & Zychlinsky, A. (2013). A proposed role of neutrophil extracellular traps on cancer immunoediting. *Frontiers in Immunology*, 4(48).
- Bevilacqua, M., Butcher, E., Furie, B., Gallatin, M., Gimbrone, M., J., H., . . . McEver, R. (1991). Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell*, 67(2), pp. 233.
- Blix, G. (1936). Über die Kohlenhydratgruppen des Submaxillarmucins. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 240 (1-2), S. 43-54.
- Blix, G., Gottschalk, A., & Klenk, E. (1957). Proposed Nomenclature in the Field of Neuraminic and Sialic Acids. *Nature* 179, S. 1088.
- Bornhöfft, K., & Galuska, S. (May 2019). Glycan as modulators for the formation and functional properties of neutrophil extracellular traps: Used by the forces of good and evil. *Frontiers in immunology*.
- Bornhöfft, K., Goldhammer, T., Rebl, A., & Galuska, S. (September 2018). Siglecs: A journey through the evolution of sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins. *Developmental and comparative immunology*, S. 219-231.
- Branzk, N., & Papayannopoulos, V. (2013). Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Seminars in Immunopathology*, 35(pp. 513-530).
- Brill, A., Fuchs, T., Savchenko, A., Thomas, G., Martinod, K., De Meyer, S., . . . Wagner, D. (2012). Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, S. 136-144.
- Brinkmann, V., & A., Z. (2007). Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature Review Microbiology*, 6(8), pp. 577-582).
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. W., & A., Z. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), pp. 1532-1535).
- Bucki, R., Cruz, K., Pogoda, K., Eggert, A., Chin, L., Ferrin, M., . . . Janmey, P. (2015). Enhancement of Pulmozyme activity in purulent sputum by combination with poly-aspartic acid or gelsolin. *Journal of Cystic Fibrosis*, S. 587-593.
- Busch, O. (2016). Identifikation von polysialylierten Glykoproteinen im Nebenhoden der Ratte sowie auf humanen und bovinen Spermien. *Dissertation*.

- Chen, R., Kang, R., Fan, X.-G., & Tang, D. (2014). Release and activity of histone in disease. *Cell Death and Disease*, 5.
- Cheng, M., Lin, C., Lin, H., Yu, Y., & Wu, S. (2004). Hydrolysis, lactonization, and identification of alpha2,8/alpha2,9 alternatively linked tri-, tetra-, and polysialic acid. *Glycobiology*, 14(2).
- Clark, S., Ma, A., Tavener, S., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kely, M. P., . . . Kubes, P. (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature Medicine*, 13(4), pp. 463-469).
- Close, B., & Colley, K. (1998). In Vivo Autopolysialylation and Localization of the Polysialyltransferases PST and STX. *The Journal of biological chemistry*, 273(51), pp. 34586-34593).
- Close, B., Tao, K., & Colley, K. (2000). Polysialyltransferase-1 autopolysialylation is not requisite for polysialylation of neural cell adhesion molecule. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(6), pp. 4484-4491).
- Close, B., Wilkinson, J., Bohrer, T., Goodwin, C., Brom, L., & Colley, K. (2001). The polysialyltransferase ST8Sia II/STX: posttranslational processing and role of autopolysialylation in the polysialylation of neural cell adhesion molecule. *Glycobiology*, 11(11), pp. 997-1008).
- Colley, K., Kitajima, K., & Sato, C. (2014). Polysialic acid: biosynthesis, novel functions and applications. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 49(6), pp. 498-532).
- Cools-Lartigue, J., Spicer, J., McDonald, B., Gowing, S., Chow, S., Giannias, B., . . . Ferri, L. (2013). Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(8), pp. 3446-3458).
- Crocker, P., & Varki, A. (2001). Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends in Immunology*, 22(6), pp. 337-342).
- Crocker, P., Clar, E., Filbin, M., Gordon, S., Jones, Y., Kehrl, J., . . . Varki, A. (1998). Siglecs: A family of sialic-acid binding lectins. *Glycobiology*, 8(2).
- Curreli, S., Arany, Z., Gerardy-Schahn, R., Mann, D., & Stamatou, N. (2007). Polysialylated Neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T Lymphocyte interactions. *The Journal of biological chemistry*, 282(42), pp. 30346-30356).
- De Meyer, S., Suidan, G., Fuchs, T., Monestier, M., & Wagner, D. (2012). Extracellular chromatin is an important mediator of ischemic stroke in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(8), pp. 1884-1891).
- Doenecke, D., Karlson, P., Kossel, A., Miescher, F., Schulze, E., & Steiger, E. (1984). Albrecht Kossel and the discovery of histones. . *Trends in Biochemical Science*, 9(pp. 404-405).
- Doster, R., Rogers, L., Gaddy, J., & Aronoff, D. (2018). Macrophage Extracellular Trap: A Scoping Review. *Journal of Innate Immunity*, 10(pp. 3-13).
- Dworski, R., Simon, H.-U., Hoskins, A., & Yousefi, S. (2011). Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. *Journal of Immunology and Clinical Immunology*, 127(5), pp. 1260-1266).
- Erpenbeck, L., & Schön, M. (2017). Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression? *Oncogene*, 36(pp. 2483-2490).
- Finne, J. (1982). Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain. *Journal of Biological Chemistry*, S. 11966-11970.
- Finne, J., Finne, U., Deagostini-Bazin, H., & Goridis, C. (1983). Occurrence of alpha 2-8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule. *Biochemical and biophysical research communications*, S. 482-487.
- Fuchs, T., Abed, U., C., G., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., . . . Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*, 176(2), pp. 231-241).

- Fuchs, T., Bhandari, A., & Wagner, D. (2011). Histones induce rapid and profound thrombocytopenia in mice. *Blood*, *118*(13), pp. 3708-3714.
- Fuchs, T., Brill, A., & Wagner, D. (2012). NET impact on deep vein thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, *32*(8), pp. 1777-1783.
- Fuchs, T., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, J. D., . . . Wagner, D. (2010). Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(36), pp. 15880-15885).
- Galuska, C. E., Dambon, J. A., Kühnle, A., Börnhofft, K. F., Prem, G., Zlatina, K., . . . Galuska, S. P. (2017). Artificial Polysialic Acid Chains as Sialidase-Resistant Molecular-Anchors to Accumulate Particles on Neutrophil Extracellular Traps. *Frontiers in Immunology*(8).
- Galuska, C., Lütke, T., & Galuska, S. (2017). Is Polysialylated NCAM Not Only a Regulator during Brain Development But also during the Formation of other Organs? *Biology*, *6*(2).
- Galuska, S. (2013). Identifizierung von polysialylierten Glykoproteinen und Charakterisierung derer biologischer Funktionen. *Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi des Fachbereichs Medizin*. Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Galuska, S. P., Galuska, C. E., Tharmalingam, T., Zlatina, K., Prem, G., Husejnov, F. C., . . . Carrington, S. D. (2017). In vitro generation of polysialylated cervical mucins by bacterial polysialyltransferases to counteract cytotoxicity of extracellular histones. *The FEBS journal*.
- Galuska, S. P., Geyer, H., Mink, W., Kaese, P., Kühnhardt, S., & Schäfer, B. (2012). Glycomic strategy for efficient linkage analysis of di-, oligo- and polysialic acids. *Journal of Proteomics* *75*, S. 5266-5278.
- Galuska, S. P., Geyer, H., Weinhold, B., Kontou, M., Röhrich, R. C., Gerardy-Schahn, R., . . . Geyer, R. (2010). Quantification of Nucleotide-Activated Sialic Acids by a Combination of Reduction and Fluorescent Labeling. *Analytical Chemistry* *82*, S. 4591-4598.
- Galuska, S., Geyer, R., Gerardy-Schahn, R., Mühlhoff, M., & Geyer, H. (2008). Enzyme-dependent variations in the polysialylation of the Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(1).
- Galuska, S., Rollenhagen, M., Kaup, M., Eggers, K., Oltmann-Norden, I., Schiff, M., . . . Geyer, H. (2010). Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(pp. 10250–10255).
- Gascon, E., Vutskits, L., & Kiss, J. (2007). Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. *Brain Research Reviews*, *56*(1), pp. 101-118).
- Gauthier, V., Tyler, L., & Mannik, M. (1996). Blood clearance kinetics and liver uptake of mononucleosomes in mice. *The Journal of Immunology*, *156*(pp. 1151-1156).
- Gebrehiwot, A., Melka, D., Kassaye, Y., Rehan, I., Rangappa, S., Hinou, H., . . . Nishimura, S.-I. (December 2018). Healthy human serum N-glycan profiling reveals the influence of ethnic variation on the identified cancer-relevant glycan biomarkers. *PLOS one*.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., & Parks, W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* *51*, S. 1417-1423.
- Gottlieb, Y., Elhasid, R., Berger-Achituv, S., Brazowski, E., A., Y.-F., & Cohen, S. (2018). Neutrophil extracellular traps in pediatric inflammatory bowel disease. *Pathology international*, S. 517-523.
- Grayson, P., & Kaplan, M. (2016). At the Bench: Neutrophil extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune diseases. *Journal of Leukocyte Biology*, *99*(2), pp. 253-264).

- Gstraunthaler, G., & Lindl, T. (2013). *Zell- und Gewebekultur. Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen. 7. Auflage.* Berlin: Springer Spektrum.
- Gupta, S., & Kaplan, M. (2016). The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. *Nature Reviews Nephrology*, 12(7), pp. 402-413).
- Hänsch, M. (2014). Charakterisierung der testikulären PolySia-NCAM Expression während der saisonalen Spermatogenese des Rehbocks. *Dissertation.*
- Hammond, M., Sims, C., Parameshwaran, K., Suppiramaniam, V., Schachner, M., & Dityatev, A. (2006). Neural Cell Adhesion Molecule-associated Polysialic Acid Inhibits NR2B-containing N-Methyl-D-aspartate Receptors and Prevents Glutamate-induced Cell Death. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(46), pp. 34859-34869).
- Hancock, R., & Patrzykat, A. (2002). Clinical Development of Cationic Antimicrobial Peptides: From Natural to Novel Antibiotics. *Current Drug Targets - Infectious Disorders*, 2(pp. 79-83).
- Hasler, P., Giaglis, S., & Hahn, S. (2016). Neutrophil extracellular traps in health and disease. *Biomedical intelligence.*
- Huh, Y. H., King, J., Cohen, J., & L., S. J. (2011). SACK-Expanded Hair Follicle Stem Cells Display Asymmetric Nuclear Lgr5 Expression With Non-Random Sister Chromatid Segregation. *Scientific Reports* 1.
- Inoue, A. S., & Kitajima, K. (2010). Extensive enrichment of N-glycolylneuraminic acid in extracellular sialoglycoproteins abundantly synthesized and secreted by human cancer cells. *Glycobiology*(pp. 752-762).
- Inoue, S., Lin, S.-L., Lee, Y. C., & Inoue, Y. (2001). An ultrasensitive chemical method for polysialic acid analysis. *Glycobiology* 11, S. 759-767.
- Isomura, R., Kitajima, K., & Sato, C. (2011). Structural and Functional Impairments of Polysialic Acid by a Mutated Polysialyltransferase Found in Schizophrenia. *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), pp. 21535-21545).
- Janas, T., & Janas, T. (2011). Membrane oligo- and polysialic acids. *Biochimica et Biophysica Acta*(pp. 2923-2932).
- Johnson, C., Fujimoto, O., U., R., & D.E, L. (2005). Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(1), pp. 137-145).
- Käse, M., Galuska, C., Simon, P., Braun, B., Cabrera-Fuentes, H., Middendorff, R., . . . Galuska, S. (2015). Polysialylation takes place in granulosa cells during apoptotic processes of atretic tertiary follicles. *The FEBS Journal*, 282(pp. 4595-4606).
- Kanato, Y., K., K., & Sato, C. (2008). Direct binding of polysialic acid to a brain-derived neurotrophic factor depends on the degree of polymerization. *Glycobiology*, 18(12), pp. 1044-1053).
- Kaplan, M., & Radic, M. (2012). Neutrophil extracellular traps (NETs): Double-edged swords of innate immunity. *Journal of Immunology*, 189(6), pp. 2689-2695).
- Kawasaki, H., & Iwamuro, S. (2008). Potential roles of histones in host defense as antimicrobial agents. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 8(3), pp. 195-205).
- Kessenbrock, K., Krumbholz, M., Schönemarker, U., Back, W., Gross, W., Werb, Z., . . . D.E., J. (2009). Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nature Medicine*, S. 623-625.
- Khandpur, R., Carmona-Rivera, C., Vivekanandan-Giri, A., Gizinski, A., Yalavarthi, S., Knight, J., . . . Kaplan, M. (2013). NETs are source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Science translational medicine*, 5(178).
- Kiermaier, E., Moussion, C., Veldkamp, C. T., Gerardy-Schahn, R., de Vries, I., Williams, L. G., . . . Sixt, M. (2016). Polysialylation controls dendritic cell trafficking by regulating chemokine recognition. *Science*, 351(pp. 186-190).
- Kleene, R., & Schachner, M. (2004). Glycans and neural cell interactions. *Nature Reviews, Neuroscience*, 5(pp. 195-208).

- Kornfeld, S., Kornfeld, R., Neufeld, E. F., & O'Brien, P. J. (1964). The Feedback Control of Sugar Nucleotide Biosynthesis in Liver. *Biochemistry*, 52.
- Lübbbers, J., Rodriguez, E., & van Kooyk, Y. (2018). Modulation of Immune Tolerance via Siglec-Sialic Acid Interactions. *Frontiers in Immunology*, 9.
- Lackie, P., C., Z., & J., R. (1994). Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is widely expressed during organogenesis in mesodermal and endodermal derivatives. *Differentiation*, 57(2), pp. 119-131).
- Laridan, E., Denorme, F., Desender, L., Francois, O., Andersson, T., Deckmyn, H., & Vanhoorelbeke, D. M. (2017). Neutrophil Extracellular Traps in Ischemic Stroke Thrombi. *Annals of Neurology*, 82(pp. 223-232).
- Laverty, G., Gorman, S., & Gilmore, B. (2011). The Potential of Antimicrobial Peptides as Biocides. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(pp. 6566-6596).
- Lifely, M., Gilbert, A., & Moreno, C. (1981). Sialic acid polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* and *Escherichia coli*: esterification between adjacent residues. *Carbohydrate research*, S. 193-203.
- Lin, A., Rubin, C., Khandpur, R., Wang, J., Riblett, M., Yalavarthi, S., . . . Bruce, A. (2011). Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *Journal of Immunology*, S. 490-500.
- Lin, S.-L., Inoue, S., & Inoue, Y. (2000). Acid-base properties of the reaction product of sialic acid with fluorogenix reagent, 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB). *Carbohydrate research* 329, S. 447-451.
- Lundblad, A. (2015). Gunnar Blix and his discovery of sialic acids. Fascinating molecules in glycobiology. *Uppsala Journal of Medical Sciences* 120, S. 104-112.
- Mühlenhoff, M., Eckhardt, M., Bethe, A., Frosch, M., & Gerardy-Schahn, R. (1996). Autocatalytic polysialylation of polysialyltransferase-1. *The EMBO Journal*, 15(24), pp. 6943-6950).
- Müller, S. (2013). Gesteigerte Polysialylierung bei der Idiopathischen Pulmonalen Fibrose und Chronisch Obstruktiven Pulmonalen Krankheit. *Dissertation*.
- MacKenzie, C., Hlrama, T., Lee, K., Altman, E., & Young, N. (1997). Quantitative Analysis of Bacterial Toxin Affinity and Specificity for Glycolipid Receptors by Surface Plasmon Resonance. *Journal of Biological Chemistry*, 272(9), pp. 5533-5538).
- Marcos, V., Zhou, Z., A.O., Y., A., B., A., H., Vitkov, L., . . . Hartl, D. (2010). CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nature Medicine*, 16(9), pp. 1018-1023).
- Marquina, G., Waki, H., Fernenandez, L., Kon, K., Carr, A., Valiente, O., . . . Ando, S. (1996). Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Research*, 56(22), pp. 5165-5171).
- Marsman, G., Zeerleder, S., & Luken, B. (2016). Extracellular histones, cell-free DNA, or nucleosomes: differences in immunostimulation. *Cell Death and Disease*, 7.
- Martin, M., Moutri, A. G., & Varki, A. (2005). Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nature Medicine*, 11(pp. 228-232).
- Martinod, K., & Wagner, D. (2014). Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood*, 123(18), pp. 2768-2776).
- McGuire, E., & Binkley, S. B. (1964). The Structure and Chemistry of Colominic Acid. *Biochemistry*, S. 247-251.
- McIntosh, I., & Cutting, G. (1992). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and the etiology and pathogenesis of cystic fibrosis. *Federation of the American Societies for Experimental biology*, 6(10), pp. 2775-2782).
- Megens, R., Vijayan, S., Lievens, D., Döring, Y., van Zandvoort, M., Grommes, J., . . . Soehnlein, O. (2012). Presence of luminal neutrophil extracellular traps in atherosclerosis. *Thrombosis and Haemostasis*, S. 597-598.
- Meng, H., Jain, S., Lockshin, C., Shaligram, U., Martinez, J., Genkin, D., . . . Hoppe IV, H. (2018). Clinical Application of Polysialylated Deoxyribonuclease and Erythropoietin. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, S. 212-222.

- Miller, B., Abrams, R., Dorfman, A., & Klein, M. (1942). Antimicrobial properties of protamine and histone. *Science*, 96(pp. 428-430).
- Miragall, F., Kadmon, G., Husmann, M., & Schachner, M. (1988). Expression of cell adhesion molecules in the olfactory system of the adult mouse: presence of the embryonic form of N-CAM. *Developmental Biology*, 129(2, pp: 516-531).
- Mishra, B., von der Ohe, M., Schulze, C., Bian, S., Makhina, T., Loers, G., . . . Schachner, M. (2010). Functional Role of the Interaction between Polysialic Acid and Extracellular Histone H1. *The Journal of Neuroscience*, 30(37, pp. 12400-12413).
- Mitroulis, I., K., K., A., C., Skendros, P., Apostolidou, E., Kourtzelis, I., . . . Ritis, K. (2011). Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 β and autophagy-related signaling in gout. *PLoS One*.
- Moller, C., Byskov, A., Roth, J., Celis, J., & Bock, E. (1991). NCAM in developing mouse gonads and ducts. *Anatomy and Embryologie*, 184(6, pp. 541-548).
- Montenarh, M., & Löffler, G. (2007). Nucleotide und Nucleinsäuren. In G. Löffler, P. Petrides, & P. Heinrich, *Biochemie und Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer.
- Morshed, M., Hlushchuk, R., Simon, D., Walls, A., Obata-Ninomiya, K., Karasuyama, H., . . . Yousefi, S. (2014). NADPH Oxidase-Independent Formation of Extracellular DNA Traps by Basophils. *Journal of Immunology*, 192(11, pp. 5314-5323).
- Nakata, D., & Troy, F. 2. (2005). 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. *Journal of Biological Chemistry*, 280(46, pp. 38305-38316).
- Nakata, D., Zhang, L., & FA, T. (2006). Molecular basis for polysialylation: a novel polybasic polysialyltransferase domain (PSTD) of 32 amino acids unique to the alpha 2,8-polysialyltransferases is essential for polysialylation. *Glycoconjugates Journal*, 23(5-6).
- Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R., & Zhu, X. (2009). Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(pp. 9-22).
- Ono, S., Hane, M., Kitajima, K., & Sato, C. (2012). Novel Regulation of Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2)-mediated Cell Growth by Polysialic Acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(6, pp. 3710-3722).
- Orlandi, P., Klotz, F., & Haynes, J. (1992). A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of Plasmodium falciparum recognizes the terminal Neu5Ac(alpha 2-3)Gal- sequences of glycophorin A. *Journal of Cellular Biology*, 116(4, pp. 901-909).
- Papayannopoulos, V. (2018). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology*, 18(pp. 134-147).
- Papayannopoulos, V., & A., Z. (2009). NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends in Immunology*, 30(11, pp. 513-521).
- Park, J., Wysocki, R., Amoozgar, Z., Maiorino, L., Fein, M., Jorns, J., . . . Egeblad, M. (2016). Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Science Translational Medicine*, 19(8).
- Paul, A., & Padler-Karavani, V. (2018). Evolution of sialic acids: Implications in xenotransplant biology. *Xenotransplantation*, 25(6).
- Pham, T., Gregg, C., Karp, F., Chow, R., Padler-Karavani, V., Cao, H., . . . Varki, A. (2009). Evidence for a novel human-specific xeno-auto-antibody response against vascular endothelium. *Blood*, S. 5225-5235.
- Pilsczek, F., Salina, D., Poon, K., Fahey, C., Yipp, B., Sibley, C., . . . Kubes, P. (2010). A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus. *The Journal of Immunology*, 185(12, pp. 7413-7425).
- Pshezhetsky, A., & Ashmarina, M. (2018). Keeping it trim: roles of neuraminidases in CNS function. *Glycoconjugate Journal*, S. 375-386.

- Ram, S., Sharma, A., Simpson, S., Gulati, S., McQuillen, D., Pangburn, M., & Rice, P. (1998). A Novel Sialic Acid Binding Site on Factor H Mediates Serum Resistance of Sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Experimental Medicine*, 187(5), pp. 743-752).
- Rey-Gallardo, A., Escribano, C., Delgado-Martin, C., Rodriguez-Fernandez, J., Gerardy-Schahn, R., Rutishauser, U., . . . Vega, M. (2010). Polysialylated neuropilin-2 enhances human dendritic cell migration through the basic C-terminal region of CCL21. *Glycobiology*, 20(9), pp. 1139-1146).
- Richards, R., Moss, J., Alving, C., Fishman, P., & Brady, R. (1979). Cholera toxin: a bacterial lectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(7), pp. 1673-1676).
- Ringleb, P., Veltkamo, R., & Hacke, W. (2016). Zerebrale Durchblutungsstörungen: Ischämische Infarkte. In W. Hacke, *Neurologie*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Rose, F., Bailey, K., Keyte, J., W.C., C., Greenwood, D., & Mahida, Y. (1998). Potential Role of Epithelial Cell-Derived Histone H1 Proteins in Innate Antimicrobial Defense in the Human Gastrointestinal Tract. *Infection and Immunity*, 66(7), pp. 3255-3263).
- Rubin, B. (2007). Mucus structure and properties in cystic fibrosis. *Paediatric Respiratory Reviews*, 8(1), pp. 4-7).
- Rutishauser, U. (2008). Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(pp. 26-35).
- Saffarzadeh, M., & Preissner, K. (2013). Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: manoeuvres for host protection. *Current Opinion Hematology*, 20(1), pp. 3-9).
- Saffarzadeh, M., Juenemann, C., Queisser, M. A., Lochnit, G., Barreto, G., & Galuska, S. P. (2012). Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death. A Predominant Role of Histones. *PLoS One* 7.
- Sato, C. (2013). Polysialic Acid. In I. M.-D. Joe Tiralongo, *Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function*. Queensland, Australia: Bentham Science Publishers .
- Sato, C. (2017). Releasing Mechanism of Neurotrophic Factors via Polysialic Acid. In G. Litwack, *Vitamins and Hormones, Neurotrophins*. Toluca Lake, North Hollywood, California: Academic Press, an imprint of Elsevier.
- Sato, C., & Kitajima, K. (2011). New Functions of Polysialic Acid and its Relationship to Schizophrenia. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 23(133), pp. 221-238).
- Sato, C., & Kitajima, K. (2013). Impact of structural aberrancy of polysialic acid and its synthetic enzyme ST8SIA2 in schizophrenia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(61).
- Sato, C., Inoue, S., Matsuda, T., & Kitajima, K. (1999). Fluorescent-Assisted Detection of Oligosialyl Units in Glycoconjugates. . *Analytical Biochemistry* 266, S. 102-109.
- Schauer, R. (2004). Sialic acids. Fascinating sugars in higher animals and man. . *Zoology* 107, S. 49-64.
- Scheuer, T., McHugh, L., Tejedor, F., & Catterall, W. (1988). Functional properties of neuraminidase-treated rat brain sodium channels. *Biophysical Journal*, 53.
- Schmitz, S. (2011). *Der Experimentator: Zellkultur 3. Auflage*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Schnaar, R., Gerardy-Schahn, R., & Hildebrandt, H. (2014). Sialic Acids in the Brain, Gangliosides and Polysialic Acid in Nervous System Development, Stability, Disease and Regeneration. *Physiological Reviews* 94, S. 461-518.
- Schorn, C., Janko, C., Latzko, M., Chaurio, R., Schett, G., & Herrmann, M. (2012). Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Frontiers in Immunology*, 3(3, 277).

- Schwarzkopf, M., Knobeloch, K.-P., Rohde, E., Hinderlich, S., Wiechens, N., Lucka, L., . . . Horstkorte, R. (2002). Sialylation is essential for early development in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *S.* 5267-5270.
- Seki, T., & Y., A. (1991). The persistent expression of a highly polysialylated NCAM in the dentate gyrus of the adult rat. *Journal of Neuroscience Research*, *12*(4, pp. 503-513).
- Silk, E., Zhao, H., Weng, H., & Ma, D. (2017). The role of extracellular histone in organ injury. *Cell Death and Disease*, *8*.
- Simon, D., Hoesli, S., Roth, N., Staedler, S., Yousefi, S., & Simon, H.-U. P. (2011). Eosinophil extracellular DNA traps in skin diseases. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *S.* 194-199.
- Simon, D., Simon, H.-U., & Yousefi, S. (2013). Extracellular DNA traps in allergic, infectious, and autoimmune diseases. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *S.* 409-416.
- Simon, P., Bäumner, S., Busch, O., Röhrich, R., Kaese, M., Richterich, P., . . . Galuska, S. P. (2013). Polysialic Acid Is Present in Mammalian Semen as a Post-translational Modification of the Neural Cell Adhesion Molecule NCAM and the Polysialyltransferase ST8Siall. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(26).
- Stamatos, N., Zhang, L., Jokilammi, A., Finne, J., Chen, W., El-Maarouf, A., . . . Hankey, K. (2014). Changes in polysialic acid expression on myeloid cells during differentiation and recruitment to sites of inflammation: Role in phagocytosis. *Glycobiology*, *24*(9, pp. 864-879).
- Steinhäuser, C., & Dietrich, D. (2015). Neuron-Glia Synapsen im Gehirn: Eigenschaften, Diversität und Funktionen von NG2 Glia. *Neuroforum*, *21*(pp. 106-111).
- Stummeyer, K., Dickmanns, A., Mühlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R., & Ficner, R. (2005). Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F. *Natural Structural & Molecular Biology*, *12*.
- Suzukui, Y., Ito, T., Suzuki, T., Holland, R. J., Chambers, T., Kiso, M., . . . Kawaoka, Y. (2000). Sialic Acid Species as a Determinant of the Host Range of Influenza A Viruses. *Journal of Virology*, *74*(24, pp. 11825-11831).
- Takahashi, K., Mitoma, J., Hosono, M., Shiozaki, K., Sato, C., Yamaguchi, K., . . . Miyagi, T. (2012). Sialidase NEU4 hydrolyzes Polysialic Acids of Neural Cell Adhesion Molecules and negatively regulates neurite formation by hippocampal neurons. *Journal of Biological Chemistry*, *S.* 14816-14826.
- Tangvoranuntakul, P., Gagneux, P., Diaz, S., Bardor, M., Varki, N., Varki, A., & Muchmore, E. (2003). Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(21, pp. 12045-12050).
- Taylor, R., Gregg, C., Padler-Karavani, V., Ghaderi, D., Yu, H., Huang, S., . . . Varki, A. (2010). Novel mechanism for the generation of human xenoautoantibodies against the nonhuman sialic acid N-glycolylneuraminic acid. *Journal of Experimental Medicine*, *207*(8, pp. 1637-1646).
- Teclé, E., & Gagneux, P. (2015). Sugar-Coated Sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. *Molecular Reproduction & Development*, *82*(9, pp. 635-650).
- Theodosis, D., G., R., & Poulain, D. (1991). Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: Polysialylated neural cell adhesion molecule in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, *88*(pp. 5494-5498).
- Tiralongo, J. (2013). Introduction to Sialic Acid Structure, Occurrence, Biosynthesis and Function. In I. M.-D. Joe Tiralongo, *Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function*. Queensland, Australia: Bentham Science Publishers.

- Traving, C., & Schauer, R. (1998). Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54.
- Ulm, C., Saffarzadeh, M., Mahavadi, P., Müller, S., Prem, G., & Saboor, F. (2013). Soluble polysialylated NCAM: a novel player of the innate immune system in the lung. *Cellular and molecular life sciences* 70, S. 3695-3708.
- Urban, C., Reichard, U., V., B., & A., Z. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cellular Microbiology*, 8(4, pp. 668-676).
- Vaithianathan, T., Matthias, K., Bahr, B., Schachner, M., Suppiramaniam, V., Dityatev, A., & Steinhäuser, C. (2004). Neural Cell Adhesion Molecule-associated Polysialic Acid Potentiates alpha-Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic Acid Receptor Currents. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(46, pp. 47975-47984).
- Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, S. 97-130.
- Varki, A., & Schauer, R. (2009). Sialic Acids. In A. Varki, R. D. Cummings, & J. D. Esko, *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Varki, N., & Varki, A. (2007). Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Laboratory Investigation*, 87(pp. 851-857).
- Vetter, C. (1994). DNase für Mukoviszidose-Kranke: Lungenfunktion wird deutlich verbessert. *Deutsches Ärzteblatt*, 91(47).
- Villanueva, E., Yalavarthi, S., Berthier, C., Hodgins, J., Khandpur, R., Lin, A., . . . Kaplan, M. (2011). Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology*, 187(1, pp. 538-552).
- Vimr, E. R., Kalivoda, K., Deszo, E. L., & Steenbergen, S. (2004). Diversity of Microbial Sialic Acid Metabolism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, S. 132-153.
- von Kockritz-Blickwede, M., Goldmann, O., Thulin, P., Heinemann, K., Norrby-Teglund, A., Rohde, M., & Medina, E. (2008). Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood*, 111(6, pp. 3070-3080).
- Wang, B. (2009). Sialic Acid is an Essential Nutrient for Brain Development and Cognition. *Annual Review of Nutrition*, 29(pp. 177-222).
- Warren, L., & Felsenfeld, H. (1962). The Biosynthesis of Sialic Acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 237(5).
- Webster, S., Daigneault, M., M.A., B., Preston, J., Marriott, H., Walmsley, S., . . . Dockrell, D. (2010). Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease. *Journal of Immunology*, S. 2968-2979.
- Weinhold, B., Seidenfaden, R., Röckle, I., Mühlenhoff, M., Schertzing, F., Conzelmann, S., . . . Hildebrandt, H. (2005). Genetic Ablation of Polysialic Acid causes severe neurodevelopmental Defects rescued by deletion of the Neural Cell Adhesion Molecule. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(52).
- Werneburg, S., Büttner, F., Erben, L., Mathews, M., Neumann, H., Mühlenhoff, M., & Hildebrandt, H. (2016). Polysialylation and lipopolysaccharide-induced shedding of E-selectin ligand-1 and neuropilin-2 by microglia and THP-1 macrophages. *Glia*, 64(pp. 1314-1330).
- Werneburg, S., Mühlenhoff, M., Stangel, M., & H., H. (2015). Polysialic acid on SymCAM1 in NG2 cells and on neuropilin-2 in microglia is confined to intracellular pools that are rapidly depleted upon stimulation. *Glia*, 63(7, pp. 1240-1255).
- Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C., Semeraro, F., . . . C.T., E. (2009). Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nature Medicine*, 15(11, pp. 1318-1321).

LITERATURVERZEICHNIS

- Y., K., Kozaki, S., Sakaguchi, G., Iwamori, M., & Nagai, Y. (1986). Evidence for direct binding of Clostridium botulinum type E derivative toxin and its fragments to gangliosides and free fatty acids. *Biochemical and biophysical research communications*, 140(3, pp. 1015-1019).
- 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. *The Journal of biological chemistry*, 278(16, pp. 13875-13880).
- Yang, P., Major, D., & Rutishauser, U. (1994). Role of Charge and Hydration in effects of Polysialic Acid on molecular interactions on and between cell membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(37, pp 23039-23044).
- Yipp, B., & Kubes, P. (2013). NETosis: how vital is it? *Blood*, 122(pp. 2784-2794).
- Yousefi, S., Gold, J., Andina, N., Lee, J., Kelly, A., Kozlowski, E., . . . Simon, H. (2008). Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nature Medicine*, 14(9, pp. 949-953).
- Zentner, G., & Henikoff, S. (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(pp. 259-266).
- Zlatina, K., & Galuska, S. (Januar 2019). Polysialic Acid modulates only the antimicrobial properties of distinct histones. *ACS Omega*, S. 1601-1610.
- Zlatina, K., Lütteke, T., & Galuska, S. (December 2017). Individual Impact of Distinct PolySialic Acid Chain Lengths on die Cytotoxicity of Histone H1, H2A, H2B, H3 and H4. *Polymers*.
- Zuber, C., Lackie, P., Catterall, W., & Roth, J. (1992). Polysialic Acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. *The Journal of biological chemistry*, 267(14, pp. 9965-9971).

11 PUBLIKATIONEN

Galuska, C. E., Dambon, J. A., Kühnle, A., Bornhöfft, K. F., Prem, G., Zlatina, K., ... Galuska, S. P. (2017). **Artificial Polysialic Acid Chains as Sialidase-Resistant Molecular-Anchors to Accumulate Particles on Neutrophil Extracellular Traps**. *Frontiers in immunology*, 8, 1229. doi:10.3389/fimmu.2017.01229

Galuska, S. P., Galuska, C. E., Tharmalingam, T., Zlatina, K., Prem, G., Husejnov, F. C., ... Carrington, S. D. (2017). **In vitro generation of polysialylated cervical mucins by bacterial polysialyltransferases to counteract cytotoxicity of extracellular histones**. *The FEBS journal*

Ulm, C., Saffarzadeh, M., Mahavadi, P., Müller, S., Prem, G., & Saboor, F. (2013). **Soluble polysialylated NCAM: a novel player of the innate immune system in the lung**. *Cellular and molecular life sciences* 70, S. 3695-3708

12 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig 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 Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

13 DANKSAGUNG

„Was lange währt wird endlich gut“ oder auch fertig. In diesem Sinne danke ich all denjenigen, die geduldig mit mir waren bis zu Fertigstellung dieser Arbeit. Es war auch eine Geduldsprobe sowie ein langer Weg für mich neben Studium, Nebenjob und später dem Beruf und jetzt meinem Sohn diese Doktorarbeit zu schreiben. Dennoch hat mich das große Interesse an der Forschung, das Thema, die investierte Zeit incl. aller Mühen und auch Nerven motiviert. Einen großen Anteil hatten daran meine „Doktoeltern“ Sebastian und Christina, die mir zum einen diese Doktorarbeit ermöglicht haben und zur jeder Zeit voller Optimismus waren und mich stets angespornt haben. Auf euch kann man immer zählen und daher gilt mein besonderer Dank in erster Linie euch.

Weiterhin danke ich Werner M. für das Einlernen im Labor vor allem den verschiedenen Geräten insbesondere das Einarbeiten an den HPLC-Anlagen praktisch wie auch theoretisch. Speziell die sehr netten und unterhaltsamen Gespräche während den Pausen haben dazu geführt sich sehr wohl in der Arbeitsgruppe zu fühlen. Mein Dank gilt auch Siegfried K. und Peter K. für die ihre Unterstützung bei meinen Messungen und der Labororganisation. Uwe Sch. aus der AG Preissner gilt ebenfalls mein Dank, nicht nur für die Einarbeitung in Theorie und Praxis der Zellkultur, sondern auch für den gelegentlichen Abstecher in die Döner-Bude um sich für die nächsten Versuche zu stärken. Meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe (u.a. Rhea V., Max S., Sebastian St.) insbesondere aber Miriam K. danke ich fürs Dasein, auch für konstruktive Gespräche über die Experimente oder auch Privates, die Zusammenarbeit während der gemeinsamen Zeit und fürs Lachen und Quatschen während den Pausen und Inkubationszeiten.

Nicht nur die direkt in die diese Arbeit involvierten Personen, sondern auch meiner Familie und meinen Freunden sei ein großer Dank ausgesprochen.

Dir mein liebster Valon danke ich auch, auch wenn du nicht so viel von den Anfängen dieser Arbeit mitbekommen hast, unterstützt du mich jetzt jederzeit, wo du kannst. Du bist mein Ausgleich, meine bessere Hälfte und meine Zukunft. Mit dir gründe ich eine Familie, worauf ich mich sehr freue.

Nicht zuletzt aber vor allem den zwei besonderen Menschen, die mich nicht nur während meines ganzen Studiums sondern auch während bisherigen Lebens stets an meiner Seite waren und mich in allen Situationen unterstützt haben, gilt mein Dank, der in dem Fall nicht in Worte zu fassen ist: Meinen Eltern.