

**Nils Bastian Bayer**

---

Etablierung eines standardisierten Protokolls  
für die Synthese von  
peracetylierten N-Acyl-Mannosamin-Derivaten  
als artifizielle Sialinsäurevorläufermoleküle und  
ihr Einfluss auf das angioproliferative Potenzial  
von Humanen Umbilicalen Endothelzellen

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

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Etablierung eines standardisierten Protokolls für die Synthese von  
peracetylierten *N*-Acyl-Mannosamin-Derivaten als artifizielle  
Sialinsäurevorläufermoleküle und ihr Einfluss auf das angioproliferative  
Potenzial von Humanen Umbilicalen Endothelzellen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades Dr. med.  
im Fachbereich der Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Nils Bastian Bayer  
aus Gießen

Gießen 2016

Aus dem Biochemischen Institut des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. Lienhard Schmitz

Gutachter: PD Dr. Sebastian P. Galuska

Gutachter: Prof. Dr. Sauer

Tag der Disputation: 17.10.2016

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Struktur der Sialinsäuren . . . . .	1
1.2	Vorkommen und Funktion . . . . .	2
1.3	Sialinsäurebiosynthese und -katabolismus . . . . .	6
1.4	Sialinsäuren im Rahmen der Angiogenese . . . . .	8
1.5	Glycoengineering . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Hintergrund und Zielsetzung</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
3.1	Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Zellkulturzusätze . . . . .	18
3.1.1	Verbrauchsmaterialien . . . . .	18
3.1.2	Chemikalien . . . . .	18
3.1.3	Nährmedien und Zellkulturzusätze . . . . .	18
3.2	Synthese von peracylierten <i>N</i> -Acyl-Monosacchariden . . . . .	19
3.2.1	Synthese von 1,3,4,6- <i>O</i> -Ac <sub>4</sub> -2- <i>N</i> -Acyl-ManN . . . . .	19
3.2.2	Synthese von 1,3,4,6- <i>O</i> -Ac <sub>4</sub> -2- <i>N</i> -Acyl-GlcN . . . . .	19
3.3	Mikroanalytische Methoden . . . . .	20
3.3.1	HPLC . . . . .	20
3.3.2	GC . . . . .	20
3.3.3	GC-MS . . . . .	20
3.3.4	nanoLC-ESI-MS(/MS) . . . . .	21
3.4	Zellbiologische Methoden . . . . .	21
3.4.1	Kultur von A549-Lungenepithelzellen . . . . .	21
3.4.2	Isolation und Kultur von HUVECs . . . . .	22
3.4.3	Einfrieren und Auftauen der Zellen . . . . .	23
3.4.4	Zellzählung mittels Neubauerkammer und Trypanblaufärbung . . . . .	23
3.4.5	Inkubation mit verschiedenen peracetylierten ManNAc-Analoga . . . . .	24
3.4.6	Cytotoxizitätsmessung . . . . .	25

3.5 Sialinsäureanalytik . . . . .	26
3.5.1 Proteinextraktion und Probenvorbereitung . . . . .	26
3.5.2 HPLC-Auftrennung . . . . .	27
3.6 Spheroid-Assay . . . . .	27
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>29</b>
4.1 Etablierung eines standardisierten Protokolls für die Synthese peracetylierter 2- <i>N</i> -Acyl-Mannosamin-Derivate . . . . .	29
4.1.1 Peracylierung funktioneller Gruppen mit Carbonsäureanhydriden unter Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel . . . . .	29
4.1.2 <i>O</i> -Dealkylierung peracylierter Mannosaminderivate mit Triethylamin . . . . .	31
4.1.3 <i>O</i> -Dealkylierung peracylierter Mannosaminderivate mit wässriger Natronlauge . . . . .	35
4.1.4 <i>O</i> -Dealkylierung peracylierter Mannosaminderivate mit methanolischer Natronlauge . . . . .	38
4.2 Metabolismus und Inkorporation artifiziieller 2- <i>N</i> -Acetyl-Mannosaminanaloga im Zellkulturmodell . . . . .	43
4.2.1 Cytotoxizität der peracetylierten <i>N</i> -Acetyl-Mannosaminanaloga im Zellkulturmodell . . . . .	43
4.2.2 Metabolismus artifiziieller <i>N</i> -Acetyl-Mannosaminanaloga in verschiedenen Zelllinien . . . . .	44
4.2.3 Inkorporation von artifiziiellen Sialinsäuren in zelluläre Glykoproteine in verschiedenen Zelllinien . . . . .	48
4.3 Einfluss der modifizierten <i>N</i> -Acylierung von Sialinsäuren auf das angioproliferative Potential von Humanen Umbilicalen Venösen Endothelzellen . . . . .	51
<b>5 Diskussion</b>	<b>54</b>
5.1 Etablierung eines standardisierten Protokolls für die Synthese peracetylierter <i>N</i> -Acyl-Mannosamin-Derivate . . . . .	54
5.1.1 Abhängigkeit der Acylierung funktioneller Gruppen vom gewählten Lösungsmittel . . . . .	54
5.1.2 <i>O</i> -Dealkylierung mit Acetonitril und Triethylamin . . . . .	55
5.1.3 <i>O</i> -Dealkylierung mit wässriger Natronlauge . . . . .	57
5.1.4 <i>O</i> -Dealkylierung mit methanolischer Natronlauge . . . . .	59
5.2 Biokompatibilität der synthetisierten peracetylierten Mannosaminderivate . . . . .	61

*Inhaltsverzeichnis*

5.3 Metabolismus und Inkorporation artifizieller Sialinsäuren in Glykokonjugate .	63
5.4 Einfluss artifizieller <i>N</i> -Acylneuraminsäurevorläufer auf die Angiogenese <i>in vitro</i> . . . . .	68
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>78</b>
<b>7 Summary</b>	<b>79</b>
<b>8 Abbildungsverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>9 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>10 Literaturverzeichnis</b>	<b>87</b>
<b>11 Publikationen und Kongressbeiträge im Zusammenhang mit dieser Arbeit</b>	<b>106</b>
<b>12 Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>107</b>
<b>13 Danksagung</b>	<b>108</b>



# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Struktur der Sialinsäuren

Sialinsäuren sind strukturell betrachtet Derivate der Neuraminsäure (5-Amino-3,5-Dideoxy-D-Glycero-D-Galacto-non-2-ulosonsäure). Sie bestehen aus einem 9-gliedrigen  $\alpha$ -Ketosäure-Grundgerüst, das in der Regel am C<sub>5</sub>-Atom eine Aminogruppe trägt. Unveränderte Neuraminsäuren kommen physiologischerweise in der Natur allerdings nicht vor. Ausgangssubstrat der Synthese ist in der Regel cytosolisches *N*-Acetyl-Mannosamin aus dem Hexosaminweg. Den quantitativ häufigsten Vertreter der Sialinsäurefamilie stellt Neu5Gc, die *N*-glycolyl-Neuraminsäure dar. Sie ist die vorherrschende Sialinsäure im Stamm der Neumünder. Neu5Gc wird synthetisiert, indem die Acetamidogruppe der *N*-Acetyl-Neuraminsäure durch das Enzym CMP-*N*-Acetyl-Neuraminsäure-Hydroxylase an ihrem Methylrest hydroxyliert wird.

Der Metabolismus und auch die Synthese der Sialinsäuren weist verhältnismäßig viele einzigartige genetische Aberrationen im Vergleich zu phylogenetisch eng verwandten Spezies auf [Varki, 2009a]. So ist beim Menschen zum Beispiel das Gen der CMP-*N*-Acetyl-Neuraminsäure-Hydroxylase teilweise deletiert. Das translatierte Polypeptid ist trunziert und inaktiv. Der dritte bedeutsame Vertreter ist KDN (2-Keto-3-Deoxy-D-Glycero-D-Galactonononsäure), der sich im Gegensatz zu Neu5Ac und Neu5Gc allerdings nicht von ManNAc sondern von ManN ableitet. Für die Synthese existiert in humanen Zellen keine eigene Enzymmaschinerie. Stattdessen besitzen die Enzyme, die für die Synthese für Neu5Ac verantwortlich sind auch eine gewisse Affinität für die desaminierten Formen ihrer Substrate [Lawrence et al., 2000]. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur Vorläufermoleküle untersucht wurden, die am C<sub>5</sub>-Atom eine Aminoacyl-Modifikation tragen, wird der KDN-Stoffwechsel an dieser Stelle nicht näher diskutiert.

Sialinsäuren nehmen in wässriger Lösung eine <sup>2</sup>C<sub>5</sub>-Sesselkonformation an, sodass die exozyklische Glycerin-Seitenkette in äquatorialer Orientierung zu liegen kommt. Freie Sialinsäuren nehmen dabei bevorzugt eine  $\beta$ -anomere Konfiguration an. Zwischen der C<sub>7</sub>- und der C<sub>8</sub>-Hydroxylgruppe bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen aus, was zu einer erhöhten strukturellen Rigidität der Glycerinkette führt. Die C<sub>1</sub>-Carboxygruppe ver-

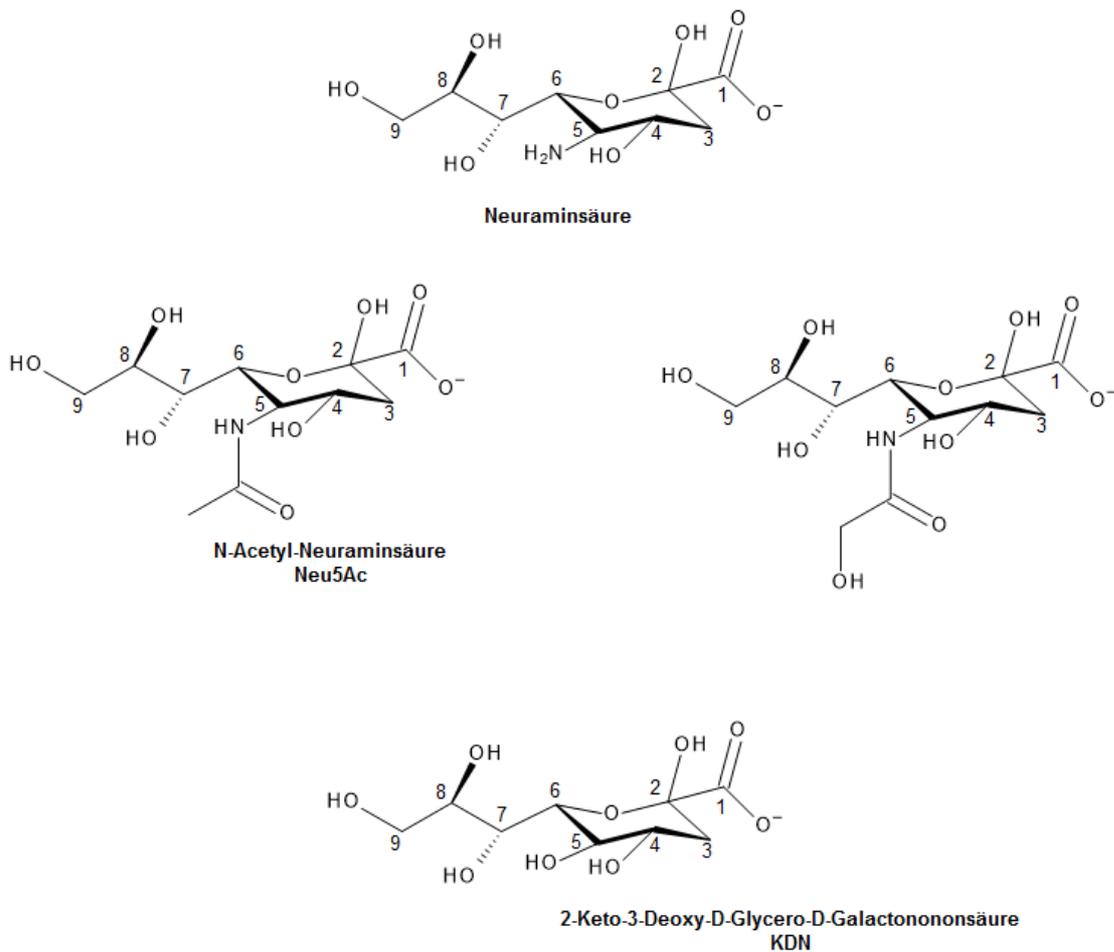
leiht den Verbindungen stark saure Eigenschaften bei einem  $pK_a$  von 2,6 (Neu5Ac). Unter physiologischen Bedingungen liegen Sialinsäuren daher als deprotoniertes Carboxylat-Anion vor und verleihen den entsprechenden Glykokonjugaten damit eine negative Ladung. Das  $C_1$ -Carboxylat kann allerdings auch Laktame oder Laktone bilden, wodurch die Ladung neutralisiert wird. Insbesondere, wenn Neu5Ac als Polymer vorliegt und unter sauren Bedingungen kommt es zur Kondensation der  $C_1$ -Carboxylgruppe eines Sialinsäuremoleküls mit der  $C_9$ -Hydroxylgruppe der folgenden Sialinsäureeinheit, sodass sich ein Laktoring ausbildet [Lifely et al., 1981]. Bei neutralem pH liegt Neu5Ac nahezu vollständig frei von Laktonen vor [Azurmendi et al., 2007].

PolySia weist eine hohe Resistenz gegenüber den endogenen Neuraminidasen NEU1-NEU3 auf. Nur NEU4 scheint in gewissem Maße am Gleichgewicht der Oberflächenpolysialinsäuren beteiligt zu sein [Takahashi et al., 2012]. Die Degradation entsprechender Sialokonjugate erfolgt daher vornehmlich über den lysosomalen Weg, wo der stark niedrige pH-Wert zu einer Destabilisierung und damit einer beschleunigten Fragmentierung führen kann [Manzi et al., 1994].

Die funktionellen Gruppen der Sialinsäuren werden nachträglich zum Teil erheblich weiter modifiziert. Dabei ist die häufigste Modifikation die Bildung von *O*-Acetyl-Estern an  $C_4$  oder an den Hydroxylgruppen der Glycerinseitenkette ( $C_7$ ,  $C_8$ ,  $C_9$ ). Diese *O*-Acetylierung von Glykokonjugaten spielt teilweise eine zentrale Rolle bei der Regulation ihrer Funktionen [Angata and Varki, 2002]. Darüber hinaus werden dadurch zahlreiche zelluläre Interaktionen beeinflusst wie zum Beispiel die Bindung von Sialinsäure-spezifischen Lectinen, sogenannten Siglecs, an ihre korrespondierenden Sialokonjugate [Sjoberg et al., 1994]. Daneben kommen auch Phosphorylierungen (9-*O*-Phospho-Neu5Ac) und Sulfatierungen (8-*O*-Sulf-Neu5Ac) innerhalb der Glycerinkette vor, die den ionischen Charakter der Sialinsäuren weiter verstärken [Angata and Varki, 2002].

## 1.2 Vorkommen und Funktion

Sialinsäuren kommen bevorzugt als terminale Monosaccharideinheiten am nicht-reduzierenden Ende von *N*- und *O*-Glykanen in Glykolipiden und Glykoproteinen, die sich als große hydrophile und hydratisierte Strukturen in den Extrazellularraum erstrecken, vor. Dabei sind die Neu5Ac-Residuen typischerweise  $\alpha$ -2,3-glykosidisch mit einem Galactoserest oder  $\alpha$ -2,6-glykosidisch mit Galactose, *N*-Acetyl-Glucosamin oder *N*-Acetyl-Galactosamin assoziiert (Abbildung 1.2). Diese Modifikationen werden durch die entsprechenden Sialyltransferasen im *trans*-Golgi-Netzwerk auf die Zielproteine beziehungswei-



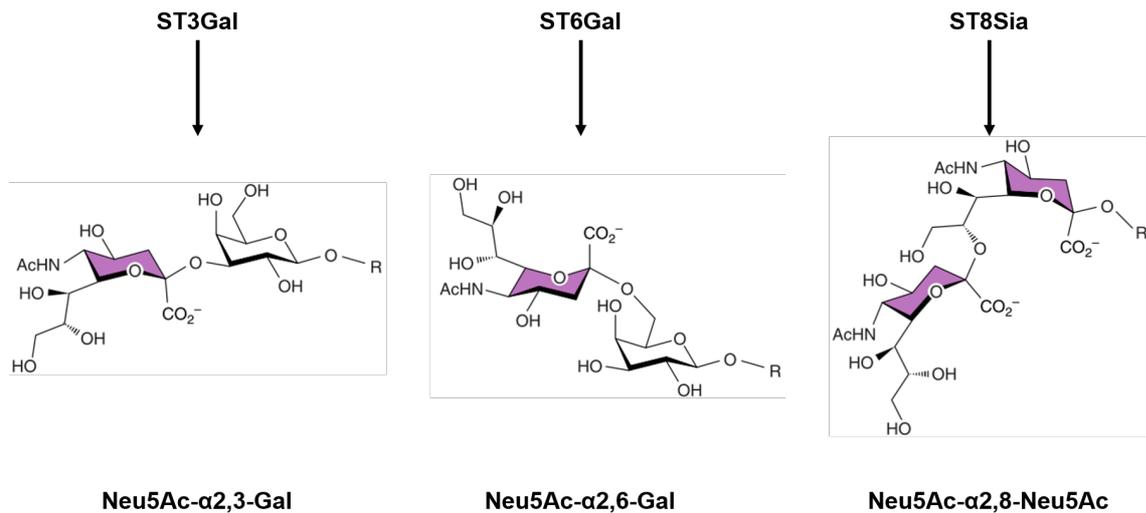
**Abbildung 1.1: Struktur der einzelnen Sialinsäuren**

Dargestellt sind die  $\beta$ -Anomere der in der Natur quantitativ wichtigsten Sialinsäuren. Die Carboxylgruppe liegt unter physiologischen Bedingungen deprotoniert vor und ist daher als Carboxylat gezeigt.

se -lipide übertragen, wobei  $\text{CMP-}\beta\text{-Neu5Ac}$  - nucleotidaktivierte Sialinsäure - als Donor fungiert.

Wie alle zellulären Makrostrukturen unterliegen auch Sialokonjugate einem konstanten Wechsel von Neusynthese und Degradation. Beim Abbau werden dabei die  $\alpha$ -glykosidisch gebundenen Sialinsäuren durch entsprechende Neuraminidasen hydrolysiert.

Die Glykane lagern sich typischerweise durch Lateraldiffusion zu Mikrodomänen in der Zellmembran an, die reich an Sialoglykanen sind und damit charakteristische Funktionen erfüllen. So können Oberflächenglykoproteine über extrazelluläre Lectine gebunden und quervernetzt werden [Brewer et al., 2002]. Die Interaktion der hydrophoben Anteile von ebenfalls oftmals sialylierten Glykosphingolipiden - sogenannten Gangliosiden - untereinander oder mit Cholesterin und anderen Membranbestandteilen führt zur Ausbildung von dynamischen Domänen, die man als „Lipid Raft“ bezeichnet und die übli-



**Abbildung 1.2: Struktur der häufigsten Neu5Ac-Verbindungen**

Abgebildet sind die wichtigsten Sialinsäure-Konjugationen, die im menschlichen Organismus vorkommen. Die korrespondierenden Sialyltransferasen weisen eine Bindungsspezifität für die Akzeptoroligosaccharide auf. Modifiziert nach [Schnaar et al., 2014].

cherweise Moleküle für Signaltransduktion und Zell-Zell-Interaktionen enthalten [Simons and Sampaio, 2011]. Ganglioside in der Membran gehen dabei sowohl *cis*-Interaktionen, bei denen sie mit anderen Membrankomponenten lateral assoziieren, als auch *trans*-Interaktionen ein, über die sie mit komplementären Bestandteilen der extrazellulären Matrix oder benachbarten Zelloberflächen in Wechselwirkung treten. Gerade die erstgenannten *cis*-Phänomene regulieren die Verteilung und den Aufbau der erwähnten Lipidflöße und können durch Assoziation mit Membranproteinen deren Aktivität modulieren [Regina Todeschini and Hakomori, 2008]. Dabei werden bevorzugt Rezeptortyrosinkinasen als Rezeptoren für Wachstumsfaktoren in ihrer Signaltransduktion durch Ganglioside beeinflusst [Bremer et al., 1986]. So tragen Sialokonjugate zur Gesamtorganisation der zellulären Membranarchitektur zu funktionellen Subdomänen bei.

Als Bestandteil von Glykanen nehmen Sialinsäuren Einfluss auf die Proteinfaltung sowie die Verteilung und Stabilität von Glykoproteinen und anderen Glykokonjugaten [Cohen and Varki, 2010]. Die oftmals terminale Sialylierung von Glykoproteinen und Glykolipiden ist häufig essenziell für die Funktion dieser Strukturen [Angata and Varki, 2002; Schauer, 2000, 2004]. Eine zentrale Rolle spielen Sialinsäuren vor allem bei der Regulation von Zell-Zell-Interaktionen und der daraus resultierenden Signaltransduktion [Hakomori, 2004]. Die spezielle Vermittlung der Funktionen oder Funktionsänderungen von Neu5Ac in Glykanen erfolgt sowohl auf globaler als auch auf submolekularer Ebene. Bei einigen Glykokonjugaten ist das Vorhandensein oder eben die Abwesenheit von Neu5Ac

funktionsbestimmend. Die Sialylierung beeinflusst die Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen und trägt zur Hydratisierung von Strukturen an der Zelloberfläche bei, sodass hier Moleküle mit neuen und distinkten Eigenschaften entstehen. So führt die Sialylierung von Lactosyl-Ceramid beispielsweise zur Bildung von GM3, einem proapoptotischen Gangliosid [Chung et al., 2014]. Die Übertragung eines weiteren Neu5Ac-Rests ergibt das Gangliosid GD3, das noch stärkere apoptotische Wirkungen hat [Giussani et al., 2014].

In anderen Situationen ist die glykosidische Bindung, mit der Neu5Ac an das entsprechende Glykan geknüpft ist, entscheidend. Manche Bindungsprozesse, wie sie zum Beispiel durch Siglecs vermittelt werden, sind spezifisch für  $\alpha$ -2,3-Neu5Ac, während andere ausschließlich  $\alpha$ -2,6-verknüpfte Sialinsäuren erkennen [Varki and Angata, 2006]. Auf submolekularer Ebene erfolgt die Bindung von Neu5Ac-Residuen zum Teil über spezifische Interaktionen mit den funktionellen Gruppen der Sialinsäure. Am besten charakterisiert sind hier die Hydroxylgruppen des Sialinsäuremoleküls, die gezielt acetyliert oder deacetyliert werden können und dadurch ihre Bindungseigenschaften ändern [Chen et al., 2006]. In anderen Spezies ist gerade die Modifikation des Aminoacetylrests essenziell. Durch Hydroxylierung wird hier Neu5Ac in Neu5Gc überführt, das andere distinkte Bindungseigenschaften aufweist [Varki, 2009a]. Beim Menschen ist das dafür zuständige Enzym trunkiert und inaktiv, sodass es nicht zur endogenen Synthese von Neu5Gc kommt. Allerdings kann diese de facto nicht humane Sialinsäure über unsere Nahrung aufgenommen und in zelluläre Glykokonjugate inkorporiert werden [Tangvoranuntakul et al., 2003]. Dennoch spielen bei vielen Prozessen gerade die physikochemischen Eigenschaften der Aminoacylgruppe eine zentrale Rolle [Hanai et al., 1988].

Die Sialokonjugate der meisten Zellen tragen in der Regel nur Neu5Ac-Oligomere kurzer ( $\text{Neu5Ac}_2$ ) oder mittlerer Länge ( $\text{Neu5Ac}_{3-7}$ ) [Sato and Kitajima, 2013a]. In einigen Geweben werden allerdings neben den regulären Mono- und Oligosialyltransferasen auch die Sialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV exprimiert. Diese sind imstande an bereits vorhandene terminale  $\alpha$ -2,3- oder  $\alpha$ -2,6-gebundene Sialinsäureeinheiten weitere Neu5Ac-Reste  $\alpha$ -2,8-glykosidisch zu knüpfen [Mühlenhoff et al., 1996], wobei *in vitro*  $\alpha$ -2,3-glykosidische Bindungen als Akzeptor präferiert werden [Angata et al., 1998]. Dadurch entstehen lange polyanionische Sialinsäure-Polymere, die man als Polysialinsäure (PolySia) bezeichnet und die aus über 90 Neu5Ac-Einheiten bestehen können [Nakata and Troy, 2005]. Dabei ist eine konzertierte Aktivität der beiden Polysialyltransferasen notwendig, um eine gewebs-, zell- oder sogar substratspezifische Polysialylierung und

Kettenlänge dieser Polymere zu erzielen [Mühlenhoff et al., 2009].

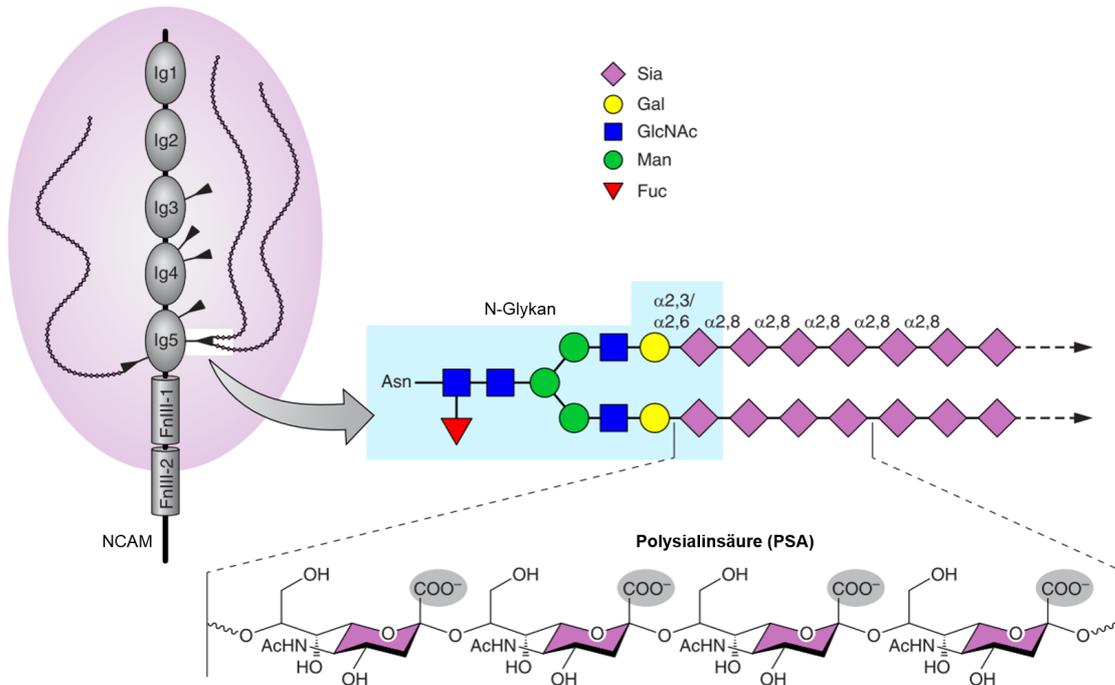
Lange Zeit waren mit NCAM, SynCAM und Neuropilin-2 nur relativ wenige Membranproteine bekannt, deren *N*-Glykane durch die genannten Sialyltransferasen polysialyliert werden können [Mühlenhoff et al., 2013]. Heutzutage konnten mit CD36 in der Muttermilch [Yabe et al., 2003], dem C-C-Chemokin-Rezeptor 7 (CCR7) auf dendritischen Zellen [Kiermaier et al., 2016] sowie der Polysialyltransferase ST8Siall selbst [Simon et al., 2013] weitere PolySia-positive Strukturen identifiziert werden. Die hochspezifische Modifikation mit diesem einzigartigen Polysaccharid ist essenziell für ihre Funktion im Rahmen zellulärer Vorgänge [Gascon et al., 2007].

In unmodifiziertem Zustand vermittelt NCAM eine hoch affine homophile *cis*- oder *trans*-zelluläre Bindung zu anderen NCAM-Molekülen, wodurch sehr enge Zell-Zell-Kontakte entstehen. Darüber hinaus kann NCAM auch heterophile Interaktionen mit anderen Membranständigen Strukturen oder Proteoglykanen der extrazellulären Matrix eingehen. Durch die Polysialylierung werden multiple negative Ladungen in die NCAM-Oberfläche eingeführt. Die hydrodynamisch voluminöse Struktur in Kombination mit der negativen Gesamtladung führen damit zu Abstoßungsprozessen zwischen den PolySia-NCAM-Molekülen, die selbst die adhäsive Wirkung anderer Oberflächenproteine überwinden kann [Johnson et al., 2005]. Damit nimmt NCAM mit seinem dynamischen Glykosylierungsmuster eine wichtige Stellung in der Zellapposition ein. Zudem werden aber auch zahlreiche andere Membraneigenschaften durch das Vorhandensein von Polysialinsäuren in der Glykokalix beeinflusst. So wird beispielsweise die Bindung und damit die Wirkung von bestimmten extrazellulären Transmittermolekülen durch PolySia beeinflusst [Kanato et al., 2008; Ono et al., 2012].

Besonders bedeutsam sind diese Prozesse bei der Embryogenese des Gehirns sowie im adulten Organismus in hochplastischen Hirnarealen mit einer intensiven Neurogenese. Im Laufe der Zeit wurde Polysialinsäure aber auf vielen Zellen im Laufe der Entwicklung identifiziert, sodass heute davon auszugehen ist, dass diesen Strukturen eine zentrale Rolle bei der Organogenese [Lackie et al., 1994; Ong et al., 1998] und bei regenerativen Prozessen [Jungnickel et al., 2009] sowie im Immunsystem [Saffarzadeh et al., 2012] zukommt.

### 1.3 Sialinsäurebiosynthese und -katabolismus

Für die Sialinsäurebiosynthese wird *N*-Acetyl-Mannosamin aus dem Kohlenhydratstoffwechsel bereitgestellt. Dazu wird cytosolische Glucose durch die glykolytischen Enzy-



**Abbildung 1.3: Das neuronale Zell-Adhäsions-Molekül NCAM**

Membranständiges NCAM kann an seinen *N*-Glykanen durch die Sialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV  $\alpha$ -2,8-Polysialyliert werden. Modifiziert nach [Schnaar et al., 2014].

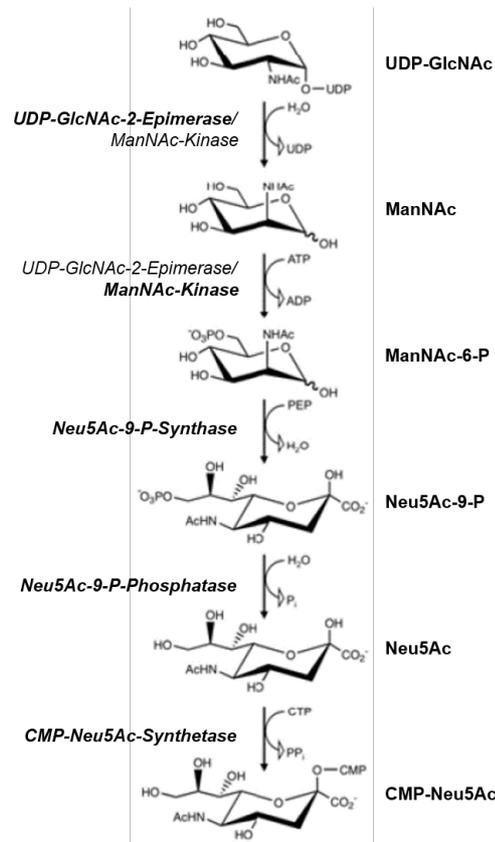
me Hexokinase und Hexosephosphatisomerase zu Fructose-6-Phosphat umgewandelt (Fru-6-P). Fructose-6-Phosphat kann dann durch die GlcN-Fru-6-P-Aminotransferase in Glucosamin-6-Phosphat (GlcN-6-P) überführt und so in den Hexosaminweg eingeschleust werden. Ebenso kann auch Glucosamin (GlcN) durch die GlcN-Kinase zu diesem Intermediat reagieren. Im Rahmen des Hexosaminwegs wird GlcN-6-P nun acetyliert und mit Uridintriphosphat (UTP) zu UDP-GlcNAc aktiviert, das als eigentliches Ausgangssubstrat für die Sialinsäurebiosynthese fungiert. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/Mannosaminkinase (GNE/MNK) spaltet UDP ab, isomerisiert *N*-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc) und phosphoryliert das entstehende ManNAc zu *N*-Acetyl-Mannosamin-6-Phosphat (ManNAc-6-P) [Chou et al., 2003]. Dieses bifunktionale Enzym besitzt zwei katalytische Zentren, wobei die *N*-terminale Domäne die Epimerase-Aktivität aufweist und die *C*-terminale Domäne für die Phosphorylierung von ManNAc verantwortlich ist [Blume et al., 2004]. Zu einem gewissen Anteil kann ManNAc zwar durch die Epimerase-Aktivität in *N*-Acetyl-Glucosamin überführt werden, wodurch diesem Enzym auch eine gewisse Rolle im Sialinsäurekatabolismus zukommt [Luchansky et al., 2003]. Das Gros des *N*-Acetylmannosamins wird allerdings phosphoryliert und zu *N*-Acetyl-Neuraminsäure weiter verstoffwechselt. Interessanterweise unterliegt als Schrittmacherreaktion nur die Epimeraseakti-

vität dieses Enzyms einer koordinierten Regulation [Keppler et al., 1999]. Zum einen unterliegt sie einer Feedback-Inhibition durch CMP-Sia [Kornfeld et al., 1964; Yarema et al., 2001] und zum anderen kann ihre Aktivität durch Proteinkinase-C-abhängige Phosphorylierung gesteigert werden [Horstkorte et al., 2000]. Die Reaktionsgeschwindigkeit der folgenden Enzyme wird also nur über einen veränderten Substratzufluss gesteuert. Das gebildete *N*-Acetyl-Mannosamin-6-P kann von der *N*-Acetyl-Neuramin-Synthase gebunden und mit Phosphoenolpyruvat zu *N*-Acetyl-Neuraminsäure-9-Phosphat umgesetzt werden. Der C<sub>9</sub>-Phosphatrest wiederum wird im Anschluss von der *N*-Acetyl-Neuraminsäure-9-Phosphatase hydrolysiert, um freie Sialinsäure zu generieren. Um freie Monosaccharide auf Glykokonjugate übertragen zu können, müssen sie zunächst durch Reaktion mit Nukleotiden aktiviert werden. Die Aktivierung der Sialinsäuren ist in dieser Hinsicht insofern einzigartig, als sie das einzige Kohlenhydrat ist, das nicht cytosolisch, sondern nukleär aktiviert werden muss. Cytosolische Neu5Ac wird also nukleär importiert und dort durch die CMP-Neu5Ac-Synthetase mit CMP konjugiert, wobei das entstehende Pyrophosphat im Sinne einer energetischen Kopplung zu zwei anorganischen Phosphaten weiter hydrolysiert wird.

CMP-Neu5Ac als Sialinsäurendonor wird über den spezifischen Transporter SLC35A1 im Antiport mit CMP ins *trans*-Golgi-Netzwerk transloziert, wo es als Substrat für die entsprechenden Sialyltransferasen dienen kann. Zum Abbau werden die Sialoglykane endozytiert, sodass sie ins lysosomale Kompartiment gelangen. Dort werden die terminalen Neu5Ac-Reste durch die Neuraminidase NEU1 hydrolytisch abgespalten. Die freigesetzte Sialinsäure wird dann durch den Transporter SLC17A5 wieder ins Cytosol übersetzt. Cytosolische Neu5Ac kann wiederum entweder im Sinne eines „salvage pathway“ wieder nukleär zu CMP-Neu5Ac aktiviert oder aber katabol abgebaut werden. Dazu wird Neu5Ac zunächst durch die korrespondierende Aldolase zu Pyruvat und ManNAc umgesetzt, welches unmittelbar durch die GlcNAc-2-Epimerase in GlcNAc isomerisiert wird. Durch Phosphorylierung an C<sub>6</sub> entsteht schließlich GlcNAc-6-Phosphat als Intermediat des Hexosaminwegs.

#### 1.4 Sialinsäuren im Rahmen der Angiogenese

Eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen machen die Neubildung von Gefäßen notwendig. Eines der wichtigsten Signale dafür ist demgemäß der Sauerstoffpartialdruck im Gewebe. Ein Abfall des pO<sub>2</sub> bewirkt die Ausschüttung des vascular endothelial growth factor (VEGF), einem der wichtigsten physiologischen Stimulato-

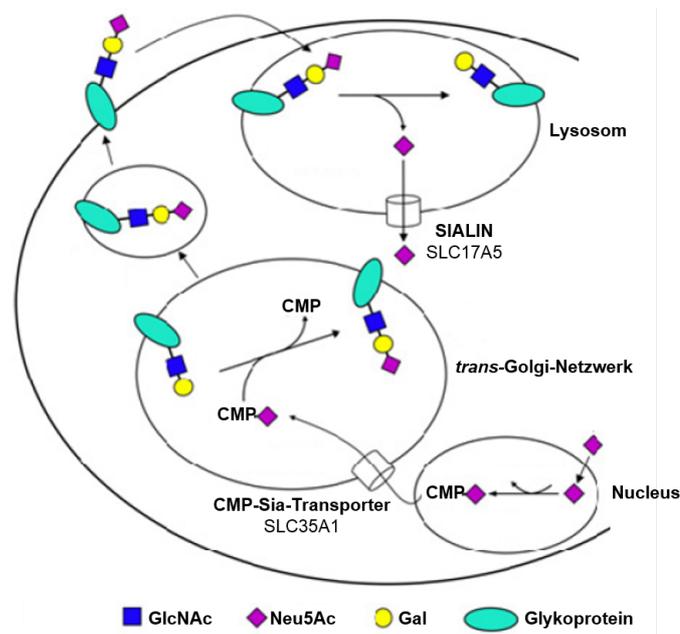


#### Abbildung 1.4: Biosynthese der Sialinsäuren

Anaboler Metabolismus von Sialinsäuren in Vertebraten. Die Reaktionen laufen unter physiologischen Bedingungen unidirektional ab und sind daher nicht als Gleichgewichtsreaktionen gezeigt. Modifiziert nach [Tiralongo and Martinez-Duncker, 2013].

ren der Angiogenese. Auch in der Glykokalix von Endothelzellen sind zahlreiche Sialoproteine wie zum Beispiel NCAM zu finden, die zentral für wichtige endotheliale Funktionen sind. So wird zum Beispiel Rekrutierung von Leukocyten in inflammatorisches Zielgewebe durch die Interaktion zwischen leukozytärem sialyl-Lewis<sup>X</sup> und endothelialen Selektinen eingeleitet [McEver et al., 1995]. Die Endothelaktivierung durch VEGF oder andere proliferative Signalmoleküle führt zu zahlreichen zellulären Veränderungen, wobei vor allem ein alteriertes Oberflächenglykosylierungsmuster bei den Endothelzellen beobachtet werden kann [Willhauck-Fleckenstein et al., 2010].

Einige der Proteine, die durch angioproliferative Reize reguliert werden, sind Sialyltransferasen, welche Neu5Ac-Reste von CMP-Sia auf Glykokonjugate übertragen. So wird beispielsweise die Sialyltransferase ST3Gal1 durch VEGF induziert, während ST6Gal1 reprimiert wird [Willhauck-Fleckenstein et al., 2010]. ST3Gal1 verknüpft Neu5Ac  $\alpha$ -2,3-glykosidisch mit dem Substratdisaccharid  $\text{Gal}\beta$ -1,3-GalNAc, das bevorzugt im Kernligosaccharid in O-Glykanen oder Glykolipiden zu finden ist. ST6Gal1 hingegen über-



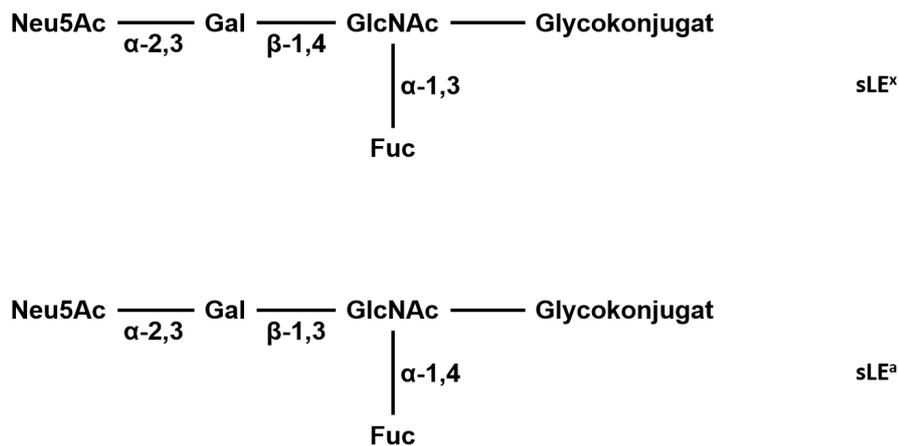
### Abbildung 1.5: Biosynthese und Degradation von Sialokonjugaten

In den Diktyosomen des *trans*-Golgi-Netzwerks werden Glykane von den entsprechenden Sialyltransferasen mit Neu5Ac assoziiert, woraufhin sie über den vesikulären Transport zur Zellmembran gelangen. Die Degradation erfolgt über den Endosom-Endolysosom-Pfad, wobei lysosomale Neu5Ac wieder ins Cytosol geschleust wird. Modifiziert nach [Varki, 2009b].

trägt Neu5Ac  $\alpha$ -2,6-glykosidisch bevorzugt auf Gal $\beta$ -1,4-GlcNAc-Reste in *N*- und *O*-Glykanen oder GalNAc $\beta$ -1,4-GlcNAc-Disaccharide in Lacto-Gangliosiden. Gerade Ganglioside sind wiederholt bezüglich ihrer Rolle im Rahmen der Angiogenese untersucht worden. Einfache monosialylierte Ganglioside wie GM3 reduzieren dabei die Wirkung von stimulatorischen Signalen und hemmen so die Angiogenese. Komplexe Ganglioside wie GD3, die durch die Sialyltransferase ST8Sia1 weiter  $\alpha$ -2,8-sialyliert werden, haben eine gegenteilige Wirkung und führen zu einer vermehrten Gefäßneubildung [Manfredi et al., 1999].

Wichtige Proteine, die durch ST3Gal1 sialyliert werden sind solche, die in ihren Glykanen die Tetrasaccharide der Lewis-Antigene Le<sup>x</sup> oder Le<sup>a</sup> tragen (Abbildung 1.5), sowie das  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrin. Im Rahmen der Angiogenese ist eine Interaktion zwischen diesen Antigenen und ihren korrespondierenden Bindungspartnern E-Selektin und ICAM-1 notwendig.

Auch die Bindung von korrekt glykosyliertem  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrin ist hier beteiligt [Tei et al., 2002], wobei insbesondere eine modulierte Sialylierung von Integrinen deren Eigenschaften massiv verändern kann [Schauer, 2009]. Die Bindung beziehungsweise Aktivierung von Integrinen bewirkt eine Aktivierung der Fokalen-Adhäsions-Kinase (FAK) im Sinne eines outside-in-signalling [Eggers et al., 2011]. Die Signaltransduktion bewirkt mitunter



**Abbildung 1.6: Struktur der sialylierten Lewis-Antigene**

Abgebildet sind die charakteristischen Tetrasaccharide der sialylierten Lewis-Antigene x und a. Die *N*-Acetylneuraminsäuren sind hier jeweils  $\alpha$ -2,3-glykosidisch gebunden.

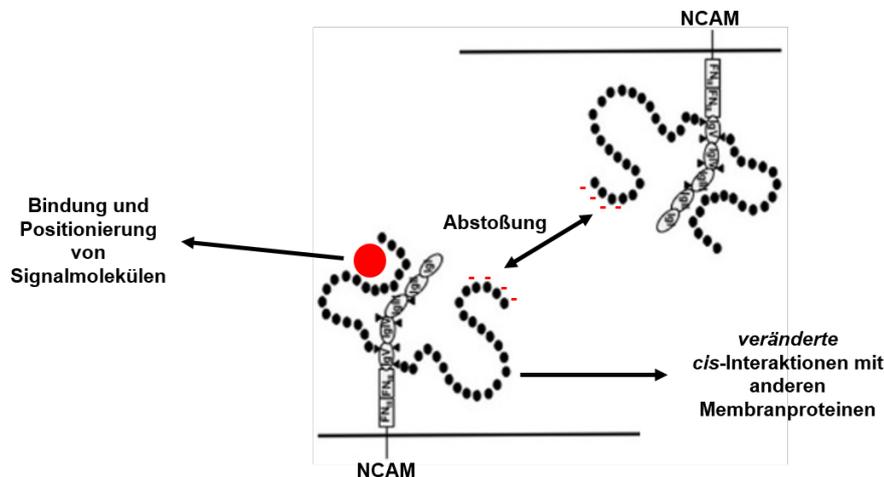
die Aktivierung des monomeren G-Proteins Rho, was wiederum ein Rearrangement des Cytoskeletts zur Folge hat. Die daraus resultierende Zellmotilität ist essenziell für alle zellulären Migrationsprozesse und somit auch für die Angiogenese [Chen et al., 2011].

Darüber hinaus sind Sialoproteine an der Bindung und Ausrichtung von extrazellulären angioproliferativen Signalmolekülen beteiligt. Die *N*-Glykosylierung des FGF-Rezeptors reguliert die Bindung seines Liganden bFGF [Duchesne et al., 2006]. Gerade Sialinsäuren sind hier von besonderer Bedeutung, da es Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen PolySia und bFGF gibt, die Einfluss auf dessen Rezeptorbindung zu nehmen scheint [Ono et al., 2012].

Ein ähnlicher Einfluss auf die Bindungsaffinität von Liganden wurde auch für andere Glykoproteine beschrieben. So unterstützen Neuropilin-1 und Neuropilin-2 auf Endothelzellen die Bindung von VEGF [Soker et al., 1998; Ji et al., 2015] und bFGF [West et al., 2005]. Neuropilin-2 und NCAM sind zwei Moleküle, die von humanen Endothelzellen exprimiert werden und von den Polysialyltransferasen ST8SialI und ST8SialIV als Substrate akzeptiert werden. In HUVECs wird PolySia-NCAM durch die Wirkung von Estradiol induziert [Park et al., 2010]. NCAM:NCAM-Interaktionen führen zur Rekrutierung und Extravasation von zirkulierenden Leukocyten im Rahmen der Artherogenese. Diese Interaktionen können durch Polysialylierung der NCAM-*N*-Glykane und daraus resultierende Abstossungsprozesse inhibiert werden [Park et al., 2010].

Ein weiterer wichtiger Schritt in der Gefäßbildung ist die Lumenformation, also die Separation der zunächst eng ineinander verzahnten Epithelzellen. Alle Sialinsäuren tragen unter physiologischen Bedingungen in deprotonierter Form eine negative Ladung an ih-

rer C<sub>1</sub>-Carboxylgruppe. Durch die Sialylierung der Endothelglykokalix in der Angiogenese wird die apikale Zellmembran der Endothelzellen mit einer großen Menge an negativ geladenen Residuen ausgekleidet, was zu Repulsionsphänomenen zwischen benachbarten Zellen führt. Die Zellen gleiten auseinander, sodass im Zentrum ein Lumen entstehen kann [Strilić et al., 2010].



**Abbildung 1.7: Funktionen von Polysialinsäuren am Beispiel von PolySia-NCAM**

Dargestellt sind die wichtigsten Funktionen von Polysialinsäuren auf der Zelloberfläche. Als Trägerprotein wurde exemplarisch NCAM als quantitativ wichtigstes polysialylierbares Membranprotein gewählt. Die negative Gesamtladung der Neu5Ac-Polymere sowie deren stark hydratisierte voluminöse Struktur verhindern durch Repulsionsphänomene interzelluläre *trans*-Wechselwirkungen. Darüber hinaus kann PolySia bestimmte Transmittermoleküle binden und zu ihren Rezeptoren positionieren. Zuletzt kann das Ausmaß der Polysialylierung *cis*-Interaktionen zwischen Membranproteinen fördern oder hemmen. Modifiziert nach [Sato and Kitajima, 2013b].

## 1.5 Glycoengineering

Im Laufe der 1960er Jahre konnte zunehmend Einblick in die oben beschriebene Biosynthese von Sialinsäuren gewonnen werden [Comb, 1960]. Zwanzig Jahre später stellte man fest, dass die Enzyme dieses Stoffwechselweges im Gegensatz zu anderen eine sehr große Substratpermissivität aufweisen [Gross and Brossmer, 1988], ein Ansatz der insbesondere von der Arbeitsgruppe um Werner Reutter näher charakterisiert werden konnte. Die Glykosylierungsmuster der Zelloberflächen sind von einer ungewöhnlich großen Diversität geprägt. Jeder einzelne Monosaccharidbaustein kann in alpha- oder in beta-anomerer Konfiguration vorliegen und die glykosidischen Bindungen können theoretisch an jeder Hydroxylgruppe der einzelnen Zuckermoleküle geknüpft werden. Kombinatorisch übersteigt die Vielfalt der Glykane damit diejenige der Proteine um ein Vielfaches.

Während darüber hinaus im Bereich der Genomics und Proteomics eine lineare Codierung vorliegt, die über verschiedene Techniken eine gezielte Manipulation von bestimmten Genen oder Proteinen gestattet, fehlen entsprechende Möglichkeiten im Bereich der Glykobiologie, trotz zum Teil hochkonservierter Strukturen in den Glykokonjugaten. So sind spezifische Oligo- und Polysaccharide lange Zeit refraktär für experimentelle Interventionen geblieben.

Monosaccharideinheiten sind in ihrer Konformation allerdings sehr empfindlich gegenüber kleinsten Veränderungen in ihrer chemischen Struktur. Die Promiskuität der Neu5Ac-synthetisierenden Enzyme gestattet nun das Einschleusen von chemisch modifizierten Vorläufermolekülen in die Sialinsäurebiosynthese und damit die Inkorporation von Sialinsäuren mit veränderten physikochemischen Eigenschaften in Glykoproteine und Glykolipide. Über die Veränderung ihrer Eigenschaften können dann im zweiten Schritt Rückschlüsse auf die Funktion der Sialinsäuren gezogen werden. Je nachdem, welche funktionellen Gruppen die generierten Sialinsäuren exponieren oder welche Position des Moleküls diese Veränderung trägt, kann auch ein Urteil darüber gefällt werden, über welches Kohlenstoff-Atom oder welche chemische Eigenschaft eine entsprechende Funktion vermittelt wird.

Betrachtet man den Weg der Neu5Ac-Synthese wie oben dargestellt, so gibt es verschiedene Punkte, an denen alterierte Vorläufer-Moleküle eingeführt werden können. Die ersten Versuche, artifizielle Sialinsäuren in zelluläre Glykokonjugate zu integrieren, konzentrierten sich auf CMP-Sia als Träger fluorophorer Gruppen [Gross and Brossmer, 1988]. Aufgrund der CMP-Gruppe ist dieses Molekül allerdings geladen und damit hochpolar, sodass es nicht zu einer Aufnahme in Zellen mit intakter Zellmembran kommt. Weil es zur Inkorporation in Glykane notwendig ist, die CMP-Neu5Ac-Analoga als Substrate für die Sialyltransferasen des Golgiapparates bereitzustellen, ist es überdies notwendig, noch eine weitere Membran zu überschreiten. Eine veränderte Sialylierung mit CMP-Neu5Ac-Analoga ist daher nur in semi-permeabilisierten Zellen möglich und kommt damit per se als Ansatz für *in vivo*-Experimente nicht in Frage. Darüber hinaus ist die chemische Modifikation von CMP-Sia sehr anspruchsvoll und bis heute nicht hinreichend standardisiert. Das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese, die UDP-N-Acetyl-Glucosamin-2-Epimerase, weist eine hohe Substratspezifität für N-Acetyl-Glucosamin auf. Jegliche O- oder N-Modifikation an dem physiologischen Substratmolekül führt dazu, dass diese Substanzen durch die Epimerase nicht gebunden werden können, sodass sie nicht in die weitere Synthese der Sialinsäuren gelangen [Du et al., 2009]. Artifizielle Glucosaminderivate füh-

ren damit nicht zu einer veränderten Sialylierung der Zielzellen.

*N*-Acetyl-Mannosamin ist der gemeinsame Vorläufer aller Sialinsäuren und erfüllt im zellulären Metabolismus eigentlich keine andere Funktion als in diesem Stoffwechselweg umgesetzt zu werden. Bereits in den 90er Jahren wurde beschrieben, dass ManN-Derivate mit elongierten Aminoacylketten bei minimaler Cytotoxizität von Zellen zu ihren korrespondierenden *N*-Acyl-Neuraminsäuren umgesetzt werden, die ihrerseits in Oberflächenglykane inkorporiert werden können [Kayser et al., 1992, 1993; Keppler et al., 1998, 2001; Kim et al., 2004b; Natunen et al., 2013; Pon et al., 2007].

Darüber hinaus wird die Zellsialylierung vor allem über eine allosterische Feedbackhemmung der UDP-*N*-Acetyl-Glucosamin-2-Epimerase als Schlüsselenzym durch CMP-Neu5Ac reguliert [Hinderlich et al., 2013]. *N*-Acyl-Mannosaminderivate umgehen diesen zentralen Kontrollpunkt, sodass die Menge an artifiziellen Sialinsäuren proportional zur applizierten *N*-Acyl-Mannosamin-Konzentration ist [Galuska et al., 2010].

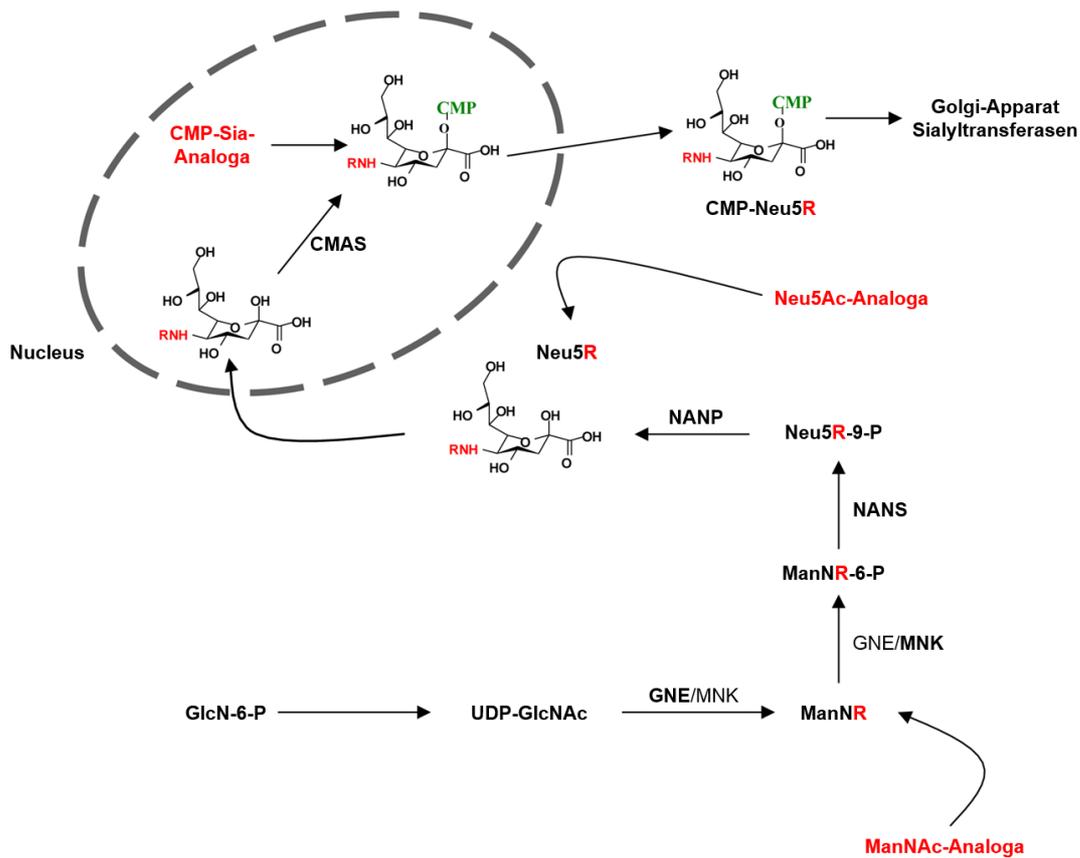
Die chemischen ManN-Modifikationen, welche von der zellulären Enzymmaschinerie akzeptiert werden, haben jedoch auch ihre Restriktionen. So zeigt sich bei verzweigten Seitenketten oder organischen Resten von mehr als 5 Methylengruppen eine deutlich reduzierte Umsetzung und Inkorporation [Kim et al., 2004b]. Die Limitationen werden hierbei vor allem durch das Enzym der Neu5Ac-9-Phosphat-Synthase gesetzt [Jacobs et al., 2001]. Dieses Enzym akzeptiert bereitwillig Modifikationen von maximal drei zusätzlichen Methylengruppen beziehungsweise Gruppen, die eine ähnliche räumliche Ausdehnung aufweisen, während größere Gruppen langsamer oder gar nicht mehr umgesetzt werden können [Viswanathan et al., 2003]. Darüber hinaus ist die Reaktion mit Phosphoenolpyruvat hochsensibel für Substitutionen am C<sub>6</sub>-Atom, weil hier die kovalente Bindung zum ManNAc-Ring geknüpft wird. Damit sinkt die Effizienz der Synthese artifizieller Sialinsäuren auf nahezu Null bei C<sub>6</sub>-Modifikationen [Lawrence et al., 2000; Tanner, 2005].

Unabhängig von der Veränderung, welche die Mannosamin-Moleküle tragen, kommt es unter physiologischen Bedingungen oder in der Zellkultur zu Kompetitionsphänomenen, weil ManNAc und seine Analoga um dieselben Enzymbindungen konkurrieren. Entsprechend hoch ist die Inkorporation artifizieller Sialinsäuren unter unphysiologischem Ausschluss von physiologischen Substraten [Mantey et al., 2001]. Ohne diese Manipulation ist der Austausch der physiologischen Neu5Ac hochvariabel und gewebeabhängig [Gagiannis et al., 2007]. ManNAc-Derivate als artifizielle Vorläufermoleküle werden wegen ihrer Polarität allerdings nur zu einem geringen Teil in vitale Zellen mit intakter Zellmembran aufgenommen [Jones et al., 2004]. Eine Strategie, um höhere cytosolische Kon-

zentrationen der ManNR-Derivate und damit eine effektivere Konkurrenz zu erzielen, ist die Konjugation der Hydroxylreste mit kurzkettigen Fettsäuren (SCFA, short chain fatty acids). Durch Peracetylierung kann die zelluläre Aufnahme um den Faktor 600 gesteigert werden, durch Perbutylierung sogar um den Faktor 2100 [Kim et al., 2004b]. Bei Perbutylierung entsteht allerdings cytosolisches n-Butyrat, das als Histon-Deacetylase-Inhibitor wirken und so zelluläre Nebenwirkungen haben kann [Sampathkumar et al., 2006a; Zimmerman et al., 2012]. Bei noch längeren *O*-Acylyresten kann zwar eine noch höhere Aufnahme erreicht werden, jedoch kommt es hier rasch zu cytotoxischen Phänomenen [Jones et al., 2004; Kim et al., 2004a]. Trotz dieser Einschränkungen ist gerade Mannosamin im Fokus des Sialoengineering geblieben. Zahlreiche elaborierte Modifikationen sind inzwischen beschrieben. Sogar die Inkorporation zusätzlicher funktioneller Gruppen wie Ketone [Mahal et al., 1997], Alkohole [Collins et al., 2000], Thiole [Sampathkumar et al., 2006b] und Azide [Saxon and Bertozzi, 2000] bis hin zu photoaktivierbaren Resten [Han et al., 2005] in Oberflächensialinsäuren ist über Mannosamin-Derivate heutzutage möglich.

Im Gegensatz zu chemisch alteriertem ManNAc unterliegen artifizielle Neu5Ac-Analoga nicht den Restriktionen der Neu5Ac-9-Phosphat-Synthase, weil hier der C<sub>9</sub>-Körper schon vollständig synthetisiert ist. Die Synthesemaschinerie muss nicht mehr durchlaufen werden und die künstlichen Neuraminsäuren müssen nur noch von der CMP-Neu5Ac-Synthetase sowie von den entsprechenden Sialyltransferasen als Substrat akzeptiert werden. Gerade die Flaschenhals-Reaktionen der Neu5Ac-9-Phosphat-Synthase und der Neu5Ac-9-Phosphat-Phosphatase, die je nach chemischer Modifikation in ihrer Reaktionsgeschwindigkeit eingeschränkt werden, können so umgangen werden [Maliekal et al., 2006]. Außerdem ist es hier auch möglich, Modifikationen am C<sub>9</sub>-Atom einzufügen, was besonders für die Bindung bestimmter Siglecs von großem Interesse ist [Varki and Angata, 2006]. Die Modifikation von Neu oder Neu5Ac ist entschieden einfacher umzusetzen als die Synthese von CMP-Sia-Analoga und darüber hinaus sind Neuraminsäure-Derivate ohne CMP-Konjugation deutlich unpolarer, sodass auch eine Aufnahme in Zellen mit intakter Zellmembran erfolgen kann [Oetke et al., 2001; Bardor et al., 2005].

Das Feld des Glycoengineering ist allerdings nicht mehr nur von Interesse für *in vitro*-Experimente. Es gibt zahlreiche Hinweise, dass auch die diätetische Aufnahme von physiologischen [Wang et al., 2003] und nicht physiologischen Sialinsäuren [Tangvoranuntakul et al., 2003; Bardor et al., 2005] Einfluss auf die Sialylierung im menschlichen



**Abbildung 1.8: Einschleusung artifizierender Vorläufer in die Sialinsäurebiosynthese**

Zu erkennen sind die drei im Text geschilderten Möglichkeiten, chemisch modifizierte Vorläufermoleküle in den Sialinsäurestoffwechsel einzubringen. Des Weiteren sind die beteiligten Enzyme aufgeführt, von denen die alterierten Substrate akzeptiert werden müssen [Bayer et al., 2013]. (GNE/MNK: UDP-*N*-Acetyl-Glucosamin-2-Epimerase/*N*-Acetyl-Mannosamin-Kinase; NANS: *N*-Acetyl-Neuraminsäure-Synthase; NANP: *N*-Acetyl-Neuraminsäure-9-Phosphat-Phosphatase; CMAS: CMP-*N*-Acetyl-Neuraminsäure-Synthetase)

Organismus nimmt. Dabei muss jedoch einschränkend erwähnt werden, dass inkorporierte künstliche Sialinsäuren *in vivo* potenziell immunogen sein können [Häyrynen et al., 1995; Taylor et al., 2010; Samraj et al., 2015].

## Kapitel 2

### Hintergrund und Zielsetzung

Bei dem von Keppler et al. beschriebenen Protokoll für die Synthese von *N*-Acyl-Mannosamin-Abkömmlingen erfolgte die Modifikation der Aminogruppe durch Inkubation mit den entsprechenden Carbonsäureanhydriden bei 0°C unter basischen Bedingungen [Keppler et al., 1995]. Das hochgradig basische Milieu dieser Methode hemmt allerdings die Reaktion der stark elektrophilen Säureanhydride mit Hydroxyl- und Aminogruppen gleichermaßen. Die Konsequenz ist eine verhältnismäßig schlechte Reaktionsausbeute. Die Produktlösung enthält *N*-Acyl-Mannosamin-Moleküle, die in unterschiedlichem Maße *O*-acyliert sind. Somit erfordert das Protokoll eine abschließende Aufreinigung der Probe. Im Rahmen dieser Arbeit war es das Ziel, ein standardisiertes und verbessertes Protokoll zu etablieren, das eine höhere Ausbeute aufweist, keinen zusätzlichen Reinigungsschritt erfordert und zudem peracetylierte ManNR-Derivate liefert, die leichter Zellmembranen permeieren können.

Es gibt verschiedene Ansätze, artifizielle Vorläufermoleküle in die Sialinsäurebiosynthese einzuschleusen und so die Sialylierung von Zielzellen zu modulieren. *N*-Acetyl-Mannosamin als der gemeinsame Vorläufer aller Sialinsäuren ist unter normalen Bedingungen sehr stabil und kann daher leicht chemisch modifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit galt es, nachzuweisen, dass auch die peracetylierten *N*-Acyl-Mannosamin-Derivate von verschiedenen Zelllinien aufgenommen und in die Sialinsäurebiosynthese eingeschleust sowie auch in entsprechende Glykoproteine inkorporiert werden können. Für das Zellkulturmodell wurden HUVECs, A549- und Caco-2-Zellen gewählt, die bisher nicht mit modifizierten Sialinsäurevorläufern behandelt worden sind.

Um zu determinieren, welche chemischen Eigenschaften der Sialinsäuren beziehungsweise der Sialokonjugate die genannten Funktionen vermitteln, wurden HUVECs zunächst wie vorbeschrieben zu Sphäroiden kultiviert [Korff and Augustin, 1998] und anschließend dreidimensionalen Angiogenese-Assays [Montesano et al., 1987] unterzogen. Um dabei gezielt eine Modifikation der Oberflächensialylierung zu erreichen, wurden die Zellen mit *O*-peracetylierten ManNAc-Derivaten inkubiert.

## Kapitel 3

### Material und Methoden

#### 3.1 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Zellkulturzusätze

##### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Mikrotiterplatten	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Petrischalen	Greiner (Kremsmünster, Österreich)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Polypropylenröhrchen (10 ml, 15 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Vase-Vials (1,5 ml, Glas)	Glastechnik Gräfenroda GmbH (Gräfenroda, Deutschland)

##### 3.1.2 Chemikalien

Die Monosaccharidstandards ManN, Neu5Ac, Neu5Gc und KDN wurden in analytischer Qualität von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Das im Rahmen der Reaktionen verwendete Wasser wurde zunächst durch eine Elix-UV5-Anlage vorgereinigt und im Anschluss mit einem „MiliQ Ultra-pure water System“ entsalzt und zu analytischer Qualität aufgereinigt.

##### 3.1.3 Nährmedien und Zellkulturzusätze

Alle Nährmedien, Seren und Zellkulturzusätze wurden, sofern nicht anders angegeben, in höchster Qualität von der Firma PAA Laboratories GmbH (Marburg, Deutschland) bezogen.

## 3.2 Synthese von peracylierten *N*-Acyl-Monosacchariden

### 3.2.1 Synthese von 1,3,4,6-*O*-Ac<sub>4</sub>-2-*N*-Acyl-ManN

250 µg Mannosamin-Hydrochlorid wurden in 100 µl Pyridin gelöst und nach Zugabe von 300 µl des entsprechenden Carbonsäureanhydrids - Essigsäureanhydrid für die Synthese von ManNAc, Propionsäureanhydrid für die Synthese von ManNProp beziehungsweise Buttersäureanhydrid für die Synthese von ManNBut - über Nacht bei 37°C inkubiert und am Folgetag unter Stickstoffstrom getrocknet. Um eine erfolgreiche Peracylierung zu verifizieren, wurden nach diesem Schritt jeweils GC- und GC-MS-Analysen durchgeführt. Die hierbei aufgezeichneten GC-Profile von 1,3,4,6-*O*-Ac<sub>4</sub>-2-*N*-Ac-ManN, 1,3,4,6-*O*-Prop<sub>4</sub>-2-*N*-Prop-ManN und 1,3,4,6-*O*-But<sub>4</sub>-2-*N*-But-ManN dienen als interner Standard, um im weiteren Verlauf das Ausmaß der Dealkylierung zu beurteilen. Im Anschluss wurden die Proben zur *O*-spezifischen Deacylierung in 500 µl 0,01 M Natronlauge aufgenommen und für 2 Stunden bei 0°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Ansätze in flüssigem Stickstoff gefroren und über Nacht lyophilisiert. Die abschließende Peracetylierung der freigesetzten Hydroxylgruppen wurde durch Behandlung der Proben mit 100 µl Pyridin und 300 µl Essigsäureanhydrid über Nacht bei Raumtemperatur erreicht.

Als Standards wurden ManNAc, ManNProp und ManNBut nach dem vorbeschriebenen Protokoll synthetisiert. 10 mM D-Mannosamin in 30 ml Methanol wurde mit NaOMe/Methanol (11 mM) und den korrespondierenden Carbonsäureanhydriden (12 mM) versetzt und bei 0°C für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Vakuumverdampfer getrocknet. Die erhaltenen Rohprodukte wurden via HPLC mit einer Silica-Gel 60 (Merck, Deutschland) als Säule und einem Elutionsgradienten von Essigsäureethylester : Methanol : H<sub>2</sub>O = 5 : 2 : 1 bis Essigsäure-ethylester : Methanol : H<sub>2</sub>O = 10 : 2 : 1 aufgereinigt. Die so hergestellten *N*-Acyl-ManN-Derivate wurden schließlich durch Inkubation mit 100 µl Pyridin und 300 µl Essigsäureanhydrid bei 37°C über Nacht inkubiert um *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc, *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp und *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut zu erhalten.

### 3.2.2 Synthese von 1,3,4,6-*O*-Ac<sub>4</sub>-2-*N*-Acyl-GlcN

*O*-Ac<sub>4</sub>-GlcNAc, *O*-Ac<sub>4</sub>-GlcNProp und *O*-Ac<sub>4</sub>-GlcNBut wurden nach demselben Protokoll unter Verwendung von D-Glucosamin-Hydrochlorid als Ausgangssubstanz synthetisiert. Die zugehörigen Gaschromatogramme dienen als interner Standard, um eventuell aufgetretene Epimerisierungsphänomene zu detektieren und zu quantifizieren.

### **3.3 Mikroanalytische Methoden**

#### **3.3.1 HPLC**

Die Proben wurden mittels einer Superspher 250-4 C-18 Säule (250 mm × 40 mm, Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany) bei 40°C durch ein Knauer HPLC-System getrennt. Für die Analyse wurden als mobile Phasen M1 (H<sub>2</sub>O + 0,1 % TFA) und M2 (AcN : MeOH : H<sub>2</sub>O : TFA = 45 : 45 : 10 : 0,1 (v/v/v)) gewählt. Die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 215 nm. Für die Separation bei einer Flussrate von 1 ml/min über einen linearen Gradienten:  $t_{0 \text{ min}} = 10 \% \text{ M2}$ ,  $t_{40 \text{ min}} = 100 \% \text{ M2}$ . Gewaschen wurde mit 100% M2 ( $t_{45 \text{ min}} = 100 \% \text{ M2}$ ). Die Daten wurden mit EuroChrom (Knauer) prozessiert und analysiert.

#### **3.3.2 GC**

Die Auftrennung erfolgte auf einer 60 m RTx 5MS Säule (0,25 mm × 0,25 µm, Restek GmbH, Bad Homburg Germany) mit einem Varian Star 3400 Gaschromatographen (Agilent, Santa Clara, California). Die Proben wurden bei einer Injektionstemperatur von 270°C manuell aufgebracht. Bei einer initialen Säulentemperatur von 130°C für 5 Minuten wurde die Säule mit einem Gradienten von 5°C/min bis zu einer Maximaltemperatur von 290°C aufgeheizt. Diese wurde für 10 Minuten gehalten, bevor die Säule wieder abgekühlt wurde. Mit einem Flammenionisationsdetektor bei einer Temperatur von 300°C erfolgte die Detektion. Als Trägergas diente Helium 5.6. Die Daten wurden mit EuroChrom (Knauer) prozessiert und analysiert. Um die Reliabilität der GC-Analysen zu steigern, wurden die Proben bei jedem Durchlauf zusätzlich unter Verwendung einer 30 m RTx 200MS Säule untersucht.

#### **3.3.3 GC-MS**

Die GC-MS(/MS)-Analysen wurden mit einem Polaris Q-Gerät (Thermo Scientific, Dreieich, Germany) durchgeführt. Dazu erfolgte eine Auftrennung der Proben auf einer 60 m VF 5MS Säule (Agilent, Santa Clara, California) mit folgendem Gradienten:  $t_{0 \text{ min}} = 50^\circ\text{C}$ ,  $t_{1,88 \text{ min}} = 50^\circ\text{C}$ ,  $t_{4,63 \text{ min}} = 160^\circ\text{C}$ ,  $t_{28,63 \text{ min}} = 280^\circ\text{C}$ ,  $t_{30 \text{ min}} = 280^\circ\text{C}$ . Als Trägergas diente Helium 5.6. Für die Datenverarbeitung und -analyse wurde als Software Xcalibur (Thermo Scientific) verwendet.

### **3.3.4 nanoLC-ESI-MS(/MS)**

Von den zu analysierenden Proben wurden jeweils 10 µl mittels einer RP-Säule (Pep-Map, 3 µm spheres 75 µm × 100 mm, LC Packings, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) getrennt. Die mobilen Phasen M1 (AcN : H<sub>2</sub>O : Formylsäure = 8 : 92 : 0,1(v/v/v)) und M2 (AcN : H<sub>2</sub>O : Formylsäure = 90 : 10 : 0,1(v/v/v)) wurden für die Separation mit einer Flussrate von 0,3 µl/min und einem linearen Gradienten von 0 % M2 bei t = 0 bis 20 % M2 bei t = 30 min eingesetzt. Das Ultimate nanoLC System (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) wurde direkt mit einem Esquire 3000 ESI-ion trap-MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) gekoppelt. Das Gerät arbeitete bei einer kapillären Austrittsspannung von 140 V, einer ESI-Spannung von 1,4 kV, einer Kapillartemperatur von 250°C sowie einer Endplattenspannung von -500 V. Die registrierten spektrometrischen Informationen wurden mit DataAnalyses (Bruker Daltonics) als Software verarbeitet und ausgewertet. Von ausgewählten Ausgangsionen konnten via MS/MS-Analysen weitere Fragmentationsspektren gewonnen werden.

## **3.4 Zellbiologische Methoden**

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden in einer sterilen Arbeitsweise durchgeführt. Die verwendeten Lösungen und Verbrauchsmaterialien wurden entweder durch die Hersteller mittels ionisierender Strahlung sterilisiert, mit sterilen Membranfiltern (Porengröße 0,2 µm; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) filtriert, bei 500°C im Glühofen behandelt oder autoklaviert. Als Sicherheitswerkbank diente eine Klasse 2 Werkbank der Firma Nunc (Langenselbold, Deutschland).

### **3.4.1 Kultur von A549-Lungenepithelzellen**

Die Zelllinie A549 ist eine humane Lungenadenokarzinomzelllinie. Die Kultivierung erfolgte in Earls Minimal Essential Medium, dem L-Glutamin, 10 % fetales Kälberserum (FCS, fetal calf serum) und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden, im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> (Brutschrank: Binder, Tuttlingen, Deutschland).

Sobald die Zellen eine adhärenente Monolayerkultur gebildet hatten, wurden die Zellen wie folgt passagiert:

Das Kulturmedium wurde verworfen und die konfluente Zellkulturschale wurde daraufhin mit erwärmtem Dulbeccos PBS gewaschen. Um sowohl Zell-Matrix- als auch Zell-Zell-Verbindungen zu degradieren, wurden die Zellen mit 2-4 ml/ 75 cm<sup>2</sup> einer Trypsin/EDTA-

Lösung (0,5 mg/ml Trypsin, 0,22 mg/ml EDTA in PBS gelöst) für 1-3 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach vollständiger Ablösung aller Zellen - die Kontrolle erfolgte mikroskopisch - wurden 4-8 ml Vollmedium addiert, um die enzymatische Behandlung zu stoppen. Die so erhaltene Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon überführt und für 10 Minuten bei 1000 × g zentrifugiert, woraufhin das entstandene Zellpellet in 1 ml frischem Vollmedium aufgenommen und homogenisiert wurde. Die Suspension wurde mit frischem Vollmedium auf 10 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und die Zellen schließlich 1:10 oder 1:20 in frische Kulturschalen ausgesät.

### **3.4.2 Isolation und Kultur von HUVECs**

„Human umbilical vein endothelial cells“ (HUVECs) wurden nach dem Protokoll von Jaffe et al. isoliert [Jaffe et al., 1973]. Dazu wurden die Nabelschnurproben kurz nach der Geburt von der Plazenta getrennt und bis zur Überführung ins Labor bei 4°C gekühlt. Unter sterilen Bedingungen wurde die Nabelschnur inspiziert, woraufhin alle artifiziell veränderten Bereiche reseziert wurden. Die Umbilicalvene wurde mit einer 14-gauge-Nadel kanüliert. Die Fixation erfolgte durch Ligation. Daraufhin erfolgte eine Spülung der Vene mit Pufferlösung (0,14 M NaCl, 0,04 M KCl, 0,001 M Phosphat, 0,011 M Glucose, pH 7,4), um noch vorhandenes Restblut auszuwaschen. Danach wurde auch das andere Ende der Umbilicalvene kanüliert. Um die primären Endothelzellen aus Ihren Zell-Matrix-Kontakten zu lösen, wurde die Vene mit 0,2 % Kollagenase in Pufferlösung infundiert. Beide Enden der Vene wurden abgeklemmt und die Nabelschnur en bloc für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Kollagenaselösung mit 30 ml Pufferlösung herausgewaschen. Das Eluat wurde in 50 ml-Falcons gesammelt, die 10 ml Medium mit 20 % FCS enthielten, um die enzymatische Reaktion zu stoppen. Nach Zentrifugation bei 250 × g für 10 Minuten wurde der zellfreie Überstand verworfen und das gewonnene Zellpellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und gleichmäßig auf 4 - 6 Kulturschalen ausgesät. Die Passage der Zellen erfolgte nach derselben Vorgehensweise wie die Passage der A549-Lungenepithelzellen. Die Zellen wurden in Endothelial Cell Growth Medium (ECGM, Promocell, Heidelberg, Deutschland) mit 10 % FCS (fetal calf serum, Thermo Fischer Scientific, Bonn, Deutschland) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert (Brutschrank: Binder, Tuttlingen, Deutschland).

### **3.4.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen**

Bei Temperaturen unterhalb von  $-130^{\circ}\text{C}$  können nahezu keine biochemischen Reaktionen ablaufen. In flüssigem Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) beziehungsweise der darüber entstehenden Gasphase ( $-150^{\circ}\text{C}$  bis  $-160^{\circ}\text{C}$ ) können Zellen und Gewebekulturen infolgedessen gut geschützt und beinahe unbegrenzt gelagert werden, weil Kontaminationen, Genetic Drifts, Seneszenz und andere Phänomene nicht stattfinden können. Die ausgewählten Kulturen befanden sich in der späten log-Phase, also kurz vor der Konfluenz. Die Zellen wurden zunächst wie zuvor beschrieben mittels Trypsin/EDTA gelöst und zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in  $500\ \mu\text{l}$  gekühltem, sterilfiltriertem, FCS-reichem Medium (60 % serumfreies Medium, 40 % FCS) aufgenommen, resuspendiert und in einem Einfrierröhrchen vorgelegt. Damit es nicht zu zellschädigenden Präzipitaten innerhalb und außerhalb der Zellen kommt, mussten die Zellen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt werden, das Wasser bindet und aus den Zellen verdrängt. Dazu wurde  $500\ \mu\text{l}$  gekühltes sterilfiltriertes DMSO-haltiges Medium (80 % serumfreies Medium, 20 % DMSO) hinzugefügt. Zur Vorbereitung auf die Stickstofflagerung wurden die Suspensionen für 2 - 4 Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  über Nacht gelagert. Daraufhin erfolgte die Überführung in den Stickstofftank ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

Zum Auftauen und Rekultivieren gelagerter Zellen wurden die Einfrierröhrchen aus dem Tank entnommen und im auf  $37^{\circ}\text{C}$  vorgeheizten Wasserbad erwärmt. Daraufhin wurden den Suspensionen jeweils 9 ml vorgewärmtes Medium hinzugefügt. Nach Zentrifugation wurde der DMSO-haltige Überstand verworfen, während das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine  $75\ \text{cm}^2$ -Kulturschale ausgesät wurde. Um eventuelle Zellschäden durch das toxische DMSO zu vermeiden wurden die Schritte möglichst zügig durchgeführt.

### **3.4.4 Zellzählung mittels Neubauerkammer und Trypanblaufärbung**

Die Zellen wurden wie beschrieben mit Trypsin/EDTA von der Oberfläche gelöst und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einem Gesamtvolumen von 10 ml resuspendiert. Ein Teil der so erhaltenen Zellsuspension wurde je nach zuvor geschätzter Zelldichte 1 : 2 - 1 : 4 mit Trypanblau verdünnt. Dieser anionische Farbstoff bindet leicht cytosolische Proteine. Bei vitalen Zellen ist die Zellmembran intakt, sodass Trypanblau nicht ins Cytosol gelangen kann, während bei avitalen Zellen die negative Ladungsdichte auf der Zelloberfläche verloren gegangen ist. Der Farbstoff kann so ungehindert in abgestorbene Zellen eindringen, wodurch eine mikroskopische Zählung vitaler und avitaler Zellen möglich ist.

Die gefärbte Suspension wurde in eine Neubauer-Kammer zur Zellzählung pipettiert. Das Zählgitter bestand aus 3 x 3 Großquadranten mit einer Fläche von jeweils 1 mm<sup>2</sup>. Die vitalen, ungefärbten Zellen in den vier Eckquadranten wurden ausgezählt, sodass sich die Gesamtzellzahl nach folgenden Gleichungen berechnen ließ:

$$\text{Mittelwert}(Zellzahl/Quadrat) = \frac{\sum_{i=1}^4 n_i}{4} * \text{Verdünnung} = \text{Zellzahl}/\text{mm}^3$$

$$\text{Mittelwert}(Zellzahl/Quadrat) * 10^4 = \text{Zellzahl}/\text{ml}$$

$$\text{Zellzahl}/\text{ml} * \text{Gesamtvolumen}[\text{ml}] = \text{Gesamtzellzahl}$$

mit  $n_i$  = Zellzahl in Quadrat i

Sofern für die Versuche eine definierte Zellzahl benötigt wurde, wurde anhand der Gesamtzellzahl in 10 ml das zu verwendende Volumen des Homogenisats berechnet, das dann in den Versuchsplatten ausgesät wurde. Für Vitalitätsprüfungen wurden auch gefärbte avitale Zellen mitgezählt. Der relative Anteil intakter Zellen wurde dann nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{VitaleZellen}[\%] = \frac{n(\text{ungefärbteZellen})}{n(\text{gefärbteZellen}) + n(\text{ungefärbteZellen})}$$

### 3.4.5 Inkubation mit verschiedenen peracetylierten ManNAc-Analoga

Für die Inkubation von A549-Zellen und HUVECs mit den unterschiedlichen Substanzen, wurden zunächst die synthetisierten ManNAc-Analoga in Ethanol gelöst und in die noch leeren Vertiefungen pipetiert. Die Menge wurde dabei so gewählt, dass nach Aussaat der Zellen und Zugabe des Mediums eine Gesamtkonzentration von 50 µM im Medium erreicht wurde. Für die Cytotoxizitätsbestimmung wurde eine Konzentration von 100 µM gewählt. Die Platten wurden unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur belassen, bis das Ethanol verdampft war. Erst dann wurden jeweils  $3 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung in einer 6-Well-Platte beziehungsweise  $5 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung in einer 12-Well-Platte mit regulärem Kulturmedium ausgesät. Die Zellen wurden dann für 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank (Binder, Tuttlingen, Deutschland) inkubiert. Pro Substanzinkubation wurde zusätzlich je eine Kontrollzellpopulation in unverändertem Vollmedium kultiviert. Die Kultivierung und Substanzinkubation von Caco-2-Zellen wurde freundlicher-

weise von der Arbeitsgruppe Prof. Silvia Rudloff aus dem Institut für Ernährungswissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

### 3.4.6 Cytotoxizitätsmessung

Beim Absterben einer Zelle kommt es zum Verlust der Zellmembranintegrität. Infolgedessen gelangen Proteine in den Kulturüberstand, die unter physiologischen Bedingungen cytosolisch lokalisiert sind. Eines dieser Proteine ist die Laktatdehydrogenase (LDH), ein ubiquitär exprimiertes, stabiles, cytoplasmatisches Enzym.

Die Firma Roche bietet ein Kit zur routinemäßigen Cytotoxizitätsmessung anhand der LDH-Aktivität im Kulturüberstand an (Cytotoxicity Detection Kit (LDH)), das für die durchgeführten Messungen eingesetzt wurde. Dabei handelt es sich um eine zweischrittige enzymatische Reaktion. Im ersten Schritt wird Laktat durch die freigesetzte Laktatdehydrogenase in Pyruvat überführt, wobei  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  reduziert wird. Im zweiten Schritt wird Iodonitrotetrazoliumchlorid durch die Diaphorase NADH-abhängig zu einem Formazansalz reduziert, was einen Farbumschlag von Gelb zu Rot zur Folge hat, der in einem ELISA-Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden kann. Für die Reaktion wurde eine Arbeitslösung (250  $\mu\text{l}$  L1 + 25 ml L2) aus den beiden *Kit*-Lösungen L1 (Diaphorase/ $\text{NAD}^+$ , Katalysator) und L2 (Iodonitrotetrazoliumchlorid/Natriumlaktat) angesetzt.

Um die eingesetzten Substanzen auf Zelltoxizität zu prüfen wurden die Zellen für 48 Stunden inkubiert, wobei das eingesetzte Medium insgesamt eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  der zu untersuchenden Substanz enthielt. Zur Bestimmung der minimalen, spontanen LDH-Freisetzung wurden die Zellen für 48 Stunden ausschließlich mit Medium behandelt. Um die maximale LDH-Konzentration zu determinieren wurden die Zellen mit Triton X-100, einem non-ionischen Detergenz, versetzt. Dadurch werden die Zellwände quantitativ permeabilisiert, sodass die vorhandene Menge an Laktatdehydrogenase vollständig im Überstand gelöst wird.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellkulturüberstände der einzelnen Proben sowie der Minimal- und der Maximalkontrolle entnommen und in Reaktionsgefäße überführt. Durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt ( $20160 \times g$ ,  $8^\circ\text{C}$  15 min) wurde Zellfreiheit erreicht und die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt. Je 100  $\mu\text{l}$  der substanzinkubierten Proben, der Minimal- und der Maximalkontrolle sowie des unmodifizierten Mediums als Leerwert wurden in eine 96-Well-Platte (Nunc® MicroWell™, Thermo Fisher Scientific) pipettiert und anschließend mit 100  $\mu\text{l}$  der frisch angesetzten

Arbeitslösung versetzt.

Die Messung erfolgte im Rahmen einer Dreifachbestimmung nach lichtgeschützter Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur im ELISA-Reader bei einer Absorptionswellenlänge von 450 nm. Zur Auswertung wurde vom Mittelwert der Proben-Triplikate jeweils derjenige des Leerwerts subtrahiert. Um die prozentuale Cytotoxizität zu erhalten wurden die so bereinigten Werte in die folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Cytotoxizität}[\%] = 100 * \frac{\text{bereinigter Mittelwert} - \text{Minimalkontrolle}}{\text{Maximalkontrolle} - \text{Minimalkontrolle}}$$

### 3.5 Sialinsäureanalytik

#### 3.5.1 Proteinextraktion und Probenvorbereitung

Die Zellen wurden drei mal mit PBS gewaschen und schließlich mit einem Cell Scraper von der Oberfläche gelöst, um Oberflächenproteine als wichtige sialylierte Strukturen durch den Trypsinverdau nicht zu beschädigen. Anschließend wurden die Zellen in 150 µl 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH = 8,0) mit 1 % Triton-X (v/v) als Detergenz resuspendiert und mit einem Ultraschallstab homogenisiert. Um zwischen cytosolischen Sialinsäuren und solchen, die tatsächlich in Glykoproteine inkorporiert wurden, zu differenzieren, wurde ein Aliquot der homogenisierten Zellen direkt getrocknet und der Sialinsäurequantifizierung zugeführt. Die andere Hälfte der Probe wurde einer Proteinextraktion unterzogen. Dazu wurden die Proben mit 600 µl Chloroform/Methanol (1 : 2, v/v) versetzt und gründlich vermischt. Nach Zentrifugation wurden sowohl Methanol- als auch Chloroformphase verworfen, während die entstandene Interphase, welche die zellulären Proteine enthielt, in 90 % Eisethanol homogenisiert wurde. Die Proben wurden schließlich getrocknet und für die Sialinsäureanalytik verwendet.

Für die Fluoreszenzmarkierung der Sialinsäuren mit DMB wurden die Proben mit 200 µl 2 M Essigsäure für 90 Minuten bei 80°C hydrolysiert, um von den vorhandenen Glykoproteinen die einzelnen Monosaccharidbausteine abzuspalten, und daraufhin getrocknet. Im Anschluss erfolgte die Markierung der Proben in 80 µl DMB-Puffer (7 mM DMB (Dojindo, Kumamoto, Japan), 500 mM 2-Mercaptoethanol, 9 mM Natriumhydrosulfid, 20 mM Trifluoressigsäure (TFA)) bei 55°C für 2 Stunden. Durch Addition von 20 µl NaOH wurde die Reaktion gestoppt [Hara et al., 1987; Galuska et al., 2012]. 1,2-Diamino-4,5-Methylen-Dioxybenzen (DMB) reagiert aufgrund seiner zwei freien primären Amingruppen bereitwillig mit Ketogruppen. Zur Ausbildung eines konjugierten und damit optisch

aktiven Ringsystems ist die Reaktion des einen Amins mit einer Carboxylgruppe und die Reaktion des anderen mit einer Ketogruppe notwendig. Diese hochspezifische Struktur findet sich bei den Kohlenhydraten in der eukaryoten Zelle exklusiv bei Sialinsäuren mit einer C<sub>1</sub>-Carboxylgruppe sowie einer C<sub>2</sub>-Ketogruppe. Damit lassen sich durch Reaktion mit DMB Sialinsäuren hochselektiv fluoreszenzmarkieren. Weil die Reaktion nur an den ersten beiden Kohlenstoffatomen stattfindet, lassen sich Sialinsäuren mit elongierten Amidseitenketten mit dieser Methode gleichermaßen markieren und flüssigkeitschromatographisch auftrennen.

### **3.5.2 HPLC-Auftrennung**

Die mit DMB markierten Proben wurden mittels einer Superspher 100 C-18 Säule (250 mm × 40 mm, Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany) bei 40°C durch ein Knauer HPLC-System getrennt. Für die Analyse wurden als mobile Phasen M1 (AcN : MeOH : H<sub>2</sub>O : TFA = 4 : 4 : 92 : 0,1 (v/v/v)) und M2 (AcN : MeOH : H<sub>2</sub>O : TFA = 45 : 45 : 10 : 0,1 (v/v/v)) gewählt. Für die Separation bei einer Flussrate von 0,25 ml/min über einen linearen Gradienten:  $t_{0 \text{ min}} = 0 \% \text{ M2}$ ,  $t_{35 \text{ min}} = 100 \% \text{ M2}$ . Gemessen wurde mit einem Fluoreszenzdetektor (Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany) bei einer Anregungswellenlänge von 372 nm und einer Emissionswellenlänge von 456 nm. Die gewonnenen Daten wurden mit EuroChrom (Knauer) prozessiert und analysiert. Zur Quantifizierung der Sialinsäuren wurde bei jeder Analyse eine Eichkurve mit Standards bekannter Konzentration erstellt.

### **3.6 Spheroid-Assay**

Die HUVECs wurden zu einer konfluenten Monolayerkultur gezüchtet und anschließend wie bei der Zellpassage mit Trypsin gelöst. Nach Zentrifugation wurde das alte Medium verworfen und die Zellen wurden in ECGM mit 20 % Methylcellulose (w/v, Sigma-Aldrich, München) resuspendiert. Methylcellulose verhindert die Adhäsion der Zellen und moduliert als inerter Zusatz die Viskosität des Mediums. Für die Sphäroidformation wurden nun 300 Zellen pro Vertiefung unter diesen non-adhäsiven Bedingungen in 96-Well-Platten (Greiner Bio One, Frickenhausen, Germany) ausgesät und für 18 bis 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Unter diesen Bedingungen bilden die Suspensionszellen einzelne Endothelzellspheroide [Korff and Augustin, 1998]. Nach der Inkubationszeit wurden die Sphäroide gepoolt und für 3 Minuten zentrifugiert.

Für die Spheroidassays wurde eine Fibrinmatrix in den Vertiefungen einer 24-Well-Platte

(Corning, Wiesbaden) vorbereitet wie von Montesano et al. beschrieben [Montesano et al., 1987]. Bovines Fibrinogen (Calbiochem/Merck Millipore, Darmstadt, Germany) wurde in Dulbeccos PBS (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), pH 7,4, gelöst und so aufgefüllt, dass eine Stocklösung mit einer finalen Fibrinogenkonzentration von 1,8 mg/ml entstand, die zusätzlich mit 200 U/ml Trasylol (Bayer, Leverkusen, Germany) als Proteaseinhibitor versetzt wurde.

Die gepoolten Sphäroide wurden mit PBS gewaschen und in angepasstem Volumen in die vorgelegte Fibrinogen-Lösung gegeben. Durch Zugabe von 0,65 U/ml Thrombin (Sigma-Aldrich, München, Germany) wurde die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin mit anschließender Polymerisierung induziert. Die entstandenen Fibrin-Matrizen wurden zunächst für 30 Minuten mit Endothelial Basal Medium (Promocell) mit 0,5 % FCS (v/v, Promocell) bei 37°C äquilibriert. Danach wurde das Medium gewechselt. Hierbei wurden entweder das unveränderte Kulturmedium oder modifiziertes Medium, das 50 µM *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc, *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp oder *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut enthielt, gewählt. Pro Substanz und Kontrollansatz wurde jeweils eine Sphäroidpopulation mit basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) versetzt, während die andere unstimuliert blieb. Die Sphäroide wurden daraufhin für 42 bis 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen zur Lagerung und Beurteilung mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und bei 4°C gelagert. Die Sphäroide wurden mit NIS Elements AR 3.0 mikroskopisch untersucht und ausgemessen.

## Kapitel 4

### Ergebnisse

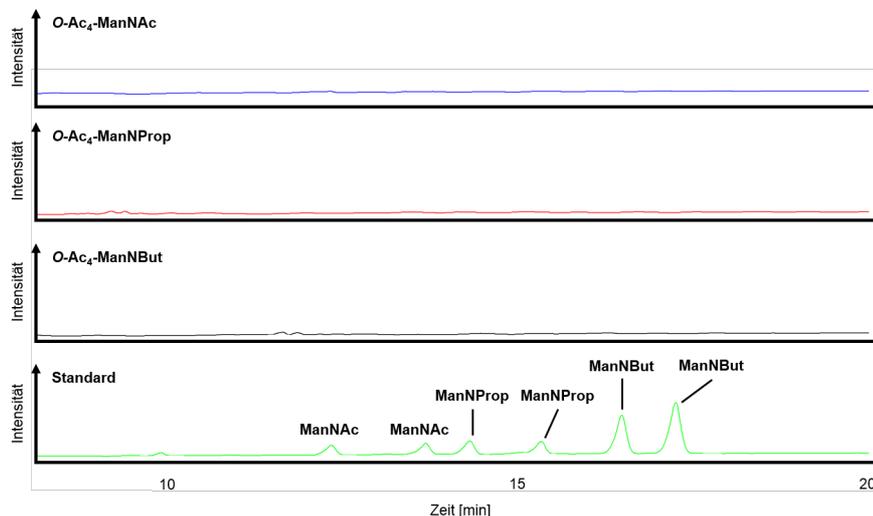
#### 4.1 Etablierung eines standardisierten Protokolls für die Synthese peracetylierter 2-*N*-Acyl-Mannosamin-Derivate

Um die Reaktionsbedingungen zu optimieren und so die Reaktionsausbeute zu steigern, wurde die Reaktion in drei unabhängige Teilschritte aufgeteilt. Zunächst erfolgte die Peracetylierung aller funktionellen Gruppen durch Inkubation von D-ManN mit Essigsäure-, Propionsäure- beziehungsweise Buttersäureanhydrid. Im folgenden Schritt wurden basische Bedingungen hergestellt, um eine spezifische *O*-Dealkylierung durch alkalische Esterhydrolyse zu ermöglichen. Zuletzt wurde das nun ausschließlich *N*-acylierte Mannosamin mit Essigsäureanhydrid versetzt, sodass als finales Produkt *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNR entsteht.

##### 4.1.1 Peracylierung funktioneller Gruppen mit Carbonsäureanhydriden unter Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel

In diesem neu entworfenen Protokoll ist es an zwei Stellen notwendig, funktionelle Gruppen des Mannosamins zu modifizieren. Initial werden Amino- und Hydroxylgruppen gleichermaßen alkyliert, während am Ende der Synthese die Konjugation der freien Hydroxylgruppen des produzierten 2-*N*-Acyl-Mannosamins steht. Sowohl *NH*<sub>2</sub>- als auch *OH*-Gruppen reagieren aufgrund ihrer freien Elektronen bereitwillig mit Carbonsäureanhydriden, wodurch die entsprechenden Carbonsäureamide und -ester entstehen. Nach den beiden genannten Reaktionsschritten entstehen somit vollständig peracetylierte beziehungsweise peracetylierte Derivate des Mannosamins oder des 2-*N*-Acyl-Mannosamins. Aufgrund ihrer Hydrophobizität interagieren diese Substanzen stark mit RP-Säulen und lassen sich folglich gut mittels HPLC auftrennen. Um den Erfolg der einzelnen Reaktionsschritte zu beurteilen, wurde daher nach den Konjugationsreaktionen mit den entsprechenden Carbonsäuren jeweils eine RP-HPLC durchgeführt. Als organisches Lösungsmittel wurde Acetonitril für die Reaktionen gewählt, um eine ideale Auftrennung

der Produkte zu gewährleisten. Unter diesen Umständen war in den HPLC-Analysen nach Peracetylierung und nach Reacetylierung gleichermaßen allerdings keinerlei Produkt nachweisbar. Auch in den daraufhin durchgeführten GC-MS-Untersuchungen derselben Proben war keinerlei Substanz zu detektieren (Abbildung 4.1).

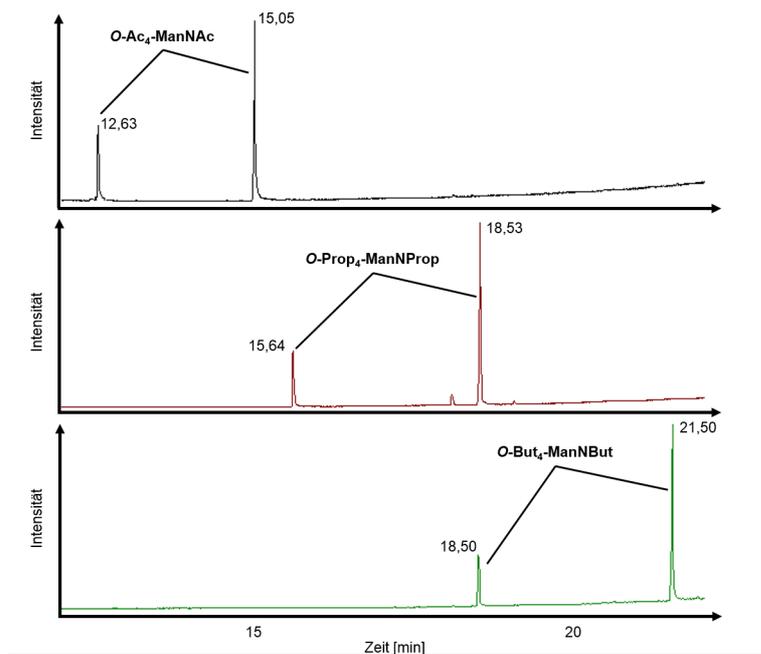


**Abbildung 4.1: HPLC-Analyse der Produkte nach Reacetylierung mit Acetonitril als Lösungsmittel**

D-Mannosamin wurde mit AcN und den entsprechenden Carbonsäureanhydriden inkubiert, um eine Peracetylierung zu erzielen. Anschließend erfolgte eine *O*-Dealkylierung mit Triethylamin. Zuletzt wurden die Proben mit AcN und Essigsäureanhydrid *O*-peracetyliert und flüssigkeitschromatographisch analysiert. Die Standards sind nach dem von Keppler et al. vorgeschriebenen Protokoll synthetisiert und aufgereinigt worden.

Die Peracetylierung mit Essigsäureanhydrid verläuft unter den gegebenen Versuchsbedingungen quantitativ. Da keinerlei Produkt nachweisbar war, müssen folglich die Peracetylierung in Schritt eins sowie die Peracetylierung in Schritt 3 gleichermaßen erfolglos gewesen sein.

Wählt man stattdessen das weniger inerte Pyridin als Lösungsmittel, so zeigen sich in den erhaltenen GC-MS-Profilen *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc, *O*-Prop<sub>4</sub>-ManNProp sowie *O*-But<sub>4</sub>-ManNBut als Produkte nach erfolgreicher Peracetylierung (Abbildung 4.2).

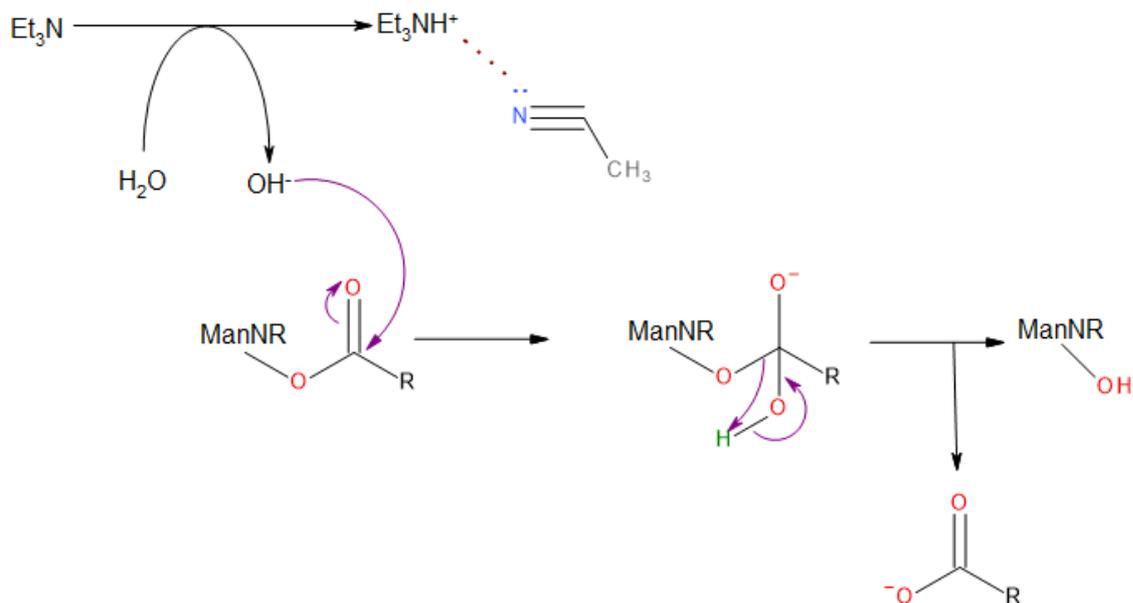


**Abbildung 4.2: GC-Analyse der Produkte nach Peracylierung mit Pyridin als Lösungsmittel**  
D-Mannosamin wurde mit Pyridin als Lösungsmittel und Essigsäure-, Propionsäure- oder Buttersäureanhydrid inkubiert. Daraufhin wurden die Proben gaschromatographisch untersucht.

#### 4.1.2 O-Dealkylierung peracylierter Mannosaminderivate mit Triethylamin

Die Unterteilung der Synthese in drei unabhängige Reaktionen macht es notwendig nach initialer Peracylierung aller funktioneller Gruppen eine spezifische O-Dealkylierung anzuschließen, sodass nur noch die Aminogruppe den elongierten Acylrest als artifizielle Modifikation trägt. Der Stickstoff der Amidbindung weist ein niedrigeres Redoxpotenzial auf als der Sauerstoff der Esterbindungen, was zu einer verstärkten Elektronendelokalisation und somit einer höheren Stabilität führt. Unter basischen Bedingungen sind daher die Carbonylgruppen der O-Residuen stärker elektrophil, sodass die Esterbindungen leichter hydrolysiert werden. Die basische Esterhydrolyse sollte also zu einer spezifischen O-Dealkylierung führen, wobei die Aminomodifikationen unverändert bleiben. Wässriges Triethylamin stellt mit einem  $pK_a$  von 10,7 ist eine passende Base dar, um alkalische Reaktionsbedingungen herzustellen und Hydroxidionen für die Hydrolyse bereitzustellen. Triethylamin ist leicht flüchtig und hinterlässt in der Regel keine Rückstände, sodass keine zusätzlichen Aufreinigungsschritte notwendig sein sollten. Acetonitril als Lösungsmittel bringt die zu diesem Zeitpunkt vorliegenden lipophilen peracylierten N-Acyl-ManN Derivate vollständig in Lösung und sollte zugleich kationische Intermediate wie protonier-

tes Triethylamin stabilisieren, was die angestrebte Ester-Verseifung weiter unterstützt.



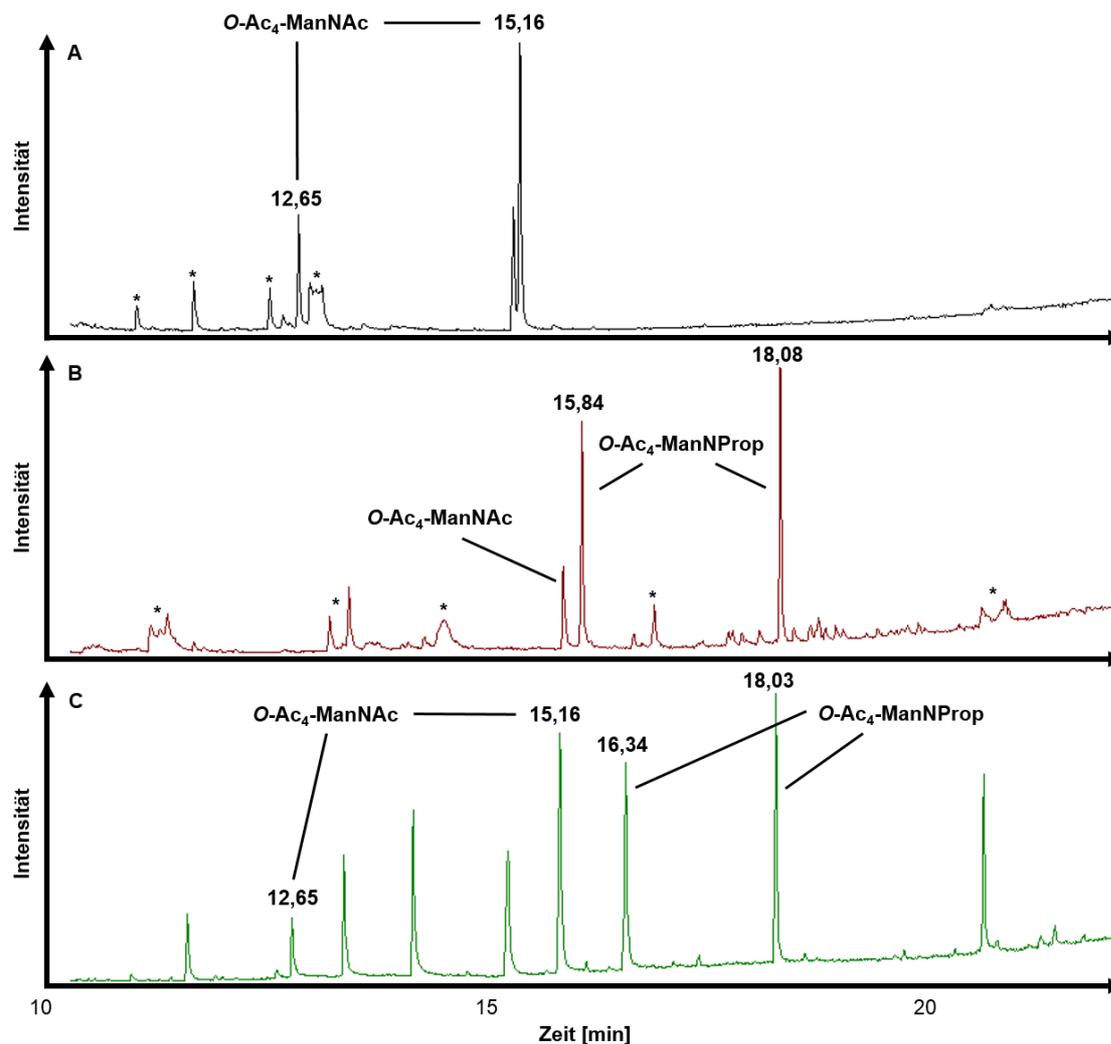
**Abbildung 4.3: Alkalische Esterhydrolyse mit Acetonitril und Triethylamin**

Wässriges Triethylamin ( $\text{pK}_a = 10,7$ ) liefert hochreaktive Hydroxidionen und etabliert alkalische Bedingungen. Unter Protonenmangel werden die Carbonsäurereste irreversibel in Form von Carboxylatanionen freigesetzt. Acetonitril unterstützt die Produktion von Hydroxidionen durch Stabilisation von protonierten Triethylamin-Kationen. *O*-Spezifische Dealkylierung liefert *N*-Acyl-ManN als Produkt.

Führt man die Dealkylierung mit 100  $\mu\text{l}$  AcN und 100  $\mu\text{l}$  0,2 M Triethylamin bei 37°C für 2 Stunden durch, zeigen sich nach Reacetylierung in den GC- und GC-MS-Spektren vollständig peracetylierte Derivate. Alle funktionellen Gruppen der Ausgangssubstanz sind nach wie vor mit dem entsprechenden Carbonsäurerest konjugiert.

Weil sich unter so milden Bedingungen auch die Esterbindungen noch stabil zeigten, wurden die Proben im Anschluss an die Peracetylierung unter denselben Bedingungen über Nacht mit 0,2 M Triethylamin inkubiert. Die GC-MS-Profile nach Reacetylierung zeigen für ManNAc (Abbildung 4.4 A) und ManNProp (Abbildung 4.4 B) Substanzpeaks bei denselben Reaktionszeiten mit denselben Fragmentierungsmustern wie die Standards, die nach dem vorbeschriebenen Protokoll synthetisiert und aufgereinigt wurden. Es fällt auf, dass sich die Substanzen nicht in zwei reine Signalpeaks auftrennen, wie es bei den Standardsubstanzen der Fall ist (Abbildung 4.4 C), und dass bei ManNProp auch ManNAc als Nebenprodukt nachweisbar ist (Abbildung 4.4 B). Darüber hinaus ist die Ausbeute noch deutlich geringer als beim Ausgangsprotokoll nach Keppler et al..

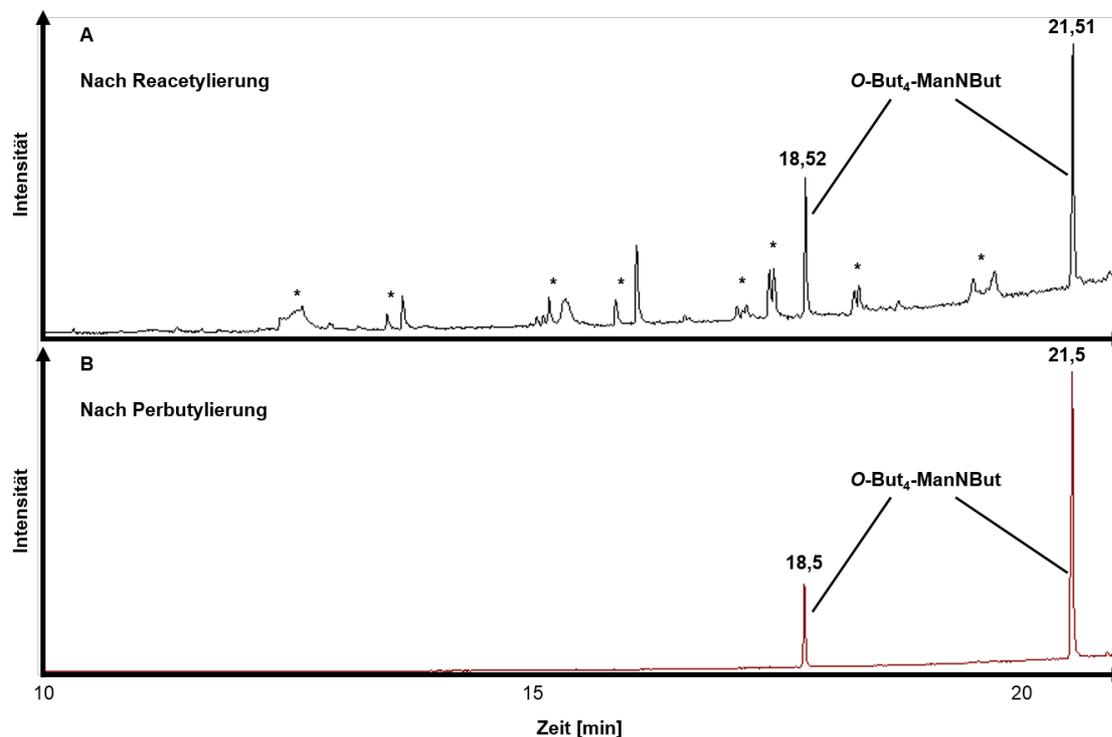
Darüber hinaus lassen sich im Ansatz von ManNBut keine Spuren von *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut nachweisen. Stattdessen zeigen sich in den Chromatogrammen nach wie vor die unge-



**Abbildung 4.4: GC-Analyse von ManNAc und ManNProp nach Reacetylierung im Vergleich zu Standardsubstanzen**

Die ManN-Proben wurden mit den entsprechenden Carbonsäuranhydriden peracyliert, mit Triethylamin gespalten und anschließend mit Essigsäureanhydrid reacetyliert. Gezeigt sind die Gaschromatogramme von (A) *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc und (B) *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp. Die (C) Standardlösung ist ein Gemisch aus *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc, *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp und *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut, die jeweils nach dem Ausgangsprotokoll synthetisiert worden sind. Nur die Retentionszeiten von ManNAc und ManNProp sind angegeben. Nicht identifizierte Verunreinigungen sind mit Asterisken gekennzeichnet.

spalteten, vollständig mit Buttersäure veresterten Mannosamin-Derivate (Abbildung 4.5 A).



**Abbildung 4.5: ManNBut nach Reacetylierung im Vergleich zu ManNBut nach Perbutylierung**

ManN wurde wie beschrieben zunächst mit Buttersäureanhydrid behandelt, um *O*-But<sub>4</sub>-ManNBut zu erhalten (**B**). Im Anschluss wurden die Proben wie beschrieben *O*-dealkyliert, mit Essigsäureanhydrid reacetyliert und gaschromatographisch analysiert (**A**). Nicht identifizierte Verunreinigungen sind mit Asterisken gekennzeichnet.

Wie deutlich zu erkennen ist, weisen alle Chromatogramme nach Triethylaminbehandlung eine sehr instabile Grundlinie sowie zahlreiche Zusatzpeaks auf, die ihrem Fragmentationsmuster nach zu urteilen nicht auf Mannosamin-Abkömmlinge zurückzuführen sind. In den Standards waren vergleichbare Verunreinigungen zu keinem Zeitpunkt detektierbar. Eine zusätzliche Schleppung der Proben mit Ethanol, um eventuell vorhandene Triethylamin-Rückstände zu entfernen, führten weder zu einem höheren Reinheitsgrad der Produkte noch zu einer erhöhten Gesamtumsatzrate.

### 4.1.3 O-Dealkylierung peracylierter Mannosamin-derivate mit wässriger Natronlauge

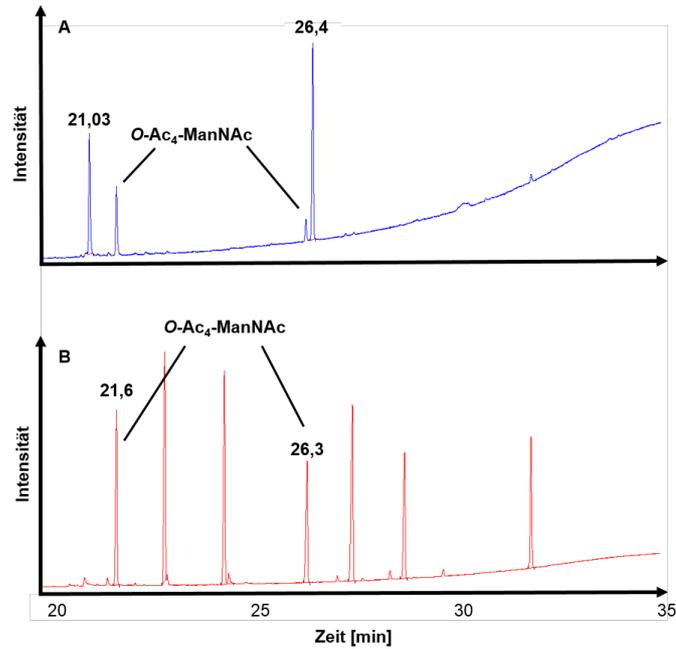
Nachdem Triethylamin als ungeeignete Base für die O-Dealkylierung identifiziert war, wurde ein anderes Reagenz im zweiten Schritt der Synthese peracetylierter *N*-Acyl-Mannosamin-Derivate benötigt. Während die Bedingungen für Peracylierung und Reacetylierung konstant beibehalten wurden, erfolgte die Dealkylierung nun für 4 Stunden bei 37°C mit 250 µl 0.15 mM NaOH als Base. Stark alkalische Reaktionsbedingungen können auch zur Spaltung von Amidbindungen führen. Weil aber gerade die Aminomodifikation des Mannosamins konserviert werden sollte, wurde die Reaktion durch Zugabe 300 µl 100 mM Essigsäure, pH = 6-7, neutralisiert.

Das im Rahmen der Neutralisation entstehende Natriumacetat macht einen zusätzlichen Entsalzungsschritt notwendig. Daher wurde im Anschluss an die Synthese eine Extraktion mit Dichlormethan und Wasser ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{H}_2\text{O} = 8 : 5$ ) durchgeführt, wobei die wässrige Phase verworfen wurde. Dieser Schritt erlaubt neben der Entsalzung zusätzlich die Entfernung von hydrophilen Nebenprodukten wie zum Beispiel eventuell unzureichend O-acetylierter *N*-Acyl-Mannosamin-Intermediate. Zur Kontrolle wurden GC- und GC-MS-Analysen nach Peracylierung und nach finaler Reacetylierung durchgeführt.

Bei allen Ansätzen erwies sich die Peracylierung mit den entsprechenden Anhydriden chromatographisch als erfolgreich. Nach O-Dealkylierung mit NaOH und Reacetylierung mit Essigsäureanhydrid zeigten die erhaltenen GC-Profile zwei reine Substanzpeaks. Im Vergleich zu den Standards wiesen diese aber in allen Ansätzen gut reproduzierbare Differenzen in der Retentionszeit auf (Abbildung 4.6).

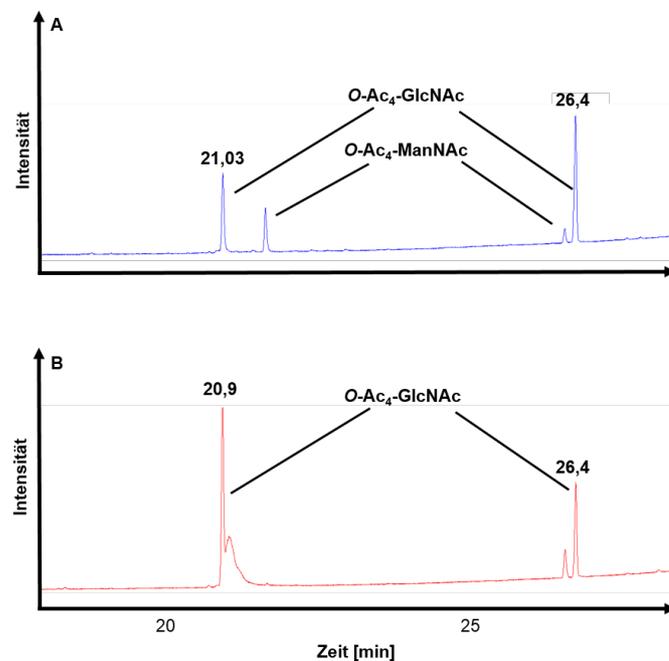
Im Vergleich zu Glucosamin weist Mannosamin aufgrund der axialen Positionierung seiner Aminogruppe eine thermodynamisch niedrigere Stabilität auf. Daher ist es denkbar, dass die Ausgangssubstanz unter den Reaktionsbedingungen der O-Dealkylierung spontan zu ihrem stabileren Epimer isomerisiert.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde unter denselben Reaktionsbedingungen mit D-Glucosamin als Ausgangssubstanz O-Ac<sub>4</sub>-GlcNAc synthetisiert. Stellt man nun die Gaschromatogramme von O-Ac<sub>4</sub>-GlcNAc den zuvor gewonnenen Chromatogrammen von O-Ac<sub>4</sub>-ManNAc gegenüber, so lassen sich keine Retentionszeitdifferenzen feststellen (Abbildung 4.7).



**Abbildung 4.6: GC-Analyse von  $O\text{-Ac}_4\text{-ManNAc}$  im Vergleich zum Standard**

Die Substanzen wurden wie beschrieben peracyliert und mit wässriger Natronlauge  $O$ -dealkyliert, wobei die Reaktion mit Essigsäure gestoppt wurde. Nach Reacetylierung wurden die Proben mittels Extraktion gereinigt und gaschromatographisch analysiert. Gezeigt ist (A)  $O\text{-Ac}_4\text{-ManNAc}$  im Vergleich zu den (B) Standardsubstanzen, die nach dem Ausgangsprotokoll hergestellt wurden.

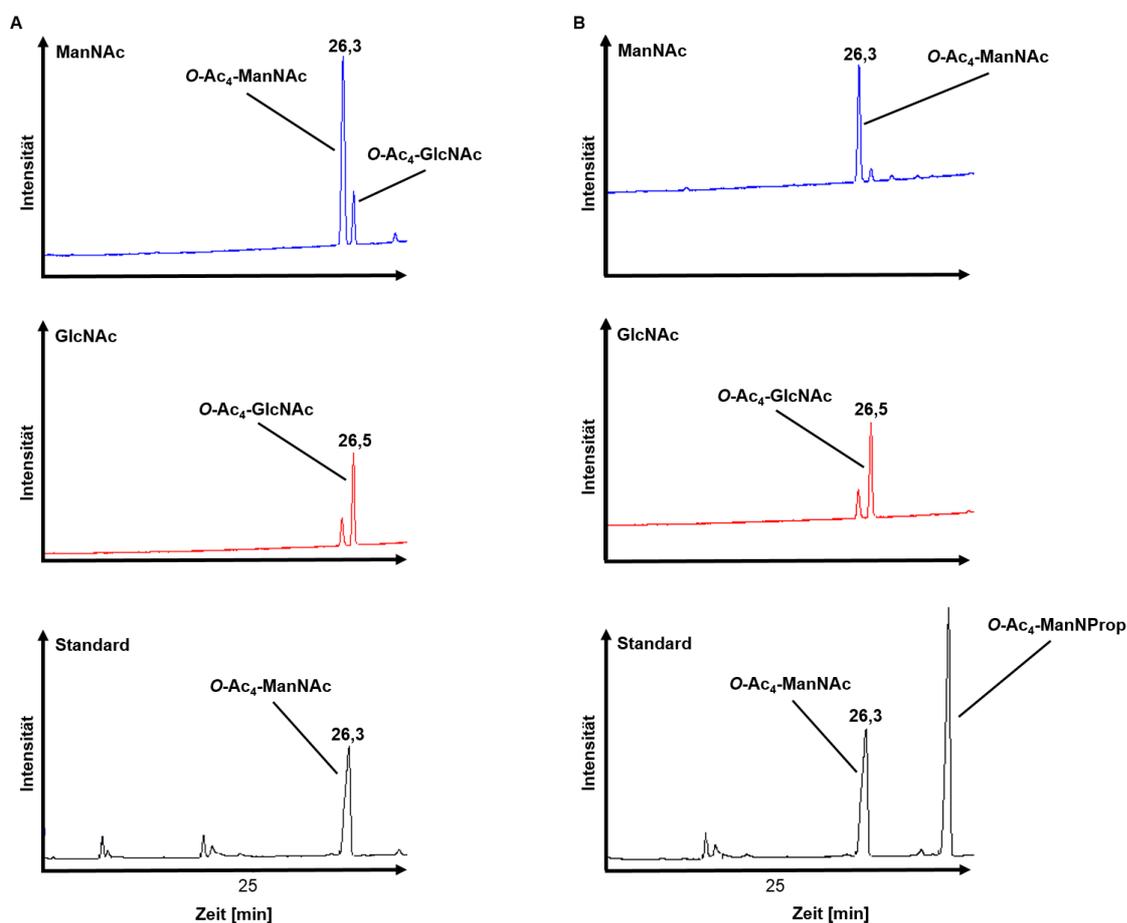


**Abbildung 4.7: GC-Analyse von  $O\text{-Ac}_4\text{-ManNAc}$  im Vergleich zu  $O\text{-Ac}_4\text{-GlcNAc}$**

$\text{ManN}$  wurde nach dem beschriebenen Protokoll peracyliert, mit  $\text{NaOH}$  behandelt und anschließend reacetyliert (A). Glucosamin wurde unter denselben Bedingungen modifiziert, um  $O\text{-Ac}_4\text{-GlcNAc}$  synthetisiert (B) zu erhalten.

Um zu determinieren, ob die alkalischen Bedingungen während der Reaktion oder das saure Milieu bei Neutralisation zu dieser hypothetischen Epimerisierung von ManN zu GlcN führen, wurde ManN in einem neuen Ansatz zunächst wie zuvor beschrieben peracyliert. Daraufhin wurde der Dealkylierungsschritt unter denselben Bedingungen wie zuvor durchgeführt. Die Reaktion wurde nun allerdings beendet, indem die Proben entweder unmittelbar oder nach Neutralisation mit 300 µl 100 mM Essigsäure in flüssigem Stickstoff gefroren wurden. Daraufhin wurden alle Ansätze über Nacht lyophilisiert und am Folgetag gemäß Protokoll reacyliert.

Bei den Ansätzen, die Essigsäure ausgesetzt waren, weisen die beiden detektierten Substanzpeaks dieselbe Retentionszeit auf wie bei den korrespondierenden *O*-Ac<sub>4</sub>-GlcN-Analoga. Diese Signale sind nur in sehr geringem Ausmaß registrierbar, wenn die Ansätze ohne Neutralisation eingefroren wurden (Abbildung 4.8).



**Abbildung 4.8: GC-Analyse zur Epimerisierung von ManN zu GlcN unter sauren Reaktionsbedingungen**

Mannosamin wurde wie beschrieben mit Essigsäure peracetyliert und anschließend mit NaOH behandelt. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Proben entweder mit Essigsäure zur Neutralisation versetzt wurden (**A**) oder indem die Proben in flüssigem Stickstoff gefroren wurden (**B**). Alle Ansätze wurden anschließend lyophilisiert und mit Essigsäureanhydrid reacyliert.

Es ist festzuhalten, dass die beschriebenen Beobachtungen nur für die Synthese von *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc und *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp zutreffend sind. Bei der Synthese von *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut, gab es nach der initialen Perbutylierung Lösungsschwierigkeiten. Das zu diesem Zeitpunkt erhaltene *O*-But<sub>4</sub>-ManNBut ließ sich in der für die Hydrolyse verwendeten Natronlauge auch im Ultraschallbad nicht solvatisieren. In den GC-Analysen nach Peracylierung und nach Behandlung mit Essigsäureanhydrid sind die Profile identisch und zeigen nur Substanzpeaks bei Retentionszeiten, die *O*-But<sub>4</sub>-ManNBut entsprechen.

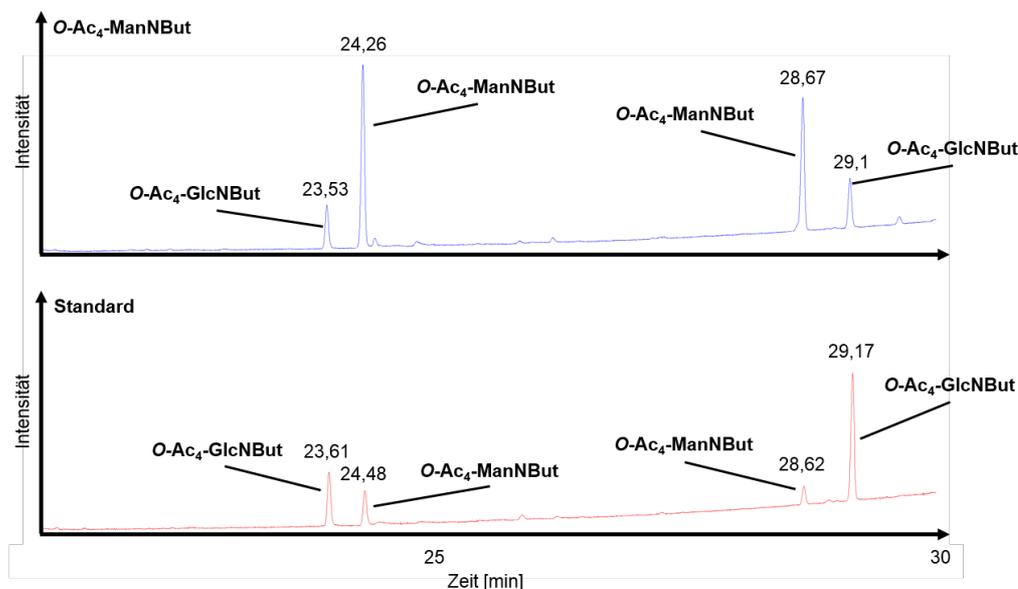
#### 4.1.4 *O*-Dealkylierung peracylierter Mannosaminderivate mit methanolischer Natronlauge

Um alle peracylierten Mannosamin-Derivate gleichermaßen in Lösung zu bringen, war es damit notwendig ein unpolareres Medium für die gewünschte *O*-spezifische Dealkylierung zu finden. Im Gegensatz zur wässrigen Natronlauge lassen sich alle *O,N*-Acyl-ManN-Intermediate in methanolischer Natronlauge vollständig solvatisieren, weshalb Methanol auch im vorbeschriebenen Ausgangsprotokoll als Lösungsmittel eingesetzt worden ist. Somit stellt NaOH(MeOH) ein sinnvolles Reagenz für die alkalische Hydrolyse dar.

Die Proben wurden mit 500 µl 0.01 M methanolischer NaOH bei 0°C für 2 Stunden inkubiert und im Anschluss unter kontinuierlichem Stickstoff-Strom getrocknet. Die Bedingungen für Peracylierung und Reacetylierung wurden dabei wie zuvor beschrieben (Kapitel 4.1.3) konstant beibehalten, wobei jeweils nach diesen Schritten GC- und GC-MS-Analysen zur Kontrolle und Strukturverifikation durchgeführt wurden. Auch der abschließende Extraktionsschritt wurde weiterhin durchgeführt, um die Proben von Natriumrückständen sowie eventuell unzureichend *O*-acetylierten Intermediaten zu befreien. Wie auch zuvor erweist sich die Peracylierung in allen Fällen als erfolgreich. Die nach *O*-Dealkylierung und Reacetylierung aufgezeichneten GC-Profile und Fragmentationspektren entsprechen den Standards. Die Proben enthalten somit *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc, *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp beziehungsweise *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut.

Bei der GC-Analyse von *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut, zeigen sich jedoch einige Zusatzpeaks mit leichten Differenzen in den Retentionszeiten. Diese Retentionszeiten entsprechen denjenigen von *O*-Ac<sub>4</sub>-GlcNBut (Abbildung 4.9).

Wie zuvor unter sauren Bedingungen ist es auch möglich, dass es im alkalischen Milieu zu einer Umlagerung von Mannosamin zu Glucosamin kommen kann. Um die Reaktionsbedingungen abzumildern, wurden *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc, *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp beziehungsweise *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut nach demselben Protokoll wie zuvor synthetisiert. Nach *O*-Dealkylierung



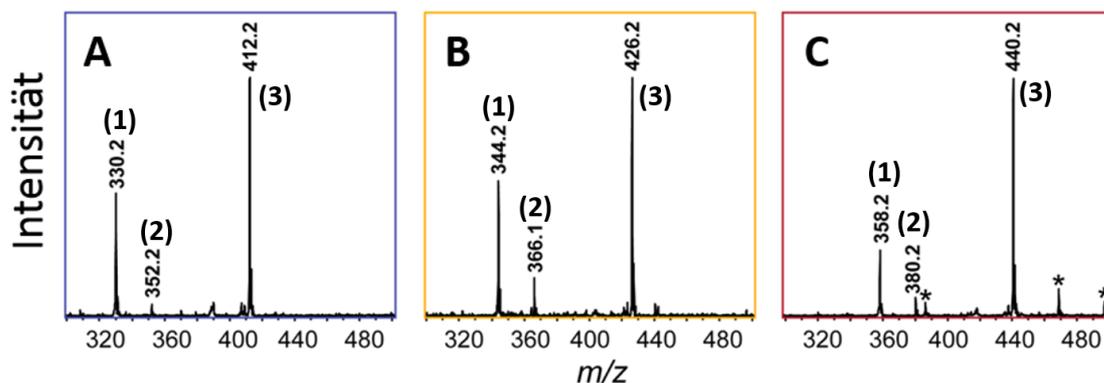
**Abbildung 4.9: GC-Chromatogramm von  $O\text{-Ac}_4\text{-ManNBut}$  nach Spaltung mit methanolischer NaOH**

D-ManN wurde mit Buttersäureanhydrid peracyliert und anschließend wie beschrieben mit methanolischer Natronlauge hydrolysiert. Nach Reacetylierung mit Essigsäureanhydrid erfolgte die gaschromatographische Analyse der Proben. Die Standards wurden nach dem Ausgangsprotokoll mit ManN oder GlcN als Ausgangssubstrat synthetisiert.

wurden die Proben allerdings nicht bei Raumtemperatur unter Stickstoffstrom getrocknet. Stattdessen wurden die Ansätze nach 2 Stunden in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend über Nacht lyophilisiert.

Die Strukturverifikation der Produkte erfolgte via Gaschromatographie, Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) und GC-MS(/MS). Zudem erfolgten extern NMR-Spektroskopie-Analysen, die von Dr. Heike Hausmann am Chemischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt wurden. In den korrespondierenden ESI-MS-Untersuchungen ließen sich die entsprechenden  $O\text{-Ac}_4\text{-N-Acyl-ManN-Derivate}$  als Natriumaddukte ( $[M+Na]^+$ ) bei  $m/z = 412.2$  für  $O\text{-Ac}_4\text{-ManNAc}$  (Abbildung 4.10 A, (3)),  $m/z = 426.2$  für  $O\text{-Ac}_4\text{-ManNProp}$  (Abbildung 4.10 B, (3)), beziehungsweise  $m/z = 440.2$  für  $O\text{-Ac}_4\text{-ManNBut}$  (Abbildung 4.10 C, (3)) nachweisen. Die registrierten Differenzen von 14 in den  $m/z$ -Werten zwischen ManNAc und ManNProp beziehungsweise ManNProp und ManNBut entsprechen den zusätzlichen Methylengruppen der 2-N-Propyl- und 2-N-Butyl-Residuen.

In den gewonnenen GC-MS-Spektren zeigen sich dieselben reproduzierbaren  $m/z$ -Differenzen von 14 zwischen  $O\text{-Ac}_4\text{-ManNAc}$  und  $O\text{-Ac}_4\text{-ManNProp}$  sowie zwischen  $O\text{-Ac}_4\text{-$



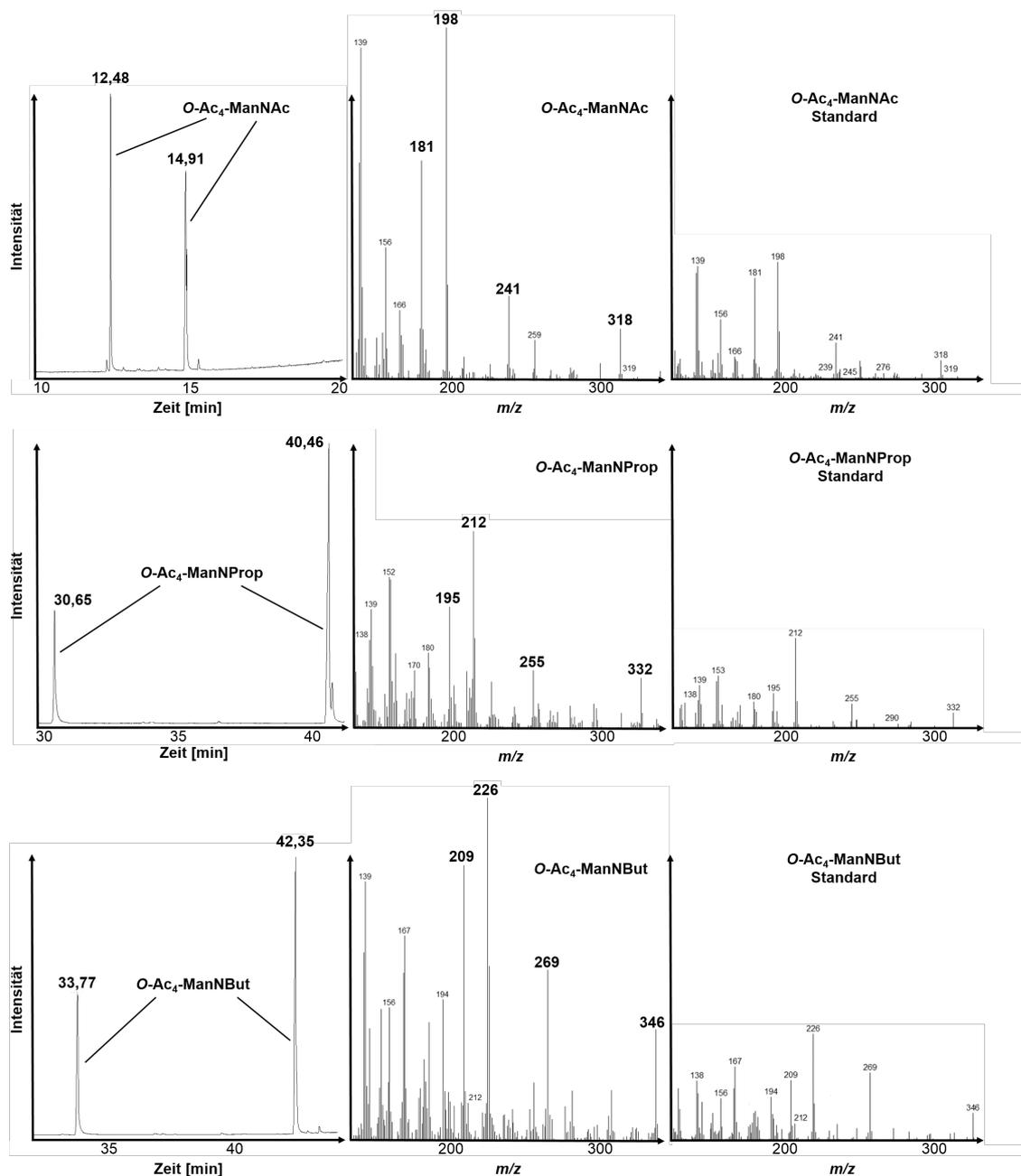
**Abbildung 4.10: ESI-MS-Analyse der nach dem neuen Protokoll synthetisierten ManNAc-Analoga**

ESI-MS-Analyse von (A) *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc, (B) *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp und (C) *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut nach Synthese gemäß dem beschriebenen Protokoll. Die Derivate lassen sich als Protonenaddukte ( $[M+H]^+$ ) nach Verlust von Essigsäure (1) sowie Natriumaddukte ( $[M+Na]^+$ ), (3)) und Natriumaddukte nach Verlust von Essigsäure (2) nachweisen. Nicht identifizierte Signale sind mit Asterisken gekennzeichnet.

ManNProp und *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut. Die Fragmentationsmuster stimmen mit denjenigen der korrespondierenden Standards überein (Abbildung 4.11).

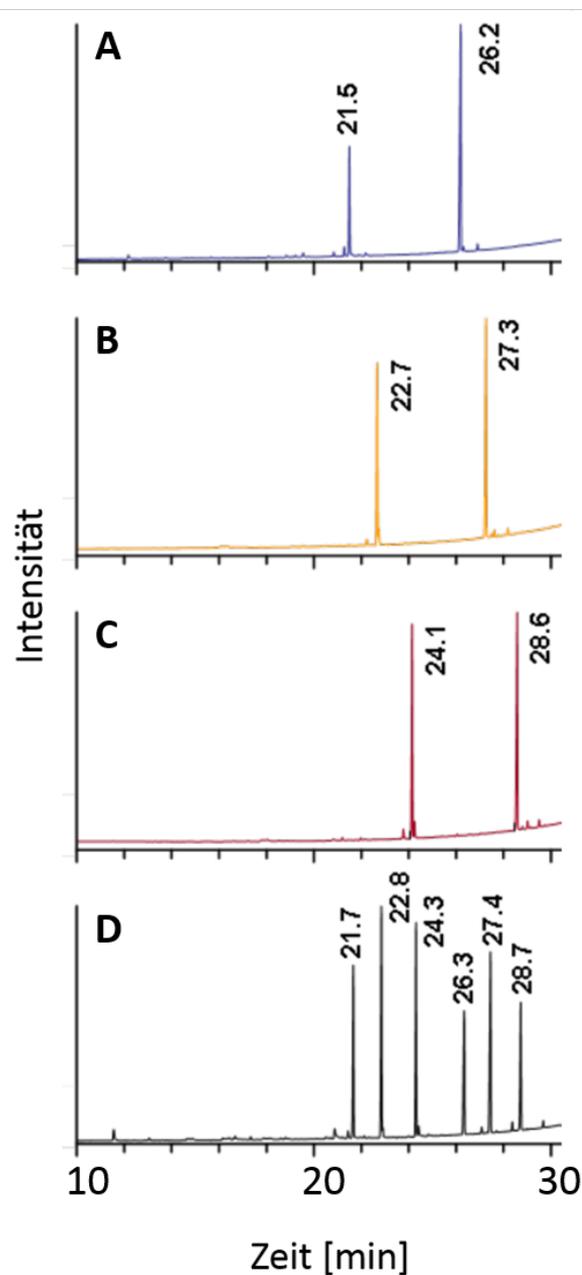
Die Gaschromatogramme der jeweiligen artifiziellen Mannosaminanaloga zeigen die Anwesenheit sowohl des  $\alpha$ -Anomers (1. Signal) als auch des  $\beta$ -Anomers (2. Signal) in Form von zwei distinkten Signalen, die sich in ihrer Retentionszeit unterscheiden, aber das gleiche Fragmentationsspektrum zeigen. Wie zu erkennen ist, weisen die Proben einen hohen Reinheitsgrad ohne detektierbare Nebenprodukte auf (Abbildung 4.12).

Die Peracetylierung von Mannosaminderivaten mit Essigsäureanhydrid ist eine quantitative Reaktion, bei der 100 % des Ausgangssubstrates umgesetzt werden. Weil weder bei der Synthese von ManNProp noch bei der Synthese von ManNBut ManNAc als Nebenprodukt nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass auch hier die Peracylierung als quantitative Reaktion abgelaufen ist. Somit wird mit dem modifizierten Protokoll für alle drei Komponenten eine Reaktionsausbeute von 100 % erreicht.



**Abbildung 4.11: GC-Profile und GC-MS-Spektren der Proben im Vergleich zu den Standardsubstanzen**

Gaschromatogramme und MS-Spektren von *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc, *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp und *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut. Die Substanzen wurden wie beschrieben mit den entsprechenden Carbonsäureanhydriden peracyliert, mit methanolischer Natronlauge hydrolysiert und schließlich mit Essigsäureanhydrid reacyliert. Zum Vergleich sind die Massenspektren der zugehörigen Standards abgebildet. Diese wurden nach dem von Keppler et al. vorgeschlagenen Protokoll synthetisiert und aufgereinigt. Intensitätsunterschiede zwischen Proben und Standards sind auf Unterschiede in den für die Analyse eingesetzten Substanzmengen zurückzuführen. Hervorgehoben sind die Hauptsignale mit *m/z*-Werten, bei denen sich eine reproduzierbare Massendifferenz von 14 zwischen den einzelnen Komponenten ergibt.



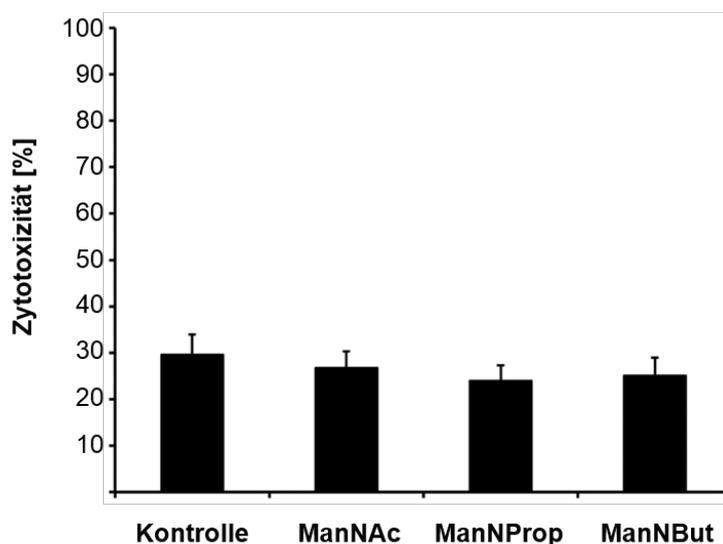
**Abbildung 4.12: GC-Profile der peracetylierten *N*-Acyl-Mannosamin-Derivate**

Zur standardmäßigen Strukturverifikation wurden (A) *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc, (B) *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp und (C) *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut gaschromatographisch analysiert. Die registrierten Retentionszeiten wurden mit denjenigen von (D) Standardsubstanzen verglichen, die nach dem Ausgangsprotokoll synthetisiert wurden und deren Struktur mittels NMR zuvor bestätigt worden ist.

## 4.2 Metabolismus und Inkorporation artifizieller 2-*N*-Acetyl-Mannosaminanaloge im Zellkulturmodell

### 4.2.1 Cytotoxizität der peracetylierten *N*-Acetyl-Mannosaminanaloge im Zellkulturmodell

Um initial zu determinieren, in welchem Grad die peracetylierten *N*-Acyl-Mannosamine bei Applikation schädlich für Zellen sind, wurde zunächst ihre Cytotoxizität auf HUVECs mit einem LDH-Assay bestimmt. Dazu wurden die Zellen für insgesamt 48 Stunden mit bis zu 100  $\mu$ M *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc, *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp oder *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut inkubiert. Daraufhin wurde der Kulturüberstand mit dem Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche, Deutschland) auf LDH-Aktivität überprüft, um die Zellen auf die Intaktheit ihrer Membranpermeabilität als generellen Indikator für Zellvitalität und -integrität zu testen. Wie zuvor auch in anderen Studien mit anderen Zelllinien festgestellt wurde, zeigten die verschiedenen Mannosamin-derivate keine signifikante Veränderung der LDH-Aktivität im Kulturüberstand und damit keine signifikante Cytotoxizität. Bei HUVECs gilt dies bei Konzentrationen bis 50  $\mu$ M (Abbildung 4.13). Bei A549-Lungenepithelzellen zeigte sich ein ähnliches Bild bei Konzentrationen von bis zu 100  $\mu$ M.

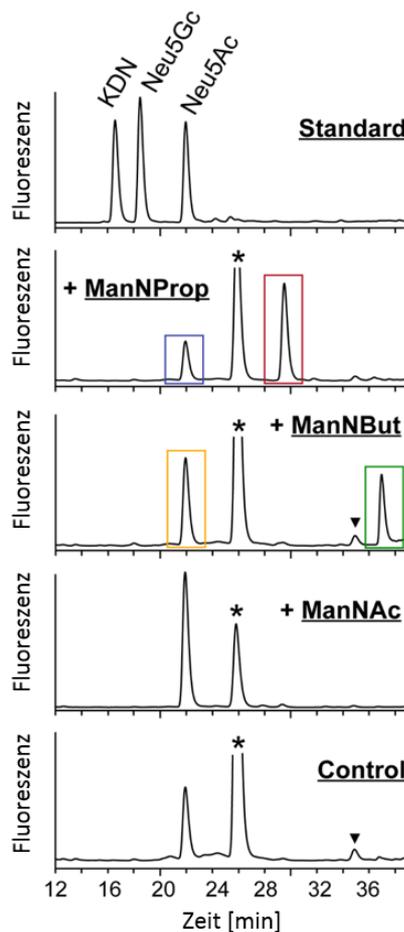


**Abbildung 4.13: Biokompatibilität der einzelnen Mannosamin-Derivate am Beispiel von HUVECs**

Nach Inkubation von HUVECs mit den einzelnen Komponenten wurde die LDH-Aktivität im Kulturüberstand bestimmt. Als Maximum (100 % Cytotoxicität) wurde die Aktivität bei HUVECs gesetzt, die mit 1 % Triton-X (v/v) behandelt wurden. Als Kontrolle dienten Zellen, die in unbehandeltem Vollmedium kultiviert wurden. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen angegeben, die aus den Ergebnissen von drei unabhängigen Experimenten errechnet wurden.

#### 4.2.2 Metabolismus artifizierender *N*-Acetyl-Mannosaminanaloge in verschiedenen Zelllinien

Um zu untersuchen inwiefern die peracetylierten 2-*N*-Acyl-Mannosaminderivate tatsächlich von Zellen aufgenommen und zu den korrespondierenden 5-*N*-Acyl-Neuraminsäuren metabolisiert werden, wurden HUVECs, A549-Lungenepithelzellen und Caco-2-Darmepithelzellen zunächst jeweils mit 50  $\mu$ M *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc, *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp oder *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mittels Cell Scraper gelöst und homogenisiert. Das Gesamtzelllysate wurde daraufhin mit DMB fluoreszenzmarkiert und mittels RP-HPLC aufgetrennt (Abbildung 4.14).



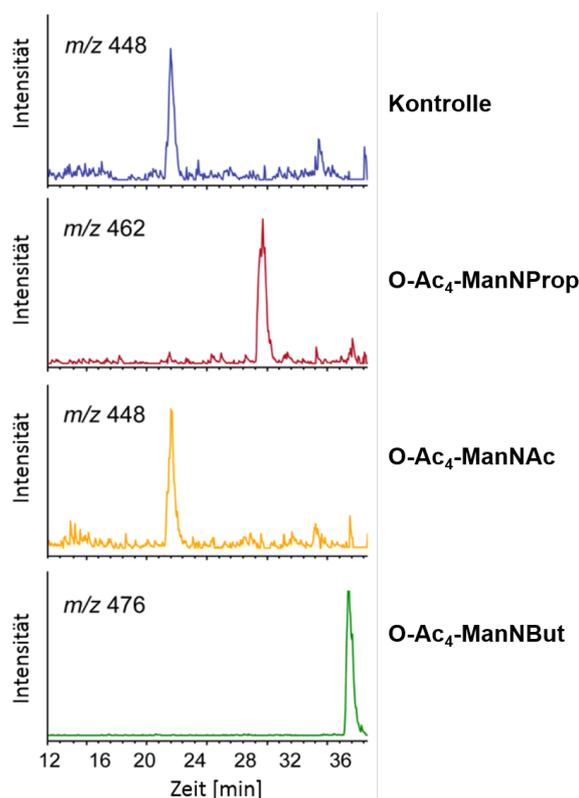
**Abbildung 4.14: RP-HPLC von HUVEC-Zelllysaten, die mit ManNAc-Analoga behandelt wurden, im Vergleich zu Sialinsäurestandards**

Die Proben wurden nach Homogenisierung mit Essigsäure behandelt, um gebundene Saccharidstrukturen zu hydrolysieren. Die freigesetzten Sialinsäuren im Überstand wurden anschließend mit DMB markiert und mittels RP-HPLC aufgetrennt. Als Kontrolle dienten unbehandelte HUVECs, die in normalem Vollmedium kultiviert wurden. Signale, die auf das DMB-Reagenz zurückzuführen sind, sind mit Asterisken gekennzeichnet, bisher unidentifizierte Verunreinigungen mit Pfeilen.

Im Vergleich mit den Standardsubstanzen wird sichtbar, dass Neu5Ac als physiologische Sialinsäure in allen Ansätzen nach wie vor nachweisbar ist, unabhängig davon, mit welchem *N*-Acyl-Mannosaminderivat die Zellen inkubiert wurden. Die zusätzlichen Signale nach Behandlung mit *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp und *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut, weisen auf die Anwesenheit von zusätzlichen, veränderten Sialinsäuren hin. Weil die Signale eine höhere Retentionszeit (29,5 Minuten bei ManNProp und 37 Minuten bei ManNBut) aufweisen als Neu5Ac ( $R_T = 22,1$  min), interagieren diese Substanzen stärker mit der hydrophoben C-18-Säule, was auf die elongierten *N*-Acyl-Residuen zurückzuführen ist. Zellen, die ausschließlich mit *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc behandelt wurden, zeigen nur ein Signal bei Neu5Ac. Nach *O*-Deacetylierung durch unspezifische Esterasen im Cytoplasma der Zielzellen entsteht als Effektorsubstanz ManNAc, der physiologische Vorläufer von Neu5Ac, sodass auch nur unveränderte Sialinsäuren synthetisiert werden können.

Um die Struktur der Substanzen zu verifizieren, wurden die Proben zunächst mittels LC-ESI-MS untersucht. Die dabei gewonnenen extrahierten Ionenchromatogramme (Abbildung 4.15) von  $m/z$ -Werten, die den Natriumaddukten  $[M+Na]^+$  der Neu5Ac-Analoga entsprachen, bestätigen das Vorhandensein der artifiziellen Sialinsäuren Neu5Prop ( $m/z = 462$ ) und Neu5But ( $m/z = 476$ ) sowie der physiologischen Sialinsäure Neu5Ac ( $m/z = 448$ ). So konnte zudem die Verunreinigung durch eventuell koeluiierende und damit flüssigkeitschromatographisch nicht trennbare Nebenprodukte ausgeschlossen werden.

Ausgewählten Vorläuferionen, die sich nach Wasserabspaltung gebildet haben und als Protonenaddukte ( $[M+H]^+$ ) registriert werden konnten, wurden für eine anschließende ESI-MS/MS-Analyse zur weiteren Strukturverifikation der detektierten Substanzen gewählt (Abbildung 4.16; Neu5Ac - H<sub>2</sub>O,  $m/z = 408.1$ ; Neu5Prop - H<sub>2</sub>O,  $m/z = 422.1$ ; Neu5But - H<sub>2</sub>O,  $m/z = 436.2$ ). Die Analyse von DMB-markierter Sialinsäure (Neu5Ac - H<sub>2</sub>O,  $m/z = 408.1$ ) liefert das charakteristische Fragmentierungsmuster durch kollisionsinduzierte Fragmentation wie es zuvor von Klein et al. beschrieben worden ist. In Abbildung 4.16 A ist die Struktur von DMB-markierter Sialinsäure (Neu5Ac,  $m/z = 426.1$ ) zu erkennen, wobei die Fluoreszenzmodifikation ein  $m/z$ -Inkrement von insgesamt 116,2 zur Folge hat. Dehydratisierung zwischen C<sub>4</sub> und C<sub>8</sub> führt zur Zyklisierung und ergibt das Fragment bei  $m/z = 408,1$ . Durch Abspaltung der C<sub>6</sub>- und C<sub>7</sub>-Hydroxylgruppen in Form von Wasser sowie der Amidgruppe an C<sub>5</sub> kommt es zur Aromatisierung des entstandenen Rings ( $m/z = 313$ ). Die weitere Elimination von C<sub>9</sub> in Form von Formaldehyd liefert schließlich das Signal bei  $m/z = 283$ . Bei diesem Fragmentationsweg geht die Aminomodifikation der analysierten Sialinsäuren verloren, sodass zwischen Neu5Ac, Neu5Prop

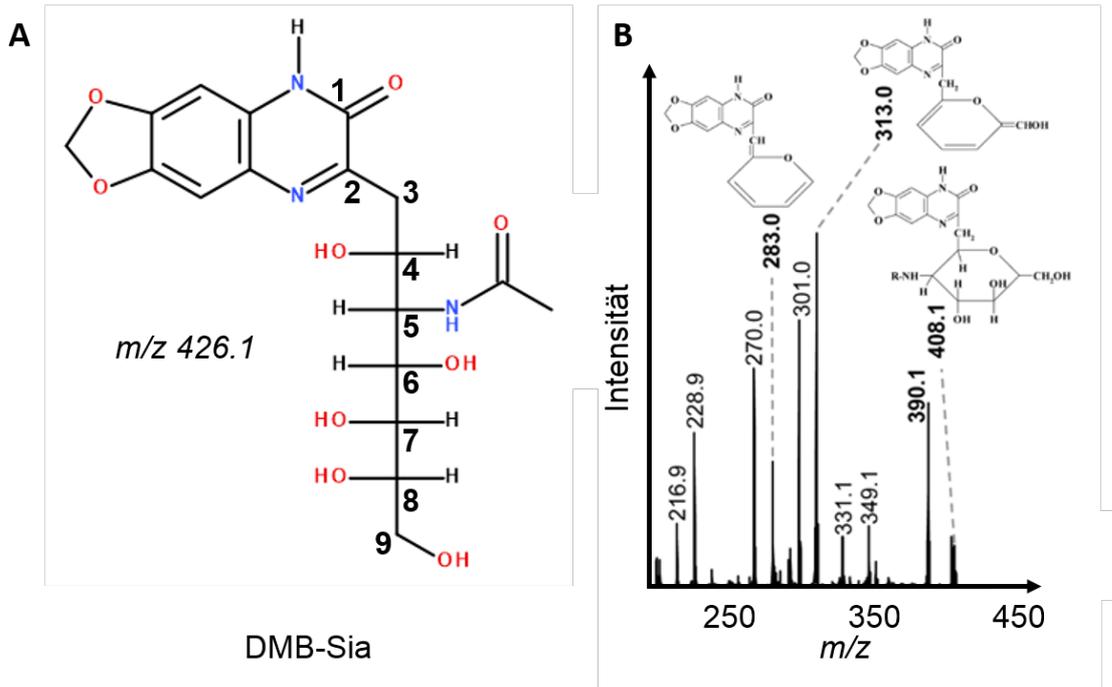


**Abbildung 4.15: Extrahierte Ionenchromatogramme von Natriumaddukten ( $[M+Na]^+$ ) der *N*-Acyl-Neuraminsäuren**

Für die Berechnung der extrahierten Ionenchromatogramme (EIC) wurden die  $m/z$ -Werte der Natriumaddukte ( $[M+Na]^+$ ) der entsprechenden Sialinsäure-Derivate gewählt, weil sie quantitativ die am häufigsten beobachteten Adduktformationen waren. Die EIC zeigt somit die bereinigte Chromatogrammspur für die einzelnen Komponenten Neu5Ac, Neu5Prop und Neu5But. Als Kontrolle dienten HUVECs, die in unbehandeltem Vollmedium kultiviert wurden.

und Neu5But bei diesen Signalen keine Massenladungsdifferenzen zu erwarten sind. Ebendies lässt sich beim direkten Vergleich der ESI-MS/MS-Spektren auch beobachten. Es gibt zahlreiche Signale, die bei allen Komponenten identische  $m/z$ -Werte aufweisen (Abbildung 4.17;  $m/z$  216,9, 228,9, 283,0, 301,0, 313,0, 331,1 and 349,1). Im Entstehungsprozess dieser Fragmentationen geht die *N*-Acyl-Kette wie beschrieben verloren. Weil die untersuchten Moleküle aber nur hier Massendifferenzen aufweisen, können keine  $m/z$ -Differenzen detektiert werden.

Bei anderen korrespondierenden Signalen lässt sich zwischen den Komponenten eine distinkte  $m/z$ -Differenz von 14 detektieren (Abbildung 4.17; Neu5Ac,  $m/z$  = 270,0; Neu5Prop,  $m/z$  = 284,0; Neu5But,  $m/z$  = 298,0). Diese entspricht den zusätzlichen Methylengruppen in den elongierten *N*-Acylketten von ManNProp und ManNBut. Hier erfolgt die Fragmentation folglich innerhalb der DMB-Modifikation, sodass die *N*-Acylreste der artifiziellen Sialinsäuren intakt bleiben. Ebenso führt die Fragmentation durch einfa-

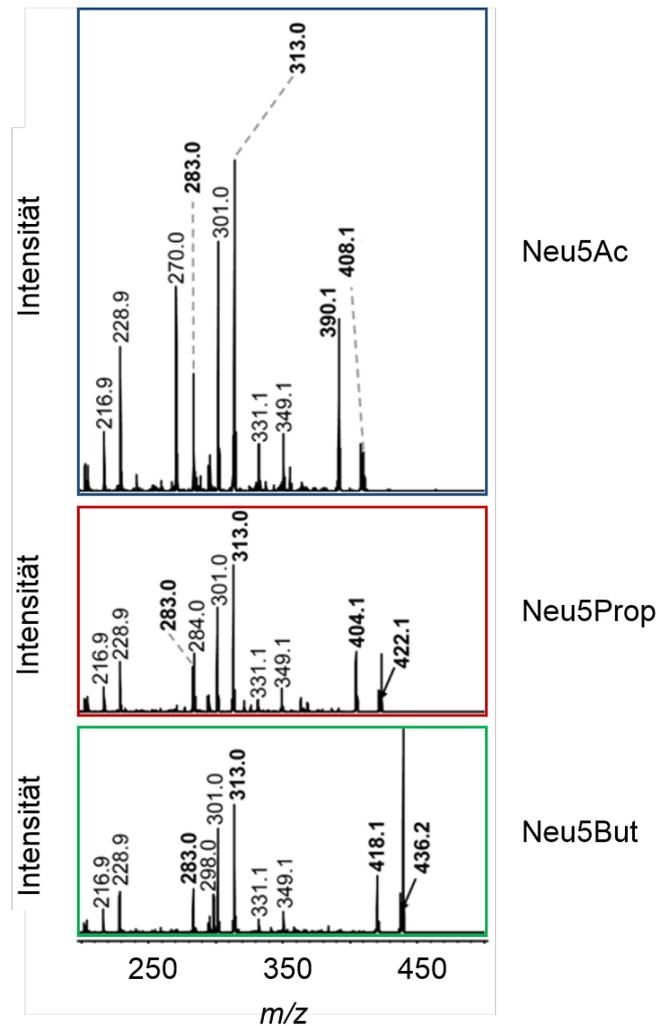


**Abbildung 4.16: Fragmentationsmuster von DMB-markierter N-Acetyl-Neuraminsäure**

Mit DMB konjugierte Sialinsäure vor Wasserabspaltung (**A**) wurde mittels nanoLC-ESI-MS separiert und massenspektrometrisch untersucht. Als Ausgangsion für MS/MS-Analysen (**B**) diente Neu5Ac nach Wasserabspaltung (Neu5Ac - H<sub>2</sub>O, *m/z* = 408,1), das als Protonenaddukt ([M+H]<sup>+</sup>) registriert werden konnte. Die Zuweisung der Fragmente erfolgte nach dem von Manzi et al. vorbeschriebenen Fragmentierungsmuster für DMB-konjugierte Sialinsäuren. Die monoisotopischen *m/z*-Werte der entsprechenden Fragmente sind hervorgehoben.

Die Wasserabspaltung zur Formierung von Ionen, deren Amino-Modifikation unverändert bleibt, und die infolgedessen ebenfalls charakteristische *m/z*-Differenzen von 14 aufweisen (Abbildung 4.17; Neu5Ac, *m/z* = 390,1; Neu5Prop, *m/z* = 404,1; Neu5But, *m/z* = 418,1).

Ähnliche Ergebnisse konnten nach äquivalenter Behandlung und Analyse von A549-Lungenepithelzellen und Caco-2-Darmepithelzellen beobachtet werden. Auch hier lassen sich Neu5Ac, Neu5Prop und Neu5But im Gesamtzelllysat chromatographisch und massenspektrometrisch nachweisen. Die Kultivierung und Substanzinkubation der Caco-2-Zellen wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Silvia Rudloff aus dem Institut für Ernährungswissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.



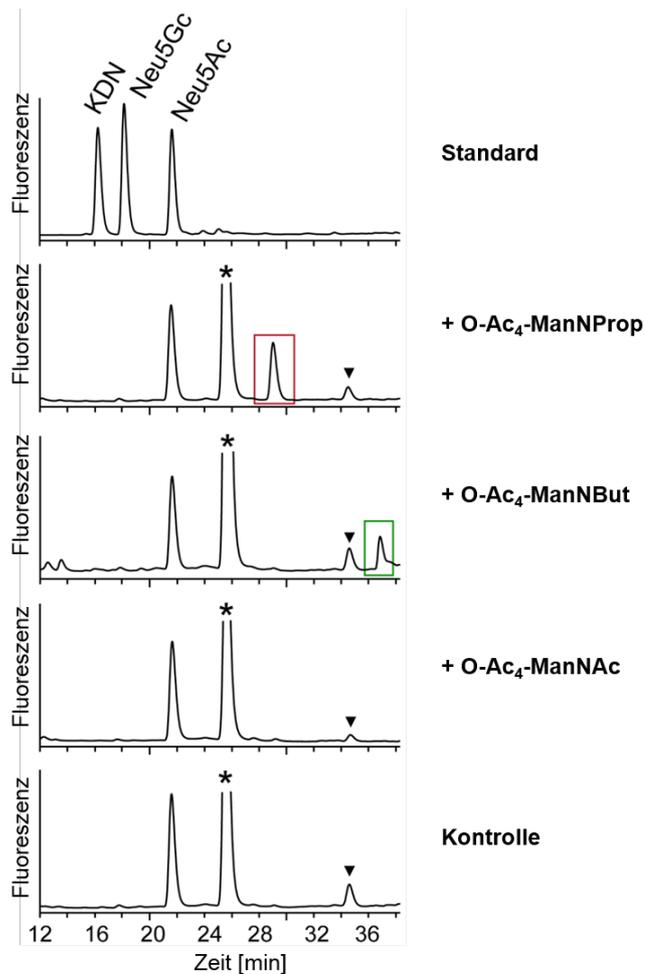
**Abbildung 4.17: Vergleich der ESI-MS/MS-Fragmentationsmuster von Neu5Ac, Neu5Prop und Neu5But**

Für MS/MS-Fragmentationsanalysen wurden nach Wasserabspaltung generierte Ausgangsionen gewählt. Neu5Ac, Neu5Prop und Neu5But wurden jeweils als Protonenaddukte ( $[M+H]^+$ ) registriert.

#### 4.2.3 Inkorporation von artifiziellen Sialinsäuren in zelluläre Glykoproteine in verschiedenen Zelllinien

Um in einem weiteren Schritt festzustellen, inwiefern die nachgewiesenen alterierten Sialinsäuren auch in neu synthetisierte zelluläre Glykoproteine inkorporiert wurden, wurde zunächst jeweils ein Aliquot des HUVEC-Gesamtzelllysates einer Chloroform/Methanol-Proteinextraktion unterzogen. Die dabei isolierten Proteine wurden, wie zuvor das vollständige Zelllysate, mittels DMB-Konjugation und RP-HPLC auf Sialinsäuren untersucht. Die gewonnenen Chromatogramme zeigen ein ähnliches Bild wie bei Analyse des Gesamtzelllysates. In allen Ansätzen inklusive der Kontrollzellen, die nicht mit ManNAc oder dessen artifiziellen Derivaten behandelt wurden, lässt sich Neu5Ac als physiologische

Sialinsäure weiterhin nachweisen (Abbildung 4.18, blaue und gelbe Box). Nach Inkubation mit *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp und *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut zeigt sich jeweils ein zusätzliches Signal bei höheren Retentionszeiten von 29,0 Minuten für Neu5Prop (Abbildung 4.18, rote Box) beziehungsweise 36,8 Minuten für Neu5But (Abbildung 4.18, grüne Box). Die größere Retentionszeit ist hier ebenfalls auf eine verstärkte Interaktion zwischen den elongierten *N*-Acylketten und der C-18-Säule zurückzuführen.

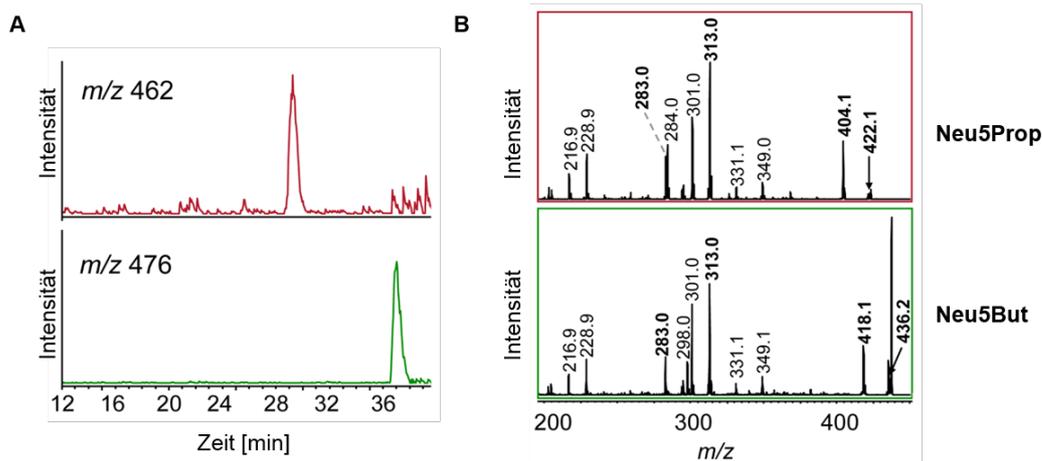


**Abbildung 4.18: RP-HPLC nach DMB-Fluoreszenzmarkierung der Sialinsäuren im Proteinextrakt von HUVECs**

Die Proben wurden nach Proteinextraktion mit Essigsäure behandelt, um gebundene Sialinsäure freizusetzen. Der Überstand wurde anschließend mit DMB behandelt und mittels RP-HPLC aufgetrennt. Als Kontrolle dienten unbehandelte HUVECs, die in unverändertem Vollmedium kultiviert wurden. Signale, die auf das DMB-Reagenz zurückzuführen sind, sind mit Asterisken gekennzeichnet, bisher unidentifizierte Verunreinigungen mit Pfeilen. In den Ansätzen von ManNProp und ManNAc sind die Signale für die physiologische Sialinsäure Neu5Ac sowie die Signale der artifiziiellen *N*-Acyl-Neuraminsäuren mit farbigen Boxen hervorgehoben.

Um die Struktur der detektierten Komponenten zu verifizieren, wurde wie zuvor bei den Zelllysaten vorgegangen. Im Rahmen von nanoLC-ESI-MS-Analysen wurden extrahier-

te Ionenchromatogramme von  $m/z$ -Werten, die den Natriumaddukten  $[M+Na]^+$  der *N*-Acetylneuraminsäureanaloge entsprachen, gewonnen. Hier zeigen sich Neu5Prop bei  $m/z = 462$  und Neu5But bei  $m/z = 476$  mit der charakteristischen Massendifferenz von 14 ohne koeluiierende Verunreinigungen (Abbildung 4.19 A). Für die Fragmentationsanalyse wurde ebenfalls wie bei den Gesamtzelllysaten vorgegangen. An Neu5R-Ausgangslösungen nach Wasserabspaltung (Neu5Ac -  $H_2O$ ,  $m/z = 408.1$ ; Neu5Prop -  $H_2O$ ,  $m/z = 422.1$ ; Neu5But -  $H_2O$ ,  $m/z = 436.2$ ) wurden ESI-MS/MS-Untersuchungen durchgeführt. Die gewonnenen Massenspektren zeigen das gleiche Muster wie das Zelllysate. Wie zuvor lassen sich Massensignale ohne Differenz zwischen den einzelnen Neu5R-Moleküle nachweisen, bei denen die Amidseitenketten eliminiert worden sind ( $m/z$  216,9, 228,9, 283,0, 301,0, 313,0, 331,1 und 349,1). Zugleich zeigen sich aber auch Ionen, bei denen die Fragmentation innerhalb der DMB-Modifikation (Abbildung 4.19 B: Neu5Ac,  $m/z$  270,0; Neu5Prop,  $m/z$  284,0; Neu5But,  $m/z$  298,0) oder durch Wasserabspaltung (Abbildung 4.19 B: Neu5Ac,  $m/z$  390,1; Neu5Prop,  $m/z$  404,1; Neu5But,  $m/z$  418,1) erfolgte.



**Abbildung 4.19: Extrahierte Ionenchromatogramme und ESI-MS/MS-Analyse inkorporierter *N*-Acyl-Sialinsäuren**

Die extrahierten Ionenchromatogramme (A) wurden anhand der registrierten Natriumaddukte ( $[M+Na]^+$ ) berechnet. In der Ionenfalle detektierte Ionen nach Wasserabspaltung konnten als Protonenaddukte ( $[M+H]^+$ ) registriert werden und wurden als Ausgang für MS/MS-Fragmentationsanalysen (B) verwendet.

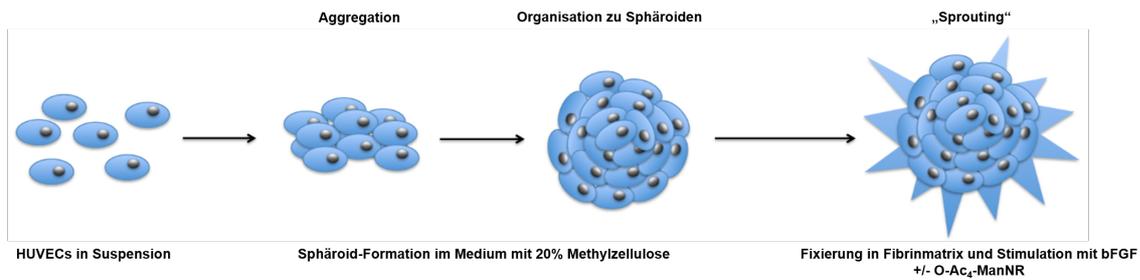
Wie auch zuvor ließen sich die Ergebnisse, die hier exemplarisch an HUVECs dargestellt wurden, für andere Zelllinien wie A549-Lungenepithelzellen sowie in Caco-2-Darmepithelzelllinien reproduzieren. Auch hier lässt sich eine Inkorporation der artifiziellen Sialinsäuren in zelluläre Glykoproteine feststellen.

### **4.3 Einfluss der modifizierten *N*-Acylierung von Sialinsäuren auf das angioproliferative Potential von Humanen Umbilicalen Venösen Endothelzellen**

Im nächsten Schritt wurden weiterführende Funktionsanalysen nach Substanzinkubation mit 2-*N*-Acyl-ManN-Derivaten durchgeführt, um weiterhin zu untersuchen, inwiefern die beobachtete Synthese und Inkorporation von *N*-Acyl-Neuraminsäuren in HUVECs auch funktionelle Konsequenzen für diesen Zelltypus im Speziellen hat. Die klinisch relevanteste Funktion der Endothelzellen ist es, unter hypoxischen Bedingungen auf parakrine Signale - vornehmlich VEGF (vascular endothelial growth factor) - hin, neue Gefäße zu bilden. Durch die so mit der Zeit gesteigerte Perfusion kann dann wieder ein hinreichender Sauerstoffpartialdruck im Gewebe erreicht werden. Besondere Bedeutung hat dieses Phänomen der Neoangiogenese im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen. Hier kommt es aufgrund der rapiden Proliferation regelhaft zu Gewebshypoxien, die zum einen eine Tumornekrose bewirken und zum anderen die Ausschüttung gefäßproliferativer Substanzen wie VEGF stimuliert. Um also zu beurteilen, ob HUVECs durch die beobachtete Inkorporation artifizieller Sialinsäuren in ihrer angioproliferativen Funktion beeinflusst werden, wurden sogenannte „Sprouting-Assays“ durchgeführt.

Hierzu wurden die isolierten und zunächst in regulärem Vollmedium kultivierten Zellen unter non-adhäsiven Bedingungen in Methylcellulose-haltigem Medium angeregt, sich zu multizellulären Sphäroiden zusammenzulagern. Diese Sphäroide wurden nun gepoolt und in eine Fibrinmatrix eingebettet, um eine adäquate extrazelluläre Matrix zu generieren, die für die Neoangiogenese unerlässlich ist. Die Stimulation zur Gefäßbildung erfolgte durch Zugabe von bFGF parallel zur Inkubation mit *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc, *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp oder *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut (Abbildung 4.20).

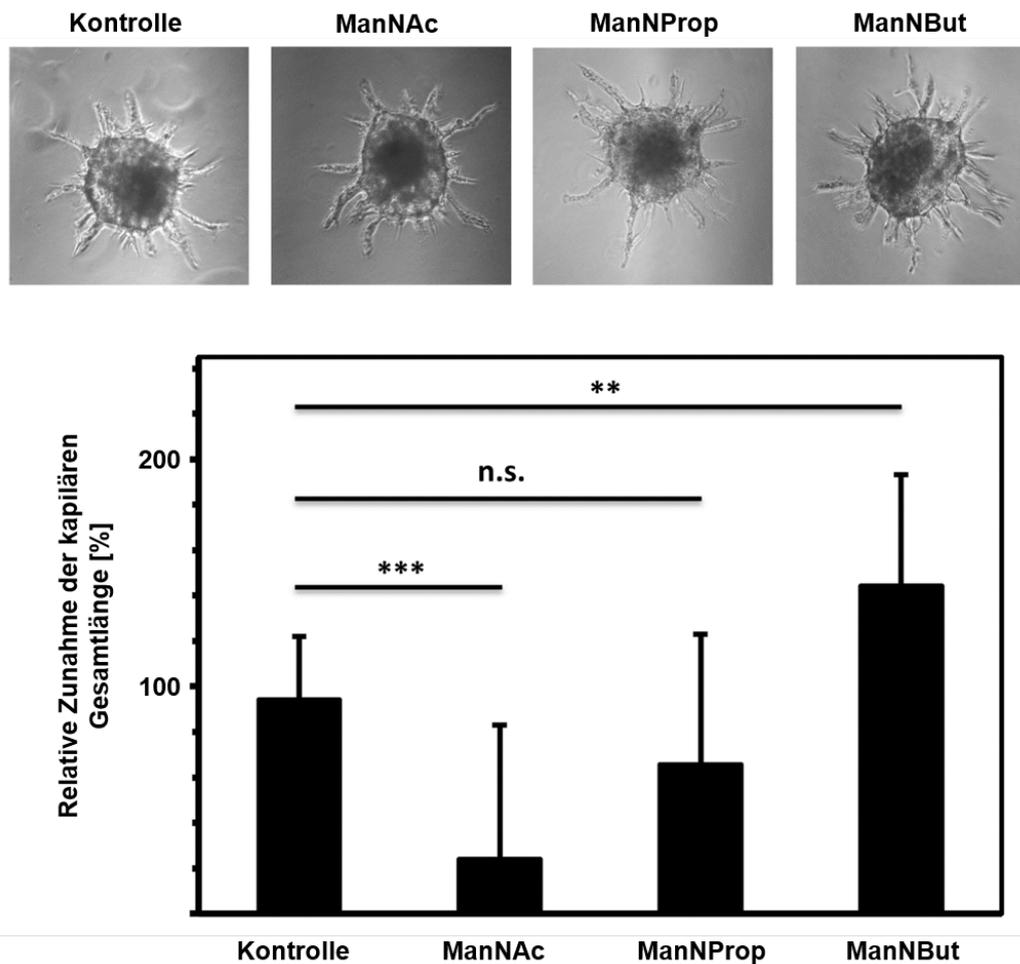
Nach der Inkubationszeit wurden die Sphäroide mit Paraformaldehyd fixiert und konfokalmikroskopisch untersucht. Als quantitatives Maß für die stattgefundenene Angiogenese wurde die kapilläre Gesamtlänge bestimmt, die als Parameter sowohl die Einzelkapillarmenge als auch die Anzahl der neu gebildeten Kapillaren einschließt. Überraschenderweise konnte bei Inkubation mit *O*-peracetyliertem Mannosamin, also dem physiologischen Substrat der Sialinsäurebiosynthese, eine deutliche Inhibition der Angiogenese festgestellt werden. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollsphäroiden zeigte sich hier eine um 75 % reduzierte kapilläre Gesamtlänge (Abbildung 4.21). Ein gegensätzliches Bild zeigte sich hingegen nach Inkubation der HUVEC-Sphäroide mit *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut. Hier war eine signifikant gesteigerte Angiogenese zu beobachten. Die gemessene kapil-



**Abbildung 4.20: Schema des dreidimensionalen Angiogeneseassays**

Die regulär kultivierten HUVECs wurden durch Trypsinbehandlung in Suspension gebracht und in einem Medium, das durch Zusatz von Methylzellulose non-adhäsive Eigenschaften sowie eine erhöhte Viskosität besaß, zur Formation von Endothelzellsphäroiden angeregt. Diese wurden in eine Fibrinmatrix eingebettet. Mit bFGF erfolgte die Stimulation zur Gefäßsprossung. Währenddessen wurde ein Teil der Sphäroide mit den jeweiligen *O*-Ac<sub>4</sub>-ManN-Derivaten inkubiert, während ein anderer Teil als Kontrollpopulation in unverändertem Medium ohne Zusätze kultiviert wurde. Modifiziert nach [Bayer et al., 2013].

läre Gesamtlänge lag dabei etwa 50 % höher als bei den Kontrollpopulationen, die ohne additive Mannosamin-Derivate kultiviert wurden (Abbildung 4.21). Im Unterschied zu ManNAc und ManNBut war bei der Inkubation mit *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp keine Veränderung in der Angiogenese detektierbar. Im Vergleich zur Kontrolle waren hier keine signifikanten Differenzen festzustellen (Abbildung 4.21).



**Abbildung 4.21: Mikroskopische Beurteilung der neu gebildeten Sphäroidkapillaren nach bFGF-Simulation**

Nach Inkubation wurden die stimulierten Sphäroide am Konfokalmikroskop untersucht und ausgemessen. Alle Kapillaren eines Sphäroids wurden gemessen und ihre Länge addiert, um die kapilläre Gesamtlänge zu erhalten. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Pro Versuchsansatz wurden dabei mindestens 12 Sphäroide ausgewertet. Die statistische Analyse erfolgte durch den zweiseitigen t-Test bei unterschiedlichen Varianzen der Stichproben. Die Signifikanzniveau der Ergebnisse sind wie folgt gekennzeichnet:  $p > 5\%$  - n.s. (nicht signifikant);  $p < 5\%$  - \*;  $p < 1\%$  - \*\*;  $p < 0,1\%$  - \*\*\*.

## Kapitel 5

### Diskussion

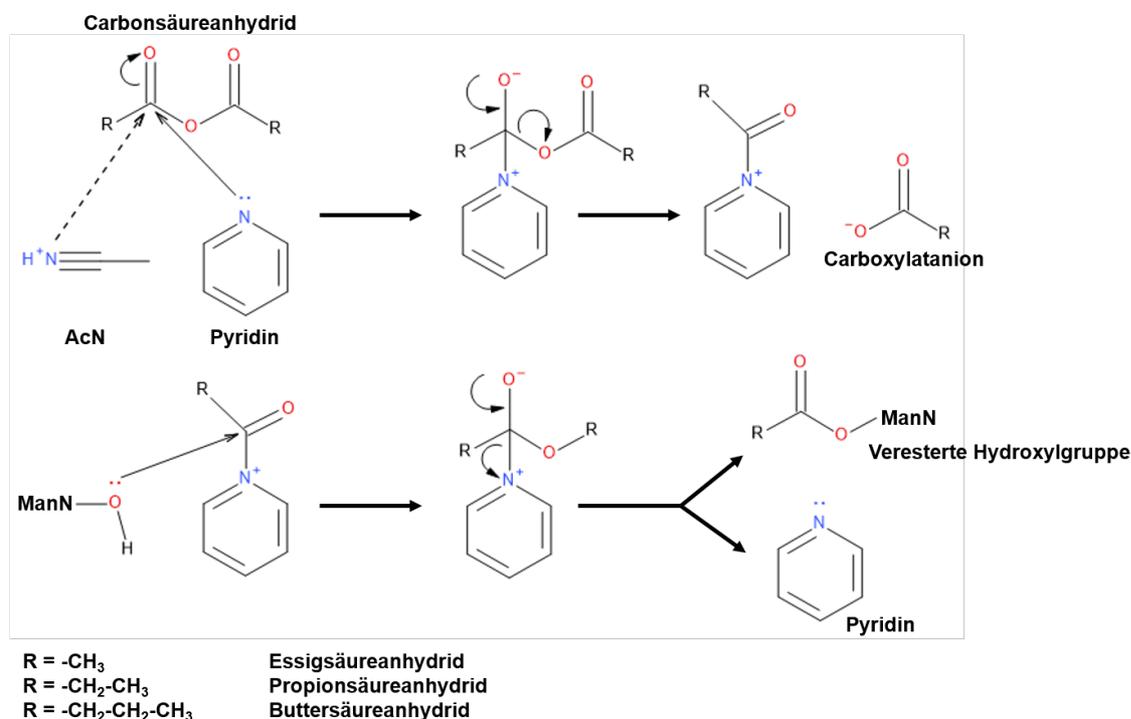
#### 5.1 Etablierung eines standardisierten Protokolls für die Synthese peracetylierter *N*-Acyl-Mannosamin-Derivate

##### 5.1.1 Abhängigkeit der Acylierung funktioneller Gruppen vom gewählten Lösungsmittel

Bei Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel bei den Acylierungsreaktionen im Rahmen des neuen Protokolls ließen sich auch nach Wiederholung in den Proben weder chromatographisch noch massenspektrometrisch Substanzspuren nachweisen. Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen sollte die Peracetylierung mit Essigsäureanhydrid allerdings eigentlich quantitativ erfolgen, sodass selbst bei erfolgloser Konjugation mit Propionsäure- oder Buttersäureanhydrid nach abschließender Reacetylierung als Produkt *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc nachweisbar sein müsste. Es liegt daher nahe, dass die erwünschte Konjugation der funktionellen Gruppen des Mannosamins gar nicht stattgefunden hat. Vor und nach Reaktion liegt damit als einzige Substanz D-Mannosamin in den Proben vor. Als hochgradig polares Molekül wird dieses jedoch kaum Interaktion mit der verwendeten C-18-Säule zeigen und wegen der infolgedessen niedrigen Retentionszeit im Durchlauf erscheinen. Zugleich ist nicht derivatisiertes Mannosamin nicht hinreichend flüchtig, um in die Gasphase überführt zu werden, was die ebenfalls negativen GC-MS-Ergebnisse erklärt.

Im Gegensatz dazu liefern die Reaktionen mit Pyridin als Lösungsmittel die erwarteten peracylierten Mannosaminderivate, wie die GC-MS-Spektren zeigen. Pyridin weist einen  $pK_a$  von circa 5,25 auf, liegt damit unter den Reaktionsbedingungen bevorzugt deprotoniert vor und kann daher wie seine Abkömmlinge als nucleophiler Katalysator für die Reaktion mit den Carbonsäureanhydriden dienen [Liu et al., 2014]. Acetonitril mit seiner hohen Basizität ( $pK_a$  ca. 25) hingegen liegt unter den Versuchsbedingungen vorzugsweise protoniert vor. Ohne freies Elektronenpaar kann kein nucleophiler Angriff auf die Carbonylgruppe der Carbonsäureanhydride erfolgen. Damit kann AcN als Lösungsmit-

tel die Funktion eines nucleophilen Katalysators nicht erfüllen, sodass die nur schwach nucleophilen Hydroxyl- und Aminogruppen des Ausgangssubstrates nicht hinreichend mit den Anhydriden interagieren können (Abbildung 5.1).



**Abbildung 5.1: Peracylierung von ManN mit Pyridin beziehungsweise Acetonitril**

Dargestellt ist die Reaktion von Carbonsäureanhydriden und den Lösungsmitteln Acetonitril und Pyridin. Pyridin kann als nucleophiler Katalysator fungieren, sodass eine Reaktion zwischen den funktionellen Gruppen von Mannosamin und den verschiedenen Carbonsäureanhydriden stattfinden kann. Dabei entsteht zu zwei Zeitpunkten jeweils ein kovalentes tetraedrisches Intermediat. Gezeigt ist die Reaktion mit den freien Hydroxylgruppen zu den korrespondierenden Estern. Die Reaktion der 5-NH<sub>2</sub>-Gruppe erfolgt analog unter Bildung der entsprechenden Säureamidverbindung. AcN liegt unter den Versuchsbedingungen vorzugsweise protoniert vor und kann daher nicht mit den Anhydriden reagieren. Modifiziert nach [Liu et al., 2014].

### 5.1.2 O-Dealkylierung mit Acetonitril und Triethylamin

Obwohl in der Theorie ein passendes Reagenz für die alkalische Ester-Hydrolyse, zeigen sich in der Praxis einige Probleme bei der Arbeit mit Triethylamin. In erster Linie ist es auch bei langer Inkubationszeit nicht dazu imstande, O-But<sub>4</sub>-ManNBut vollständig zu dealkylieren, sodass nach Reacetylierung dieses Intermediat als Verunreinigung immer noch in den Proben nachzuweisen ist. Dadurch sinkt konsekutiv auch die Umsatzrate zum Zielprodukt O-Ac<sub>4</sub>-ManNBut. Es müsste in zusätzlichen Schritten eine Aufreinigung von Produkt und Intermediat erfolgen, wobei man Letzteres einer erneuten

Spaltung mit Triethylamin unterziehen müsste.

Bei der Synthese von *O*-But<sub>4</sub>-ManNProp sind die unzureichend dealkylierten Zwischenprodukte nicht mehr nachweisbar. Stattdessen findet sich nach Reacetylierung ManNAc als Nebenprodukt. *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc kann bei der beschriebenen Reaktionsfolge für ManNProp nur entstehen, sofern bei der Reacetylierung mit Essigsäureanhydrid freie Aminogruppen vorliegen. Das wiederum bedeutet, dass die Reaktionsbedingungen bei der *O*-Dealkylierung mit Triethylamin zumindest teilweise auch zu einer Hydrolyse der Säureamidbindung im Aminopropionylrest führen können. Damit entsteht eine kleine Fraktion Mannosamin nach dem Dealkylierungsschritt, das daraufhin mit Essigsäureanhydrid zu *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc reagiert und als Verunreinigung im Versuchsansatz verbleibt. Zudem ist die Umsetzungsrate hier insgesamt deutlich niedriger als beim Ausgangsprotokoll. Der Grund hierfür muss also in einer zusätzlich beeinträchtigten Reacetylierung des im Rahmen der Triethylaminspaltung entstandenen ManNProp liegen. Triethylamin hat stark nucleophile Eigenschaften. Es reagiert daher bereitwillig mit Carbonsäureanhydriden. Jeder Triethylamin-Rückstand würde daher die Acetylierung freier Hydroxylgruppen mit Essigsäureanhydrid hemmen, weil Triethylamin das im Vergleich stärkere Nucleophil darstellt. In den Chromatogrammen nach Behandlung mit Triethylamin zeigen sich wie beschrieben zahlreiche Verunreinigungen, deren Fragmentationsmuster keinerlei Ähnlichkeit mit denjenigen der Mannosaminderivate aufweisen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass im Laufe der Reaktion Nebenprodukte entstehen, welche die Proben kontaminieren. Eine zusätzliche Schleppung mit Ethanol steigert weder Reinheitsgrad der Proben noch die Umsetzungsrate, sodass davon auszugehen ist, dass die entstandenen Nebenprodukte unter Vakuum nicht mehr flüchtig sind. Dadurch ist es in der Tat denkbar, dass störende, non-volatile Nucleophile den Ansatz für die Reacetylierung verunreinigen und die Reaktion zwischen *OH*-Gruppen und Essigsäureanhydrid behindern.

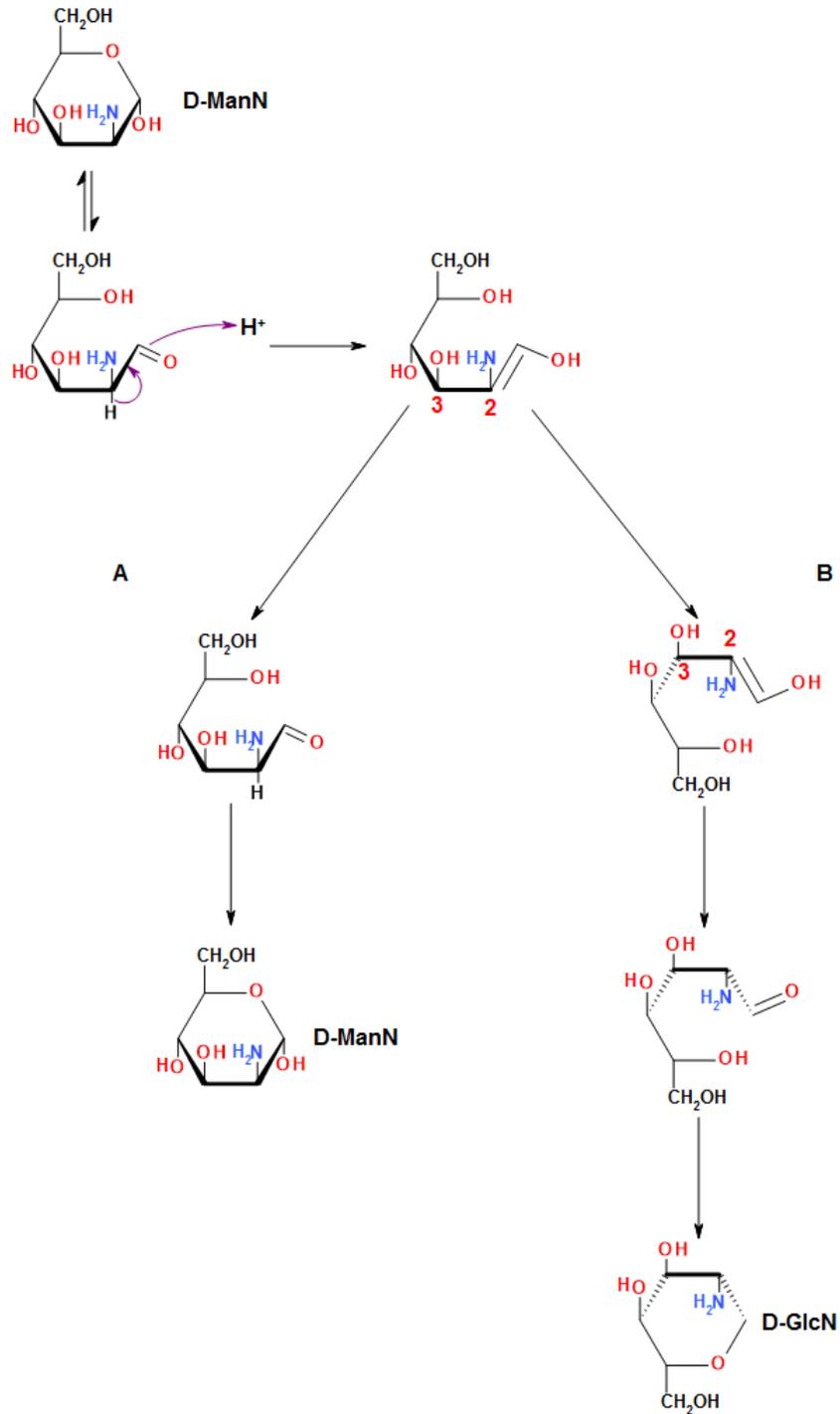
Die Esterhydrolyse mit Triethylamin ist somit unzureichend für die Synthese von *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut und führt in allen Ansätzen zur Bildung von nicht-flüchtigen Kontaminationen, die eine anschließende Säulenaufreinigung der Proben notwendig machen würde. Das und die darüber hinaus viel zu niedrige Umsetzungsrate - vor allem bei ManNBut - machen Triethylamin zu einem ungeeigneten Reagenz für eine effiziente Synthese artifiziel-ler Sialinsäurevorläufer.

### 5.1.3 O-Dealkylierung mit wässriger Natronlauge

Bei der Behandlung von *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc und *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp lassen sich nach Reacetylierung höhere Retentionszeiten in der Gaschromatographie beobachten als die Standards vermuten lassen. Die Differenz in den Retentionszeiten ist allerdings minimal, was letzten Endes nur durch eine kleine strukturelle Veränderung im Mannosamin-Molekül erklärt werden kann. Es ist beschrieben, dass es unter experimentellen Bedingungen zu einer Epimerisation von Mannose zu Glucose kommen kann. Ebenso ist auch eine Isomerisierung von chemisch modifizierten Derivaten der beiden Monosaccharide ineinander möglich [Meyer et al., 1999]. Weil die registrierten Retentionszeiten tatsächlich identisch sind mit denjenigen von *O*-Ac<sub>4</sub>-GlcNAc beziehungsweise *O*-Ac<sub>4</sub>-GlcNProp, ist also davon auszugehen, dass im Laufe der *O*-Deacetylierung eine Isomerisierung von Mannosamin zu Glucosamin stattgefunden hat. Eine hohe Protonenkonzentration, wie sie durch Zugabe der Essigsäure bei Neutralisation entsteht, kann zu einer Protonierung der Aldehydgruppe des Mannosamins führen, wodurch sich zwischen C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> eine planare Doppelbindung ausbildet. Durch eine intramolekulare Reorganisation kann sich die natürliche C<sub>1</sub>-Aldehydkonfiguration des Mannosamins wiederherstellen (Abbildung 5.2 A). Ebenso kann zunächst auch eine Rotation der Bindung zwischen C<sub>2</sub> und C<sub>3</sub> erfolgen. Dadurch werden C<sub>2</sub>-Aminogruppe und C<sub>3</sub>-Hydroxylgruppe aus der für Mannosamin charakteristischen *cis*-Konfiguration in eine *trans*-Konfiguration überführt. Wird dann durch intramolekulare Protonen-Reorganisation die Aldehydgruppe des ersten Kohlenstoffatoms wiederhergestellt, erhält man D-Glucosamin (Abbildung 5.2 B).

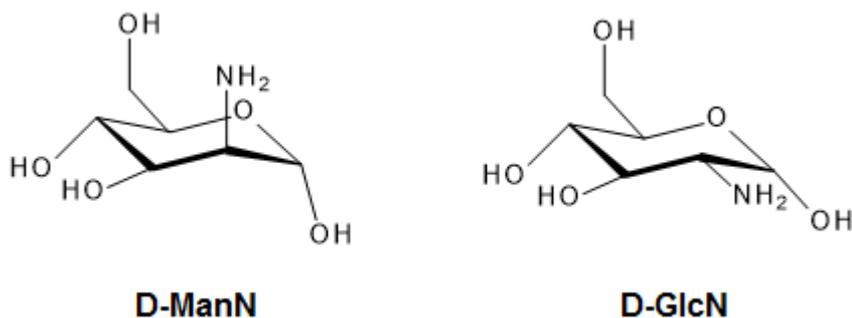
Vergleicht man die beiden Epimere strukturell miteinander, so ist erkennbar, dass sich die Aminogruppe beim Mannosamin in axialer Position befindet, während sie beim Glucosamin äquatorial ausgerichtet ist (Abbildung 5.3). Beim Mannosamin liegen Aminogruppe und Acetalsauerstoff räumlich näher beieinander. Durch sterische Behinderung und die elektrostatische Abstoßung zwischen den freien Elektronen von Stickstoff und Sauerstoff ist das Mannosaminmolekül dadurch thermodynamisch etwas instabiler als Glucosamin. Hier besteht durch die äquatoriale Lage eine große Distanz zwischen Stickstoff und Sauerstoff, sodass weniger Interaktionen zustande kommen.

Im sauren Milieu ist die Möglichkeit einer Isomerisierung von Mannosamin zu Glucosamin gegeben. Unter den gegebenen sauren Reaktionsbedingungen ist also davon auszugehen, dass es mit zunehmender Reaktionsdauer immer mehr zur dieser Epimerisierung zum thermodynamisch stabileren Glucosamin kommen wird.



**Abbildung 5.2: Hypothetischer Reaktionsmechanismus der Epimerisierung von ManN zu GlcN unter sauren Bedingungen**

Protonierung des offenkettigen Mannosamins im sauren Milieu. (A) Wiederherstellung der Mannosaminkonfiguration durch intramolekulare Umlagerung. (B) Rotation zwischen C<sub>2</sub> und C<sub>3</sub> mit anschließender Protonenumlagerung und Ringschluss führt zur Bildung von Glucosamin.



**Abbildung 5.3: Räumliche Konfiguration von ManN und GlcN**

Deutlich erkennbar ist die räumliche Nähe zwischen axialem Aminosubstituenten und hemiacetalbildendem Bindungssauerstoff im Mannosaminmolekül. Durch die äquatoriale Position im Glucosamin ist eine größere Distanz zwischen diesen beiden Elementen gegeben, wodurch Glucosamin thermodynamisch stabiler ist.

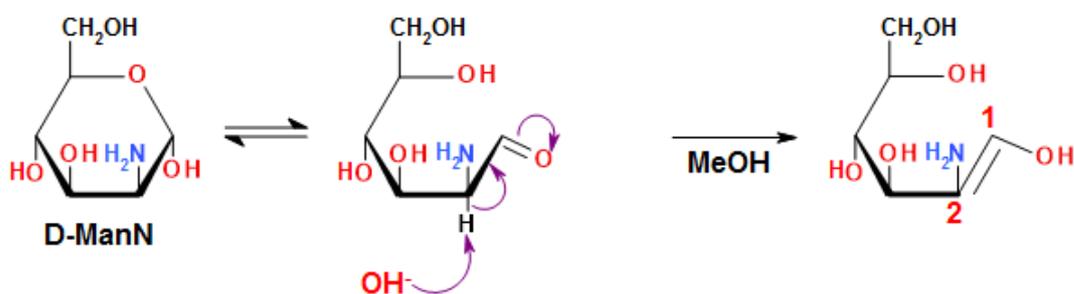
Obwohl *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc und *O*-Prop<sub>4</sub>-ManNProp mit wässriger Natronlauge erfolgreich *O*-dealkyliert werden konnten, war die Spaltung von *O*-But<sub>4</sub>-ManNBut unter diesen Bedingungen nicht möglich. Hier gelang es nach Perbutylierung nicht, die Probe in der eingesetzten Natronlauge zu solvatisieren. Folglich ist davon auszugehen, dass die entstandenen Derivate zu hydrophob sind, um mit hochpolarem NaOH zu interagieren. Ohne diese Interaktion bleiben die Esterbindungen unverändert, was gaschromatographisch auch zu beobachten war. Auch nach Behandlung mit Natronlauge und Essigsäureanhydrid war nach wie vor nur *O*-But<sub>4</sub>-ManNBut unverändert detektierbar. Damit ist wässrige Natronlauge als Reagenz für die routinemäßige *O*-spezifische Dealkylierung der gewonnenen peracylierten *N*-Acyl-Mannosamin-Produkte ungeeignet.

#### 5.1.4 *O*-Dealkylierung mit methanolischer Natronlauge

Unter Verwendung von Methanol als Lösungsmittel ließen sich alle peracylierten Mannosamin-derivate gleichermaßen gut in Lösung bringen. Die GC-MS-Analysen zeigen Fragmentierungsmuster mit distinkten *m/z*-Differenzen von 14 zwischen *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc und *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp sowie zwischen *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp und *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut. Die Proben unterscheiden sich also nur in einer Methylengruppe, wie es nach erfolgreicher Synthese zu erwarten wäre. Peracylierung, anschließende *O*-spezifische Dealkylierung und anschließende *O*-Acetylierung sind somit als erfolgreich zu werten.

In der nach Reacetylierung durchgeführten GC-Analyse zeigen sich bei *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut allerdings ähnliche Shifts in den Retentionszeiten wie sie zuvor bei der *O*-Dealkylierung mit wässriger Natronlauge bei *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc und *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp beobachtet werden konnten. Die Retentionszeiten entsprechen dabei denjenigen von *O*-Ac<sub>4</sub>-GlcNBut.

Weil die Peracylierung und Reacetylierung beide erfolgreich waren und ihre Reaktionsbedingungen unverändert geblieben sind, kann der hierfür verantwortliche Schritt nur die Hydrolyse mit methanolischer NaOH sein. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Bedingungen unter denen eine Epimerisierung von Mannosamin zu Glucosamin beobachtet werden konnte, wurde die alkalische Esterhydrolyse dieses Mal allerdings nicht durch Säureaddition neutralisiert. Es ist beschrieben, dass eine Isomerisierung, wie sie oben bereits erläutert worden ist, auch unter alkalischen Bedingungen auftreten kann [Chethana and Mushrif, 2015]. Es liegt daher nahe, dass die Isomerisierung in stabileres Glucosamin auch stattfinden kann, wenn das Ausgangssubstrat Mannosamin über einen längeren Zeitraum sehr alkalischen Bedingungen exponiert ist. Bei struktureller Betrachtung ist es unter alkalischen Bedingungen ebenso möglich wie unter sauren, dass sich zwischen C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> eine Doppelbindung ausbildet, wobei der C<sub>1</sub>-Aldehyd im protischen Methanol in einen Alkohol überführt wird. So entsteht dasselbe Intermediat wie unter sauren Reaktionsbedingungen (Abbildung 5.4).



**Abbildung 5.4: Hypothetische Reaktion von ManN unter alkalischen Bedingungen**

Unter Einwirkung der Natronlauge kann es zur Deprotonierung von Mannosamin an C<sub>2</sub> kommen, wodurch sich eine planare Doppelbindung zwischen C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> bildet. Durch Methanol als protisches Lösungsmittel reagiert der C<sub>1</sub>-Aldehyd nicht zum Alkoholation, sondern zum Alkohol. So entsteht dasselbe reaktive Intermediat wie unter sauren Bedingungen, welches sowohl zu Mannosamin als auch zu Glucosamin reagieren kann.

Nun kann sich abermals entweder das ursprüngliche Mannosamin durch intramolekulare Protonenumlagerung wiederherstellen (Abbildung 5.3 A). Alternativ kann auch hier zur Rotation zwischen C<sub>2</sub> und C<sub>3</sub> kommen, wodurch C<sub>2</sub>-Aminogruppe und C<sub>3</sub>-Hydroxylgruppe in *trans*-Konfiguration zueinander überführt werden, sodass Glucosamin gebildet wird (Abbildung 5.3 B). Weil Glucosamin wie zuvor beschrieben auch hier das thermodynamisch stabilere Isomer ist, wird mit zunehmender Reaktionsdauer mehr Epimerisierung stattfinden.

Die Reaktionslimitierung der *O*-Dealkylierung durch Frieren der Proben in flüssigem Stickstoff mit anschließender Lyophilisation ist offensichtlich hinreichend. Die erhaltenen GC-Profile zeigen keine für die Epimerisierung charakteristischen  $R_T$ -Shifts. Bei der Strukturverifikation zeigen sich im GC-MS die charakteristischen  $m/z$ -Differenzen zwischen den einzelnen Derivaten sowie Fragmentationsmuster, die den Standards entsprechen. Mittels ESI-MS-Untersuchungen lassen sich die Mutterionen mit den zu erwartenden  $m/z$ -Werten nachweisen. In der Zusammenschau von GC, GC-MS, ESI-MS und extern durchgeführter NMR-Analyse der synthetisierten Substanzen kann die Struktur von *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc, *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp und *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut als verifiziert gewertet werden. Als routinemäßig einsetzbares strukturanalytisches Verfahren zur Prozesskontrolle eignet sich vor allem die Gaschromatographie. Sie ist leicht und schnell durchzuführen und gestattet bei nur geringem Substanzeinsatz und -verlust eine zuverlässige Aussage über Reaktionserfolg, Reinheitsgrad, Epimerisierungs- und Umsetzungsrate der Gesamtsynthese.

Die nach dem neuen, dreischrittigen Protokoll synthetisierten Substanzen weisen einen hohen Reinheitsgrad ohne detektierbare Nebenprodukte auf, sodass keine zusätzliche Aufreinigung via HPLC notwendig ist. Bei quantitativer Umsetzung der Substrate im Rahmen der Peracylierung und der Reacetylierung muss folglich davon ausgegangen werden, dass das initial eingesetzte Mannosamin vollständig zu seinen korrespondierenden 1,3,4,6-*O*-Ac<sub>4</sub>-2-*N*-Acyl-ManN-Derivaten umgesetzt wird. Mit einer Reaktionsausbeute von 100 % ist das neue Syntheseprotokoll für *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc, *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp und *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut dem vorbeschriebenen eindeutig überlegen. Außerdem gestattet es die Synthese von peracetylierten *N*-Acetyl-Mannosamin-Analoga, bei denen eine deutlich höhere zelluläre Aufnahme *in vitro* zu erwarten ist.

Es ist allerdings anzumerken, dass die so beschriebene Synthese nur für kleine Substanzmengen von maximal 250 µg zuverlässig durchführbar ist. Beim Einsatz größerer Mengen ergeben sich Lösungsprobleme und deutlich unreinere Gaschromatogramme. Die Restriktion auf den Einsatz kleiner Substanzmengen stellt somit die größte Limitation des hier beschriebenen Protokolls dar.

## **5.2 Biokompatibilität der synthetisierten peracetylierten Mannosaminderivate**

Im Rahmen des Glycoengineering kann es je nach chemischer Modifikation der artifizellen Vorläufermoleküle entweder durch die Substanzen selbst oder aber durch Ne-

benprodukte, die bei ihrem Metabolismus entstehen, zu signifikanten Zellschäden kommen [Du et al., 2009]. Bei den untersuchten Konzentrationen von *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc, *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp und *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut zeigten sich im Zellüberstand keine signifikanten Unterschiede in der LDH-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Da die Laktatdehydrogenase ein cytosolisches Enzym ist, muss davon ausgegangen werden, dass die generelle Membranpermeabilität der Zellen unter Substanzeinwirkung unverändert bleibt. Die Komponenten scheinen somit keinen nennenswerten Einfluss auf die zelluläre Homöostase zu haben. Im Cytosol werden die peracetylierten Derivate zu den korrespondierenden *N*-Acyl-Mannosamin-Molekülen sowie zu vier Acetatmolekülen umgesetzt. Es ist also nicht nur davon auszugehen, dass das Aminoacylmannosamin keine schädliche Wirkung auf die Zellen ausübt, sondern dass darüber hinaus das cytosolisch entstehende Acetat ebenfalls nicht toxisch wirkt und wahrscheinlich tatsächlich über den Citratzyklus endoxidiert wird. Diese Erkenntnis ist insofern wichtig, als infolgedessen davon ausgegangen werden kann, dass alle weiteren beobachteten Veränderungen in den Anschlussexperimenten nicht auf Stressreaktionen oder homöostatische Störungen in den Zellen zurückzuführen sind.

Es muss jedoch festgehalten werden, dass mit der hier verwendeten LDH-Methode nur eine Aussage über die generelle Vitalität der Zellen getroffen wird. Inwiefern durch Behandlung der Zellen andere Eigenschaften beeinträchtigt werden, die für die zelltypischen Funktionen notwendig sind, ohne aber für das Zellüberleben an sich essenziell zu sein, kann durch diesen Assay nicht beurteilt werden.

Ebenso muss eingeräumt werden, dass der Verlust der Membranintegrität einer Zelle am Ende einer vielschichtigen Apoptosekaskade steht, die mit zahlreichen Signal- und Stoffwechselwegen quervernetzt ist. Theoretisch könnte also durch die eingesetzten Substanzen durchaus eine proapoptotische Tendenz in den untersuchten Zellen entstehen, die durch andere, LDH-unabhängige Methoden auch sensitiv beurteilt werden können [Archana et al., 2013; Yin and Miao, 2015]. Diese hypothetischen proapoptotischen Signale sind allerdings offensichtlich unzureichend, um eine Reorganisation auf höherer Strukturebene hervorzurufen. Die Relevanz solcher subzellulärer Phänomene für die Zellfunktionalität dürfte daher als eher niedrig eingestuft werden, sollte in weiteren Untersuchungen allerdings berücksichtigt werden.

In anderen Studien wurde bereits festgestellt, dass die *O*-Acetylierung von ManN und seinen Derivaten deren zelluläre Aufnahme um das 900-fache steigern kann [Hadfield et al., 1983; Jones et al., 2004; Aich et al., 2008]. Peracetyliertes *N*-Acyl-Mannosamin ist somit

ein geeignetes Substrat, um hohe cytosolische Konzentrationen artifizierlicher Sialinsäurevorläufer zu erreichen, ohne dabei cytotoxisch zu wirken. Bei längeren *O*-Acylierungen kann zwar eine noch höhere Lipophilie und damit einhergehend eine noch effizientere zelluläre Aufnahme erreicht werden, jedoch ist die Esterhydrolyse hier teilweise insuffizient, sodass als cytosolische Effektormoleküle partiell *O*-acylierte Intermediate entstehen, die teilweise nicht vollständig im Rahmen der Neu5Ac-Biosynthese verstoffwechselt werden und infolgedessen sialinsäureunabhängige Wirkungen hervorrufen [Du et al., 2009]. Ebenso können die hydrolytisch freigesetzten längeren SCFAs zum Teil nicht im Citratzyklus endoxidiert werden und entfalten dadurch selbst Wirkungen auf die Zielzelle [Sampathkumar et al., 2006a].

Die Ergebnisse waren für alle untersuchten Zelllinien identisch. Weil in anderen Publikationen andere Zelllinien auf die Cytotoxizität derselben Substanzen untersucht worden sind [Kim et al., 2004b], könnte man davon ausgehen, dass die *N*-Acyl-Mannosamin-Abkömmlinge unabhängig vom Zelltypus generell ein niedriges Toxizitätspotenzial aufweisen. In einigen anderen Versuchsansätzen wurden zwar nur reines *N*-Acyl-ManN als Substrat verwendet und nicht seine peracetylierten Formen wie hier, aber wie soeben beschrieben entsteht bei cytosolischer Esterhydrolyse zwangsläufig Acetat, das aber ebenfalls keinen Einfluss auf die Cytotoxizität in den untersuchten Zelllinien hat. Da es keinen Hinweis gibt, dass Acetat in irgendeinem anderen Zelltypus anders verstoffwechselt wird als in den untersuchten HUVECs und A549-Zellen, ist davon auszugehen, dass durch Peracetylierung auch in anderen Zelllinien keine erhöhte Cytotoxizität entsteht.

### **5.3 Metabolismus und Inkorporation artifizierlicher Sialinsäuren in Glykokonjugate**

Die RP-HPLC-Analysen der DMB-konjugierten Proben zeigten sowohl bei den Zellysaten als auch bei den Proteinextrakten das Vorhandensein von zusätzlichen fluoreszenzmarkierten Komponenten mit höheren Retentionszeiten als die physiologische Sialinsäure Neu5Ac. Weil die Konjugation mit DMB hochspezifisch für die  $C_1$ -Carboxy- $C_2$ -Keto-Konfiguration ist, welche eigentlich nur bei Sialinsäuren zu finden ist, kann es sich bei diesen Substanzen nur um alterierte Sialinsäuren handeln. Die hohe Retentionszeit weist hierbei auf eine verstärkte hydrophobe Interaktion zwischen Analysaten und C-18-Säule hin, wie sie zum Beispiel durch elongierte Acylmodifikationen entstehen kann. Die präsentierten chromatographischen Profile entsprechen dabei denjenigen, die von anderen Arbeitsgruppen gewonnen werden konnten [Hara et al., 1987; Galuska et al., 2010].

In den anschließend durchgeführten ESI-MS- und ESI-MS/MS-Untersuchungen konnten bei diesen neuen Signalen, die nach Behandlung der Zellen mit *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp und *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut detektiert werden konnten, eindeutig die Strukturen von Neu5Prop und Neu5But nachgewiesen werden, wie es zuvor in anderen Untersuchungen bereits demonstriert worden ist [Klein et al., 1997; Galuska et al., 2010]. Die dabei gewonnenen extrahierten Ionenchromatogramme zeigten, dass es sich um Reinsubstanzen ohne ko-eluierende Verunreinigungen handelt.

Damit konnte durch die Untersuchungen eindeutig nachgewiesen werden, dass HUVECs die peracetylierten *N*-Acetyl-Mannosamin-Analoga aufnehmen und im Rahmen der Sialinsäurebiosynthese zu den korrespondierenden *O*-Acyl-Neuraminsäuren umsetzen können. Diese Beobachtung bestätigt die schon von Gross et al. aufgestellte Vermutung, dass die an der Sialinsäurebiosynthese beteiligte Enzymmaschinerie, die sich an die Reaktion der UDP-*N*-Acetyl-Glucosamin-2-Epimerase (GNE) anschließt, permissiv für eingefügte Acyl-Modifikationen der Aminogruppe ist [Gross and Brossmer, 1988]. Im Gegensatz dazu weist die GNE für ausschließlich *N*-acetyliertes Glucosamin eine sehr hohe Spezifität auf [Du et al., 2009]. Glucosaminderivate mit elongierten Aminoacylresten werden hier nicht umgesetzt. Damit sind die synthetisierten und applizierten *O*-Ac<sub>4</sub>-*N*-Acyl-Mannosamine tatsächlich gut geeignete Moleküle, um im Zellkulturmodell artifizielle Sialinsäuren zu generieren.

Die Analysen der Proteinextrakte zeigen weiterhin, dass die cytosolisch generierten artifiziellen Sialinsäuren auch in neu synthetisierte Glykoproteine inkorporiert werden. Das wiederum bedeutet, dass freie *N*-Acyl-Neuraminsäuren auch innerhalb der Zelle transportiert und nucleär aktiviert werden können sowie auch von den Sialyltransferasen im endoplasmatischen Retikulum als Substrate akzeptiert werden. Die an diesen Prozessen beteiligten Enzyme weisen somit zumindest teilweise auch eine hohe Durchlässigkeit für Substrate mit verlängerten Aminoacylseitenketten auf. Einschränkend muss allerdings der globale Charakter der durchgeführten Analysen hingewiesen werden. Es lässt sich nämlich keine Aussage darüber treffen, ob alle Protein-Sialyltransferasen ein entsprechend promiskes Substratspektrum aufweisen, oder ob es nur spezifische Proteinsubfraktionen sind, die unter den beschriebenen Bedingungen eine alterierte Sialylierung erfahren. Hierzu wäre in einem nächsten Schritt sinnvoll repräsentative Sialoproteine nach Inkubation mit *O*-Ac<sub>4</sub>-*N*-Acyl-ManNR einzeln einer detaillierten Sialinsäureanalytik zu unterziehen.

Dennoch sind *O*-Ac<sub>4</sub>-*N*-Acyl-Mannosamine folglich geeignete Strukturen, um *in vitro* die

Oberflächensialylierung von HUVECs zu verändern. Im Rahmen des sogenannten Glycoengineering lassen sich mit diesen Komponenten also zuverlässig artifizielle Sialinsäuren in Oberflächenproteine integrieren, die sich ausschließlich in ihrer Aminomodifikation von den physiologischen Monosacchariden unterscheiden. Unter diesen Umständen kann folglich untersucht werden, welche Interaktionen und Funktionen der Sialinsäuren durch die chemischen Eigenschaften des Aminoacetylrests vermittelt werden.

Dabei muss allerdings einschränkend erwähnt werden, dass im Rahmen dieser Arbeit nur die Proteinphase von HUVEC-Zelllysaten auf ihre veränderte Sialylierung hin untersucht worden ist. Weitere wichtige Sialomoleküle auf der Zelle sind die Glykolipide und dabei vor allem die Glykosphingolipide. Ganglioside als wichtige Vertreter spielen eine große Rolle bei der Zellerkennung, Zell-Zell-Interaktionen oder als Rezeptoren für endo- oder exogene Signalmoleküle. Zum Teil werden sie auch in die extrazelluläre Matrix abgegeben. Inwiefern auch die Sialylierung entsprechender Lipidstrukturen durch *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNR-Applikation beeinflusst wird kann an dieser Stelle nicht definitiv beurteilt werden. Eine großer Teil der Säugetier-Sialyltransferasen erkennen und sialylieren Oligosaccharidmotive, die nicht spezifisch für Glykoproteine sind [Tiralongo and Martinez-Duncker, 2013]. ST3Gal und ST6Gal sind Vertreter von  $\beta$ -Galactosid-Sialyltransferasen, die Neu5Ac auf häufig vorkommende terminale Galactoseresiduen übertragen, die sowohl auf Glykoproteinen als auch auf Glykolipiden zu finden sind [Kitagawa and Paulson, 1994; Dall'Olio, 2000]. Bei nachgewiesener veränderter Sialylierung der Proteinfraction besteht daher zumindest grundsätzlich die Möglichkeit, dass die artifiziellen Sialinsäuren auch in entsprechende Glykomotive von Lipiden inkorporiert wurden. Eine Aussage hierüber ließe sich zum Beispiel treffen, wenn man die Produkte entsprechender Sialyltransferasen auf ihre Sialylierung hin untersuchen würde. Ließen sich alterierte Sialinsäuren in Glykoproteinen nachweisen, die ihre Oligosaccharidmotive mit Glykolipiden teilen, müsste auch von einer veränderten Sialylierung in den korrespondierenden Glykolipidmotiven auszugehen sein.

Es ist ergänzend festzuhalten, dass im Rahmen dieser Untersuchungen keine vollständige Quantifizierung der physiologischen und artifiziellen Sialinsäuren erfolgen konnte. Allerdings ist vorbeschrieben, dass die Behandlung von PC-12-Zellen mit ManNAc zu einer verstärkten Neu5-Ac-Synthese und infolgedessen zu einer gesteigerten CMP-Neu5Ac-Generierung führt, weil dieses Substrat die Feedbackinhibition der UDP-GlcNAc-2-Epimerase umgeht [Galuska et al., 2010]. Im Gegensatz dazu bleibt die Gesamtkonzentration der Sialinsäuren (Neu5Ac + Neu5Prop) bei Applikation von ManNProp identisch.

ManNProp konkurriert aufgrund seiner Strukturhomologie mit dem physiologischen Substrat ManNAc um die Enzymbindung [Grünholz et al., 1981]. Die physiologische *N*-Acetyl-Neuraminsäure wird also durch ihr artifizielles *N*-Propanoyl-Analogon ersetzt, ohne dass die Sialylierung zu- oder abnimmt [Galuska et al., 2010].

Diese Untersuchungen haben als Ausgangssubstrat nicht-peracetylierte Mannosamin-derivate gewählt, sondern einfaches *N*-Acyl-Mannosamin. *O*-Ac<sub>4</sub>-*N*-Acyl-Mannosamin wird wie beschrieben cytosolisch ebenfalls zu *N*-Acyl-Mannosamin hydrolysiert. Die intrazellulären Effektorsubstanzen sind damit identisch. Aufgrund der peracetylierungsbedingt höheren Lipophilie der Substanzen ist nur mit höheren intrazellulären Spiegeln zu rechnen. Somit wäre bei Inkubation mit *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc eine noch stärkere Stimulation der Neu5Ac- und CMP- $\beta$ -Neu5Ac-Synthese zu erwarten, während bei Inkubation mit *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp mit einer weiteren Verschiebung des Neu5Prop/Neu5Ac-Quotienten zu Neu5Prop zu rechnen wäre. Auch wenn eine eindeutige statistisch-quantitative Analyse der Ergebnisse nicht erfolgte, so konnten diese vorbeschriebenen Zusammenhänge in Einzelexperimenten ebenfalls beobachtet werden.

Ähnliche Ergebnisse ließen sich wie beschrieben auch nach der Behandlung von A549-Lungenepithelzellen und Caco-2-Zellen beobachten. Auch hier wurden die alterierten Vorläufermoleküle von den Zellen aufgenommen und in Oberflächenglykoproteine inkorporiert, wobei grundsätzlich natürlich dieselben Limitationen bestehen wie bei den HU-VECs. Durch Applikation von *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc und dessen *N*-Acyl-Analoga lässt sich also auch in diesen Zelllinien die Oberflächensialylierung gezielt modifizieren.

Zahlreiche pathogene Viren, allen voran die Influenzaviren, aber auch Polyoma- und Paramyxoviren, sind für eine suffiziente Adhäsion und Infektion der Zielzellen auf terminal sialylierte Virusrezeptoren angewiesen. Auch wenn bisher bei vielen noch unklar ist, welche Proteine definitiv als Rezeptoren fungieren, so ist für die Bindung in diesen Fällen jeweils das Vorhandensein von terminalen Sialinsäureresiduen essenziell. Für Polyoma- und Paramyxoviren konnte bereits *in vitro* nachgewiesen werden, dass die Behandlung der Zielzellen mit artifizialen Sialinsäurevorläufern, die elongierte Aminoacylmodifikationen aufweisen, die Infektionsrate deutlich modulieren kann [Keppler et al., 1995; Villar and Barroso, 2006]. Die zusätzlichen Methylengruppen in den Aminomodifikationen führen zur sterischen Behinderung der Interaktion zwischen Rezeptorsialinsäure und Virusoberflächenproteinen [Herrmann et al., 1997]. Es ist also durchaus zu vermuten, dass auch die Interaktion zwischen dem Influenza-Hämagglutinin und der als Rezeptor die-

nenden Sialinsäure auf eine ähnliche Art und Weise von den chemischen Eigenschaften des *N*-Acylrests abhängt. Die Integration artifizierlicher Sialinsäuren in die Glykokalix von Lungenepithelzellen, wie es im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt worden ist, kann also ebenfalls durch sterische Hinderung die Infektionsrate von Influenza-Viren senken, ohne dabei toxisch auf die Wirtszelle zu wirken [Keppler et al., 1998].

Ebenso wie im Respirationstrakt sind einige gastrointestinale Pathogene wie Rotaviren [Haselhorst et al., 2009] und *Helicobacter pylori* [Aspholm et al., 2006] als relevanteste Beispiele im Rahmen der Infektion auf eine Interaktion mit spezifischen Sialokonjugaten angewiesen. Auch bakterielle Toxine wie das Cholera-toxin von *Vibrio cholerae* [Varki, 2008] sowie die *E. coli*-Enterotoxine LT-I und LT-IIb müssen zunächst an spezifische sialylierte Ganglioside binden, bevor sie ihre zelluläre Wirkung entfalten können [Fukuta et al., 1988; Connell, 2007]. Die Behandlung von intestinalen Zellen, wie den hier untersuchten Caco-2-Zellen, könnte also genutzt werden, um im Zellkulturmodell zu determinieren, inwiefern die genannten Interaktionen mit zellulären Sialinsäuren ebenfalls von der chemischen Konfiguration des Aminoacylrests abhängen.

Interessanterweise ließ sich nach Inkubation der Caco-2-Zellen mit den jeweiligen *O*-Ac<sub>4</sub>-ManN-Derivaten ein reproduzierbarer Unterschied im Konfluenzgrad der Kulturen feststellen. Waren die unbehandelten Kulturen schon zu 90 % konfluent, zeigten sich die mit *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc, *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp und *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut behandelten Kulturen deutlich weniger zell dicht. Es wird diskutiert, dass intrazelluläre nucleotid-aktivierte Sialinsäuren Einfluss auf Genexpression, Zellproliferation und die Signaltransduktion über extrazellulär regulierte Kinasen (ERKs) haben können [Wang et al., 2006; Weidemann et al., 2010]. Ein veränderter Neu5Ac-Spiegel führt zu einer veränderten CMP-Neu5Ac-Konzentration, die den beobachteten Veränderungen zugrunde liegen könnte. Bemerkenswerterweise wurden diese Konfluenzunterschiede bei den anderen untersuchten Zelllinien nicht beobachtet, was wiederum ein Hinweis darauf sein könnte, dass die Sensitivität gegenüber CMP-Neu5Ac von der spezifischen Zelldifferenzierung abhängig ist.

Des Weiteren spielen bei der Differenzierung und Proliferation von Caco-2-Zellen insbesondere Ganglioside eine zentrale Rolle [Schnabl et al., 2009]. Eine Veränderung in diesen beiden Aspekten nach Behandlung mit *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp und *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut könnte somit ein Hinweis auf eine gewisse Permissivität der gangliosidspezifischen Sialyltransferasen für Substrate mit elongierten Aminoacylresten sein.

#### 5.4 Einfluss artifizierter *N*-Acylneuraminsäurevorläufer auf die Angiogenese *in vitro*

Schon vor einigen Jahren konnte beobachtet werden, dass sich im Rahmen angiogenetischer Prozesse das Sialylierungsmuster von Endothelzellen ändert [Willhauck et al., 2010]. Eine Inhibition der Oberflächensialylierung führt dabei zu einer stark reduzierten angioproliferativen Antwort [Chen et al., 2011]. Eine wichtige Rolle bei der Bildung von neuen Kapillaren spielt dabei die negative Ladung, die Sialinsäuren an ihrer C<sub>1</sub>-Carboxylgruppe unter physiologischen Bedingungen tragen. Durch eine negativ geladene Oberfläche kann es durch elektrostatische Abstoßungsprozesse zur Separation von Epithelien kommen, was essenziell für die Lumenformation im Rahmen der Angiogenese ist [Strilić et al., 2010]. Bei Behandlung von Zellen mit *N*-Acyl-Mannosamin konkurrieren artifizelle und physiologische Vorläufermoleküle um die Bindung mit den Enzymen der Sialinsäurebiosynthese. Entsprechend bleibt die Gesamtsialylierung der Zellen unverändert. Die neu synthetisierten *N*-Acyl-Neuraminsäuren ersetzen Neu5Ac stattdessen zu einem gewissen Teil. Nun unterscheiden sich die artifizellen Sialinsäuren allerdings ausschließlich in der Länge ihrer Aminoacylreste von ihrem physiologischen Analogon. An der für die Molekülladung relevanten C<sub>1</sub>-Carboxylgruppe ändert sich nichts, sodass bei insgesamt konstantem Sialylierungsgrad auch davon auszugehen ist, dass sich an der Oberflächenladung nichts ändert, wenn HUVECs mit *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp oder *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut behandelt werden. Dadurch lassen sich die beobachteten unterschiedlichen Effekte auf die Angiogenese folglich nicht erklären.

Die Stimulation der gebildeten Sphäroide erfolgte mit basic Fibroblast Growth Factor (bFGF, FGF-2), der seine zelluläre Wirkung entfaltet, indem er an einen Komplex aus dem Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) und Heparansulfat bindet [Delehedde et al., 2000; Eswarakumar et al., 2005]. Es ist aber beschrieben, dass die intensive *N*-Glykosylierung des FGF-Rezeptors zu einer reduzierten Interaktion der einzelnen Rezeptorkomponenten untereinander führt, was wiederum eine reduzierte zelluläre FGF-2-Wirkung zur Konsequenz hat [Duchesne et al., 2006]. Erhöhte cytosolische ManNAc-Konzentrationen durch Applikation von *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc führen zwar zu erhöhten intrazellulären Neu5Ac- und CMP-Neu5Ac-Spiegeln, ändern allerdings nichts an der Gesamtsialylierung der Zellen [Galuska et al., 2010]. Die Erklärung dafür liegt darin, dass bereits die physiologischen Neu5Ac-Konzentrationen weit über dem K<sub>M</sub>-Wert der Sialyltransferasen im Golgi-Apparat liegen [Monica et al., 1997]. Dadurch erreichen höhere CMP-Sia-Konzentrationen kaum eine Steigerung der Oberflächensialylierung. Allerdings kann es

trotz unveränderter Gesamtsialylierung durchaus zu einer veränderten Sialylierung von einzelnen Sialoglykanen kommen [Weinhold et al., 2012]. Vor diesem Hintergrund wäre es daher durchaus denkbar, dass die Behandlung mit *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc eine Steigerung der FGFR-Sialylierung bewirkt. Eine Aussage könnte hier aber nur getroffen werden, wenn man den FGF-Rezeptor isoliert auf seine Glykosylierung vor und nach Inkubation mit *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc untersucht.

ManNProp und ManNBut als artifizielle Sialinsäurevorläufer werden zwar inkorporiert, führen allerdings ebenfalls nicht zu einer veränderten Gesamtsialylierung der Zielzellen [Galuska et al., 2010]. Eine herabgesetzte *N*-Glykosylierung des FGF-Rezeptors ist damit unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht zu erwarten. Es wäre allerdings durchaus denkbar, dass hier die elongierten Aminoacylketten in den *N*-Glykanen der elektrostatischen Abstoßung, die zwischen den negativ geladenen Sialinsäure-Residuen besteht, durch hydrophobe Interaktionen entgegenwirken. Darüber hinaus muss erwähnt werden, dass die Bindung von angioproliferativen Signalmolekülen nicht nur durch die Glykosylierung des Rezeptorkomplexes moduliert wird. Auch die Bindung von anderen Membranproteinen wie Neuropilin-1 und Neuropilin-2 an VEGF [Soker et al., 1998; Ji et al., 2015] oder bFGF [West et al., 2005] führt zu einer gesteigerten zellulären Antwort und damit zu einer stärkeren Angiogenese. Eine veränderte Sialylierung mit hydrophoben Aminoacylresten könnte also die Bindungseigenschaften dieser Zielproteine entsprechend modifizieren und damit die Wirkung von bFGF auf HUVECs modulieren. Gerade Neuropilin 2 ist hier ein attraktiver Kandidat, weil dieses Protein wie oben beschrieben durch Polysialylierung in seinen Bindungseigenschaften massiv verändert werden kann. Die Polysialylierung wird dabei vor allem durch ST8SialIV herbeigeführt [Rollenhagen et al., 2013], der dominanten Polysialyltransferase in HUVECs. Um hier weiter zu forschen, ist es im nächsten Schritt indiziert, HUVECs *in vitro*, wie es hier beschrieben ist, mit den artifiziellen *O*-peracetylierten Sialinsäurevorläufern zu inkubieren und sie anschließend auf ihre Affinität, bFGF zu binden, zu untersuchen.

Interessanterweise konnte in unserem Labor von Sebastian Strubl (cand. med., AG Galuska, Daten noch nicht publiziert) in Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden, dass HUVECs eine Polysialinsäure-positive Zellpopulation sind. RT-PCR-Untersuchungen zeigten, dass vornehmlich die Polysialyltransferase ST8SialIV exprimiert wird und für die detektierte Polysialylierung verantwortlich ist (Daten bisher nicht publiziert). Wie von anderen Arbeitsgruppen bereits festgestellt, exprimieren HUVECs sowohl Neuropilin-2 [Ji et al., 2015] als auch NCAM, dessen Synthese durch Estradiol moduliert werden kann

[Park et al., 2010]. Damit tragen HUVECs zwei Substrate der Polysialyltransferase auf ihrer Oberfläche, deren Glykosylierung durch Applikation der *N*-Acyl-Mannosamin-Derivate verändert wird. Tatsächlich wurden die Einflüsse unterschiedlicher *N*-Acyl-Mannosamine auf die Polysialylierung bereits untersucht [Mahal et al., 2001]. Dabei wurde festgestellt, dass ManNBut als ein relativ spezifischer Inhibitor der Polysialylierung wirkt, wobei ST8SialII stärker gehemmt wird als ST8SialIV. CMP-Neu5But als Substrat wird nur mit einer deutlich reduzierten Effizienz umgesetzt und kann sogar die Kettenverlängerung terminieren. ManNProp hingegen wird zwar in die neu synthetisierten PolySia-Stränge inkorporiert, nimmt allerdings keinen Einfluss auf die Gesamtlänge der PolySia-Residuen. Höhere Konzentrationen von ManNAc als physiologischem Substrat können die Polysialylierung entsprechender Zielproteine wiederum steigern, was zusätzlich in unserer Arbeitsgruppe von Christina Ulm (Dr. hum. biol., AG Geyer) für NCAM bestätigt werden konnte [Horstkorte et al., 2004; Bork et al., 2005]. Übertragen auf die durchgeführten Angiogenese-Assays lässt sich ein ähnliches Muster erkennen. ManNBut stimuliert die Angiogenese, während ManNAc gegensätzlich wirkt und ManNProp keine signifikante Wirkung auf die Kapillarneubildung hat. Vor diesem Hintergrund wäre also zu vermuten, dass ManNBut beziehungsweise die korrespondierende Sialinsäure Neu5But die Polysialylierung der HUVECs reduziert, was zu einer gesteigerten Angiogenese führt. Diese Vermutung wird gestützt von Ergebnissen, die durch die Arbeit von Sebastian Strubl produziert werden konnten. Eine reduzierte Polysialylierung führt demnach *in vitro* zu einer gesteigerten Migrationskapazität von HUVECs. ManNAc hingegen stimuliert die Polysialylierung und bewirkt dadurch eine effiziente Inhibition, während Behandlung mit ManNProp keine Änderung des PolySia-Spiegels oder der Angiogenese zur Folge hat. Eine Erklärung kann darin liegen, dass durch eine reduzierte Polysialylierung NCAM vermehrt mit den Proteoglykanen der extrazellulären Matrix - also der Fibrinmatrix - interagieren kann, was im Rahmen der Zellmigration selbstverständlich unerlässlich ist [Guan et al., 2015]. Zudem moduliert NCAM über heterophile Interaktion mit dem FGF-Rezeptor dessen Aktivität [Francavilla et al., 2009]. Eine gesteigerte Polysialylierung verhindert die Assoziation von NCAM und FGFR und führt zu einer Inhibition des Signalwegs, während der Verlust von Polysialinsäure zu einer gesteigerten FGFR-abhängigen Stimulation des ERK1/2-Signalwegs führt [Eggers et al., 2011]. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass PolySia-NCAM ähnlich wie Heparansulfat bFGF in der extrazellulären Matrix binden kann [Ono et al., 2012]. Somit könnte eine Veränderung in der Polysialylierung auch eine veränderte bFGF-Bindung zur Konsequenz haben. Auf diese Art und Weise könnte eine

durch ManNBut reduzierte NCAM-Polysialylierung, wie soeben diskutiert, eine gesteigerte Angiogenese bewirken. Um allerdings eine definitive Aussage treffen zu können, wäre es hier notwendig nach Inkubation und Auswertung der Sphäroide eine zusätzliche Kettenlängenbestimmung der Polysialinsäuren anzuschließen. Mehrere Versuche nach durchgeführtem Sphäroidassay noch eine Sialinsäureanalytik durchzuführen sind in unserer Arbeitsgruppe allerdings aus technischen Gründen gescheitert. Die Auflösung der soliden und mit PFA denaturierten Fibrinmatrix ist mit enzymatischen Methoden nicht mehr möglich und bei rein mechanischen Homogenisierungsverfahren ist der Verlust der Proben zu groß, um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten.

Als mono- beziehungsweise oligosialylierte Zielproteine kommen die sialylierten Lewis-Antigene sLe<sup>x</sup> und sLe<sup>a</sup> sowie Integrin- $\beta_1$  in Frage, deren Glykananteil determinierend für ihre biologische Funktion ist [Isaji et al., 2009; Sato et al., 2009]. Diese Glykoproteine vermitteln über Selektine nicht nur die Rekrutierung von Leukozyten in das extravasale Gewebe, sondern auch angioproliferative Prozesse [Tei et al., 2002]. Hier ist jedoch eine positive Korrelation zwischen Sialylierungsgrad und Angiogenese beobachtet worden und eine Hemmung der Sialyltransferasen führte auch zu einer Abnahme in der Kapillarbildung. Die Inkubation mit ManNAc wird aber eher eine gesteigerte Sialylierung von Glykoproteinen zur Folge haben und müsste damit auch eher einen drosselnden Effekt ausüben. Neu5Prop und Neu5But hingegen werden zwar in Glykokonjugate inkorporiert, ändern an der Gesamtsialylierung allerdings nichts, sodass hier keine Veränderung zu erwarten wäre. Um zunächst aber eine zuverlässige Aussage über das Sialylierungsmuster der Lewis-Antigene und der Integrine unter den gegebenen Bedingungen zu treffen, wäre es hier in einem weiteren Schritt denkbar, aus dem Gesamtzelllysat mittels immunadsorptiven Methoden diese Kandidatenglykoproteine zu isolieren und in einem zweiten Schritt spezifisch auf ihr Sialylierungsmuster hin zu untersuchen.

Eine Vielzahl endothelialer Funktionen wird neben sialylierten Glykoproteinen durch sialylierte Glykolipide vermittelt. So scheinen Ganglioside beispielsweise eine Rolle bei angioproliferativen Prozessen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen zu spielen [Ziche et al., 1992; Alessandri et al., 1997; Manfredi et al., 1999]. Für die Synthese bestimmter Ganglioside ist eine zelluläre  $\alpha$ -2,8-Sialyltransferase-Aktivität notwendig. Artificielle Mannosamin-Derivate können wie beschrieben einen inhibitorischen Einfluss auf diese Klasse von Enzymen haben, weil ihre nucleotid-aktivierten Formen als Substrat deutlich schwächer gebunden werden können als CMP-Sia [Horstkorte et al., 2004]. Folglich ist zu vermuten, dass es auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchge-

fürten Experimenten zu einer veränderten Sialylierung von Glykolipiden und damit zur veränderten Expression von Gangliosiden gekommen ist. Eine Veränderung der physikochemischen Eigenschaften der Glykolipide könnte eine Alteration in ihren Funktionen zur Folge haben. So wird beispielsweise die Bindung von bFGF an Endothelzellen und damit seine zelluläre Wirkung auch durch einfache Ganglioside wie GM3 moduliert [Manfredi et al., 1999]. Jeder Einfluss auf die bFGF-Bindungsaffinität wäre somit ein Kombinationseffekt aus der artifiziellen Sialylierung von Glykoproteinen und Glykolipiden. Des Weiteren kolokalisieren manche Sialolipide wie GD3 oder GD1a mit  $\beta_1$ -Integrin und modulieren dessen Funktion [Giussani et al., 2014]. Dadurch kann auf intrazellulärer Ebene die konvergierende Signaltransduktion von Wachstumsfaktorrezeptoren beeinflusst werden [Tringali et al., 2012]. In welchem Maße sich die quantitative Verteilung der Ganglioside unter den beschriebenen Bedingungen verändert hat, lässt sich anhand der Ergebnisse nicht beurteilen und ist bisher nicht untersucht worden. Untersucht wurde in den durchgeführten Experimenten die Sialylierung in der Proteinphase, die Lipidphase wurde bei den Analysen nicht berücksichtigt. Die an der Synthese der Ganglioside beteiligten Sialyltransferasen weisen allerdings zum größten Teil eine ausgeprägte Spezifität für glykosylierte Ceramide auf und sind daher nicht an der posttranslationalen Modifikation von Proteinen beteiligt [Rimoldi et al., 2007]. Die Permissivität dieses Stoffwechselweges für artifizielle Sialinsäuren bleibt damit vorerst unklar.

Das Gangliosid GD3 ist ein potenter Stimulus der Apoptose in unterschiedlichen Zelllinien [Malisan and Testi, 2002]. In den durchgeführten Biokompatibilitätsassays konnte jedoch kein veränderter Zelluntergang detektiert werden. Entsprechend ist zumindest eine massive Änderung in der Konzentration oder Wirkung dieses Gangliosids nicht anzunehmen. Um sich hier weiter Klarheit zu verschaffen, wäre es sinnvoll, in einem nächsten Schritt die Versuche unter den gleichen Bedingungen zu wiederholen, aus dem Zelllysate die Lipide zu isolieren und diese wiederum einer Sialinsäureanalytik zu unterziehen.

Die Expression von Sialyltransferasen, die an der Biosynthese der Ganglioside GD3 und GM3 beteiligt sind, unterliegen zudem einer Regulation durch nucleäre UDP-GlcNAc-2-Epimerase (GNE) [Wang et al., 2006] ebenso wie andere für die Angiogenese essenzielle Gene [Xia and McEver, 2006]. Diese Wirkungen von GNE und Sia, die auf Ebene der Transkription eingreifen, sind erst vor kurzer Zeit erstmalig identifiziert worden [Kontou et al., 2008b] und zu einem großen Teil noch unverstanden. Zum einen erfüllt die Epimerase durch direkte Interaktion mit anderen zellulären Proteinen Funktionen, die unabhängig von der endogenen Sialinsäurebiosynthese sind [Weidemann et al., 2006; Am-

sili et al., 2008]. Zum anderen scheinen auch freie Sialinsäuren und Sialinsäurevorläufer im Sinne von *N*-Acyl-Mannosaminen Transkription und Signaltransduktion beeinflussen zu können [Weidemann et al., 2010]. Diese direkten Wirkungen sind für *N*-Acetyl- und *N*-Propanoyl-Mannosamin beschrieben und sind am ehesten auf die negative Ladung von CMP-Neu5R im Nucleus zurückzuführen [Kontou et al., 2009]. Die Ladung ist allerdings auch bei CMP-Neu5But identisch, sodass hier ähnliche Effekte zu erwarten wären. Des Weiteren führen sowohl ManNAc als auch ManNProp im Zellkulturmodell zu einer verstärkten Expression von GNE, was wie soeben beschrieben wiederum akzessorische Wirkungen hat [Kontou et al., 2008a], sowie zu einer Aktivierung des MAPK-Signalweges [Weidemann et al., 2010]. ManNBut wurde bei den durchgeführten Untersuchungen allerdings nicht berücksichtigt. Wegen seiner großen strukturellen Homologie dürften allerdings auch hier ähnliche Effekte erwartet werden. Diese Hypothese sollte allerdings im Zellkulturmodell zunächst noch verifiziert werden.

Nach Inkubation mit ManNProp zeigt sich im Vergleich allerdings keine signifikante Änderung im „capillary sprouting“ der Sphäroide, was letzten Endes nur zwei Rückschlüsse zulässt. Entweder spielen die hierüber regulierten Prozesse in der Angiogenese eine untergeordnete Rolle oder der hier erzielte Effekt wird von anderen zellulären Wirkungen überlagert. Auf die eine oder andere Art und Weise können die durch ManNProp hervorgerufenen zellulären Veränderungen, die zwischen ManNBut und ManNAc beobachteten Differenzen nicht erklären.

Zuletzt muss erwähnt werden, dass cytosolisches ManNAc beziehungsweise ManNProp oder ManNBut nicht vollständig in die Sialinsäurebiosynthese eingeschleust wird. Das Schrittmacherenzym UDP-GlcNAc 2-Epimerase weist eine deutliche Reaktionsspezifität von GlcNAc zu ManNAc auf. Hier erfolgt unter physiologischen Bedingungen kein Rückfluss in den Hexosaminweg. Neben diesem Enzym wird allerdings auch die GlcNAc-2-Epimerase exprimiert, die mit freiem ManNAc oder GlcNAc als Substrat reagiert. Das Gleichgewicht dieser enzymkatalysierten Reaktion liegt nicht eindeutig auf Seiten des ManNAc [Luchansky et al., 2003]. Eine hohe cytosolische Konzentration an *N*-Acyl-ManN-Derivaten kann damit das Gleichgewicht der Reaktion verschieben und einen Fluss von *N*-Acyl-ManN zu *N*-Acyl-GlcN bewirken, das wiederum als artifizieller Baustein in Glykane inkorporiert werden kann. Außerdem scheinen *N*-Acyl-Mannosamine *in vitro* auch direkt mit der *O*-spezifischen Übertragung von GlcNAc auf Zielsubstrate zu interferieren [Bork et al., 2008]. Somit wäre unter den gegebenen Versuchsbedingungen auch eine Modifikation der Glucosaminresiduen in Glykoproteinen und -lipiden möglich, was wide-

rum Konsequenzen für die Signaltransduktion von Zellen hat [Zachara and Hart, 2006]. Die Untersuchung dieser Glucosaminreste ist allerdings schwierig, da Glucosamin sich strukturell von anderen Monosacchariden nicht in demselben Maß unterscheidet wie von Sialinsäuren. Um folglich beurteilen und quantifizieren zu können, wieviel *N*-Acyl-GlcN unter den hier beschriebenen Versuchsbedingungen entsteht, wäre eine weiterführende differenzierte Kohlenhydratanalytik notwendig.

Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass eine Vielzahl zellulärer und interzellulärer Prozesse durch die veränderte Sialylierung unter ManNAc- und ManNBut-Behandlung von HUVECs beeinflusst werden. Einige dieser Veränderungen wären erwartungsgemäß angioproliferativ, während bei anderen ein hemmender Effekt zu erwarten wäre. Daher muss auch von zahlreichen Superpositionsphänomenen ausgegangen werden, wobei durch die gesteigerte Sialylierung unter ManNAc die inhibitorische Komponente überwiegt, während die Inkorporation von Neu5But in Glykokonjugate zu einer deutlichen Stimulation der Angiogenese führt. Alle Betrachtungen, die in diesem Feld bisher angestellt wurden, waren rein phänomenologischer Natur. Der Sialylierungsgrad einzelner Proteine oder Lipide wurde quantifiziert, die dabei beobachtete Angiogenese wurde beurteilt. Welche strukturchemischen Eigenschaften der Sialinsäuren - abgesehen von ihrer negativen Ladung - essenziell für diese Prozesse sind, kann dabei nicht eindeutig determiniert werden. Die artifizielle Neu5But unterscheidet sich strukturell von der physiologischen Neu5Ac nur in ihrer Aminomodifikation. *N*-Acyl-Mannosamine nehmen - abgesehen von den Polysialinsäuren - keinen nennenswerten Einfluss auf die Gesamtsialylierung einer Zelle, sodass unsere Beobachtungen nahelegen, dass eine Vielzahl der sialinsäureabhängigen Prozesse im Rahmen der Angiogenese durch eine spezifische Erkennung oder Interaktion mit der Neu5R-Aminogruppe vermittelt werden. Gerade die *N*-Butyl-Modifikation hat charakteristische Eigenschaften, die entsprechende Bindungsphänomene beeinflussen kann. *N*-Propionyl-Ketten sind oft zu kurz, um eine Änderung der Bindungsaffinität zu bewirken. Der *N*-Butyl-Rest ist mit einer zusätzlichen Methylengruppe räumlich voluminöser und darüber hinaus in seiner Struktur sehr rigide. Längere Acyl-Modifikationen wie *N*-pentyl-Reste sind flexibler und können sich durch Rotationsphänomene an sterische Gegebenheiten besser anpassen [Horstkorte et al., 2004]. In Abbildung 5.5 und Abbildung 5.6 sind die möglichen Wirkungen von ManNAc und ManNBut auf HUVECs und ihre angioproliferativen Eigenschaften zusammenfassend dargestellt. ManNProp wurde dabei nicht berücksichtigt, weil hier wie zuvor diskutiert

in den durchgeführten Sphäroid-Assays keine Veränderungen im „capillary sprouting“ festgestellt werden konnten.

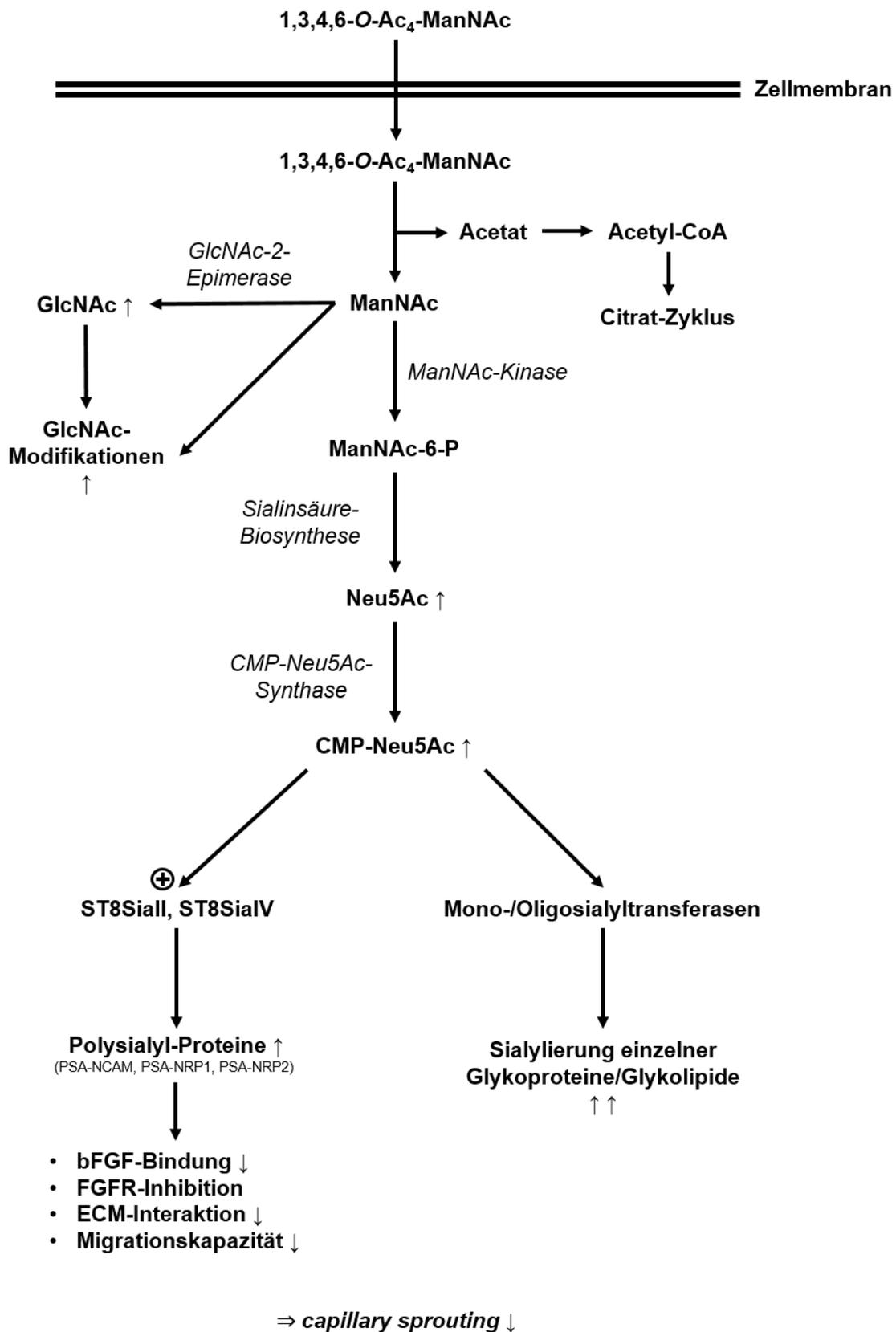


Abbildung 5.5: Potenzielle Wirkungen von O-Ac<sub>4</sub>-ManNAc auf HUVECs

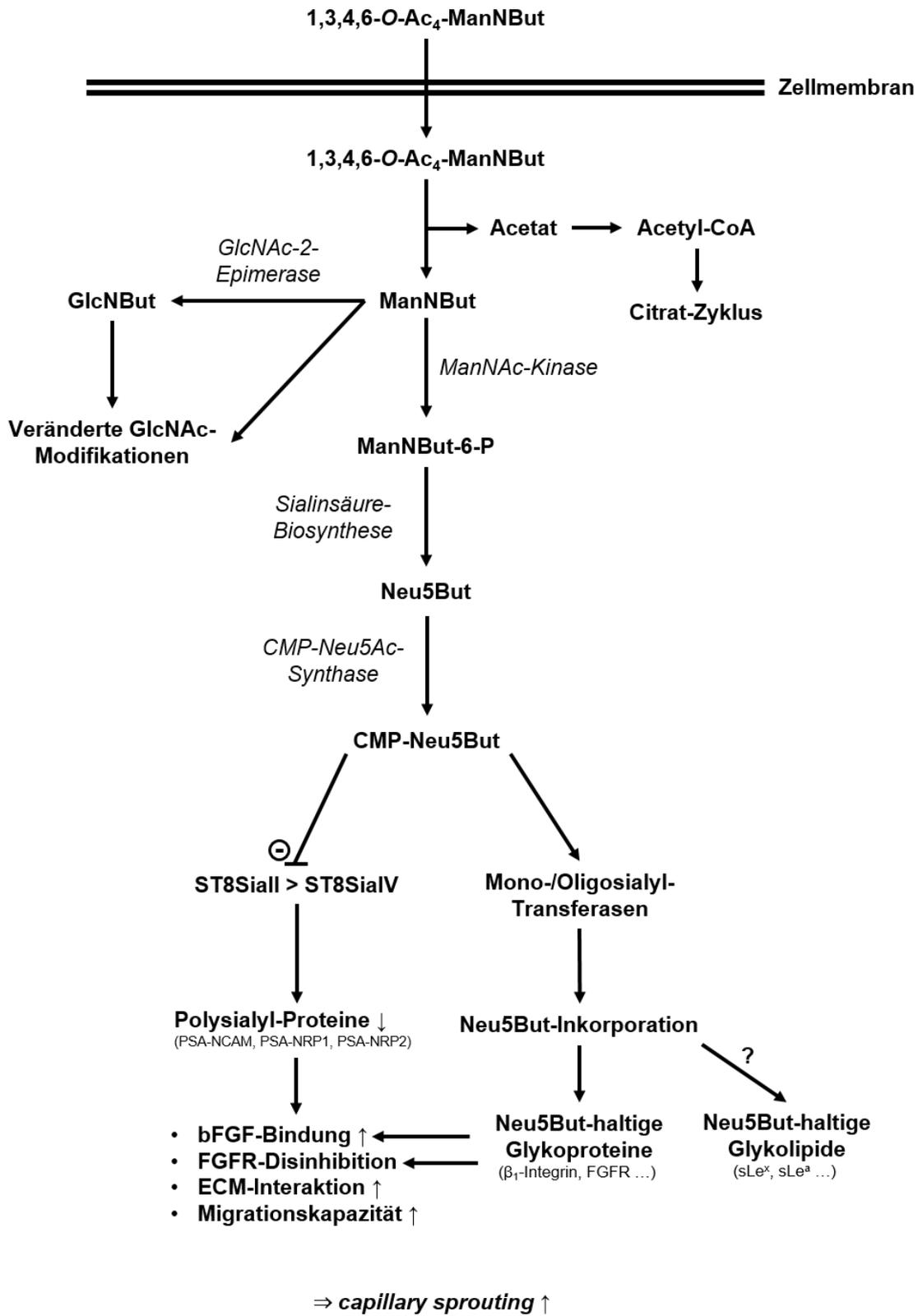


Abbildung 5.6: Potenzielle Wirkungen von O-Ac<sub>4</sub>-ManNBut auf HUVECs

## Kapitel 6

### Zusammenfassung

Die Sialinsäurebiosynthese weist eine hohe Substratpermissivität auf, sodass die Sialylierung leicht durch Einbringung von chemisch modifizierten Vorläufermolekülen verändert werden kann. *N*-Acetyl-Mannosamin-Derivate sind gut charakterisiert und die am häufigsten eingesetzten Substanzen, um die Zellsialylierung zu modulieren. Das bisher eingesetzte Protokoll für die Synthese von *N*-Acyl-Mannosamin-Derivaten zeigt eine geringe Reaktionsausbeute und erfordert eine HPLC-Reinigung der Produkte. ManNAc und seine artifizialen Analoga werden zudem nur in geringem Ausmaß von Zellen aufgenommen und umgesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues, dreischnittiges Protokoll für die Synthese von *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc, *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp und *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut etabliert, das bei einer Ausbeute von 100 % und reinen Produkten, die keiner Reinigung bedürfen, zusätzlich die Synthese von peracetylierten Komponenten gestattet, die zelluläre Membranen leichter permeieren können. Dabei konnte festgestellt werden, dass Mannosamin im sauren und alkalischen Milieu eine Tendenz hat, zum thermodynamisch stabileren Glucosamin zu epimerisieren. Im nächsten Schritt wurden humane umbilicale Endothelzellen, A549-Lungenepithel- und Caco-2-Darmepithelzellen mit den Substanzen behandelt. Die Biokompatibilitätsprüfung zeigte dabei keine nennenswerte Cytotoxizität. Durch Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp und *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut zu den korrespondierenden *N*-Acyl-Neuraminsäuren umgesetzt und in zelluläre Glykoproteine inkorporiert wurden. HUVECs wurden nach Substanzinkubation mikroskopischen Analysen unterzogen, um Veränderungen in ihrem angioproliferativen Potenzial zu detektieren. Dabei zeigte sich, dass die Behandlung mit dem physiologischen Vorläufer ManNAc zu einer deutlich reduzierten Angiogenese führt, während die Behandlung mit *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut eine gesteigerte Kapillarbildung zur Konsequenz hat. Ausgehend von den gewonnenen Daten kann also postuliert werden, dass zentrale Prozesse der Angiogenese durch die physikochemischen Eigenschaften der Aminogruppe von Sialinsäuren vermittelt werden, die folglich durch Behandlung mit *N*-Acyl-Mannosamin moduliert werden können.

## Kapitel 7

### Summary

The sialic acid biosynthetic pathway exhibits a wide substrate permissivity. Thus, sialylation can easily be modified through application of chemically altered precursor molecules. In this regard, *N*-acetyl-mannosamine-derivatives are characterized quite well and preferred as substrates to alter cell sialylation. The preexisting protocol for the synthesis of *N*-acyl-ManN exhibits a low yield and the products need to be purified *via* LC. ManNAc and its artificial derivatives are only able to penetrate cellular membranes to a small extent. Hence, only a small fraction of the applied substances is actually transformed into their corresponding artificial sialic acids. Within this doctoral thesis it was possible to establish a new and standardized three-step protocol for the synthesis of *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNAc, *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp and *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut. The yield was approximately 100 % and the final substances showed no byproducts, making additional purification steps unnecessary. Additionally it allows the synthesis of peracetylated products with increased cellular uptake. During the process it could be determined that mannosamine exhibits a tendency to transform into its thermodynamically more stable epimer glucosamine under acidic and alkaline conditions. The substances were subsequently applied to different cell lines - human umbilical endothelial cells, A549 pulmonal epithelial cells and Caco-2 intestinal epithelial cells. As shown before, they proved to be fully biocompatible, showing no increase in cytotoxicity. Furthermore, as affirmed by means of liquid chromatography and mass spectrometry, *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNProp and *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut were successfully metabolized to the corresponding artificial sialic acids, which were subsequently incorporated into cellular glycoproteins. HUVECs were analyzed microscopically to determine any change in their angioproliferative capacity after incubation with the respective ManNAc-analogue. HUVEC-spheroids showed a decrease in capillary sprouting when cells were treated with the physiological precursor ManNAc. Incubation with *O*-Ac<sub>4</sub>-ManNBut, however, lead to increased angiogenesis. The obtained data suggest that certain critical steps in angiogenesis are mediated by the physicochemical properties of the amino-residue in sialic acids. These can in consequence be modulated through application of *N*-acyl-mannosamine.

## Kapitel 8

### Abbildungsverzeichnis

1.1	Struktur der einzelnen Sialinsäuren . . . . .	3
1.2	Struktur der häufigsten Neu5Ac-Verbindungen . . . . .	4
1.3	Das neuronale Zell-Adhäsions-Molekül NCAM . . . . .	7
1.4	Biosynthese der Sialinsäuren . . . . .	9
1.5	Biosynthese und Degradation von Sialokonjugaten . . . . .	10
1.6	Struktur der sialylierten Lewis-Antigene . . . . .	11
1.7	Funktionen von Polysialinsäuren am Beispiel von PolySia-NCAM . . . . .	12
1.8	Einschleusung artifizierlicher Vorläufer in die Sialinsäurebiosynthese . . . . .	16
4.1	HPLC-Analyse der Produkte nach Reacetylierung mit Acetonitril als Lösungsmittel . . . . .	30
4.2	GC-Analyse der Produkte nach Peracetylierung mit Pyridin als Lösungsmittel	31
4.3	Alkalische Esterhydrolyse mit Acetonitril und Triethylamin . . . . .	32
4.4	GC-Analyse von ManNAc und ManNProp nach Reacetylierung im Vergleich zu Standardsubstanzen . . . . .	33
4.5	ManNBut nach Reacetylierung im Vergleich zu ManNBut nach Perbutylierung . . . . .	34
4.6	GC-Analyse von <i>O</i> -Ac <sub>4</sub> -ManNAc im Vergleich zum Standard . . . . .	36
4.7	GC-Analyse von <i>O</i> -Ac <sub>4</sub> -ManNAc im Vergleich zu <i>O</i> -Ac <sub>4</sub> -GlcNAc . . . . .	36
4.8	GC-Analyse zur Epimerisierung von ManN zu GlcN unter sauren Reaktionsbedingungen . . . . .	37
4.9	GC-Chromatogramm von <i>O</i> -Ac <sub>4</sub> -ManNBut nach Spaltung mit methanolischer NaOH . . . . .	39
4.10	ESI-MS-Analyse der nach dem neuen Protokoll synthetisierten ManNAc-Analoga . . . . .	40
4.11	GC-Profil und GC-MS-Spektren der Proben im Vergleich zu den Standardsubstanzen . . . . .	41

4.12	GC-Profile der peracetylierten <i>N</i> -Acyl-Mannosamin-Derivate . . . . .	42
4.13	Biokompatibilität der einzelnen Mannosamin-Derivate am Beispiel von HU- VECs . . . . .	43
4.14	RP-HPLC von HUVEC-Zelllysaten, die mit ManNAc-Analoga behandelt wurden, im Vergleich zu Sialinsäurestandards . . . . .	44
4.15	Extrahierte Ionenchromatogramme von Natriumaddukten ( $[M+Na]^+$ ) der <i>N</i> -Acyl-Neuraminsäuren . . . . .	46
4.16	Fragmentationsmuster von DMB-markierter <i>N</i> -Acetyl-Neuraminsäure . . . . .	47
4.17	Vergleich der ESI-MS/MS-Fragmentationsmuster von Neu5Ac, Neu5Prop und Neu5But . . . . .	48
4.18	RP-HPLC nach DMB-Fluoreszenzmarkierung der Sialinsäuren im Protein- extrakt von HUVECs . . . . .	49
4.19	Extrahierte Ionenchromatogramme und ESI-MS/MS-Analyse inkorporier- ter <i>N</i> -Acyl-Sialinsäuren . . . . .	50
4.20	Schema des dreidimensionalen Angiogeneseassays . . . . .	52
4.21	Mikroskopische Beurteilung der neu gebildeten Sphäroidkapillaren nach bFGF-Simulation . . . . .	53
5.1	Peracylierung von ManN mit Pyridin beziehungsweise Acetonitril . . . . .	55
5.2	Hypothetischer Reaktionsmeschanismus der Epimerisierung von ManN zu GlcN unter sauren Bedingungen . . . . .	58
5.3	Räumliche Konfiguration von ManN und GlcN . . . . .	59
5.4	Hypothetische Reaktion von ManN unter alkalischen Bedingungen . . . . .	60
5.5	Potenzielle Wirkungen von <i>O</i> -Ac <sub>4</sub> -ManNAc auf HUVECs . . . . .	76
5.6	Potenzielle Wirkungen von <i>O</i> -Ac <sub>4</sub> -ManNBut auf HUVECs . . . . .	77

## Kapitel 9

### Abkürzungsverzeichnis

<b>AcN</b>	Acetonitril
<b>bFGF</b>	Basic Fibroblast Growth Factor
<b>CD36</b>	Cluster of Differentiation 36; Fatty Acid Translocase
<b>CMAS</b>	CMP- <i>N</i> -Acetyl-Neuraminsäure-Synthetase
<b>CMP</b>	Cytosin-Monophosphat
<b>CMP-Neu5Ac</b>	Cytosin-Monophosphat- <i>N</i> -Acetyl-Neuraminat
<b>CMP-Neu5R</b>	Cytosin-Monophosphat- <i>N</i> -Acyl-Neuraminat
<b>CMP-Sia</b>	Cytosin-Monophosphat-Sialinsäure
<b>CCR7</b>	C-C Chemokine Receptor Type 7
<b>DMB</b>	1,2-Diamino-4,5-Methylen-Dioxybenzen
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>ECGM</b>	Endothelial Cell Growth Medium
<b>E.coli</b>	Escherichia coli
<b>EDTA</b>	Ethylene-Diamine-Tetraacetic acid
<b>EIC</b>	Extrahiertes Ionenchromatogramm
<b>ERK</b>	Extracellular-signal Regulated Kinase
<b>ESI-MS</b>	Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie
<b>ESI-MS/MS</b>	Elektronenspray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie
<b>FAK</b>	Fokale Adhäsionskinase

*Kapitel 9 Abkürzungsverzeichnis*

<b>FCS</b>	Fetal Calf Serum
<b>FGFR</b>	Fibroblast Growth Factor Receptor
<b>FGF-2</b>	Fibroblast Growth Factor 2
<b>Fru-6-P</b>	Fructose-6-Phosphat
<b>Gal</b>	Galactose
<b>GC</b>	Gaschromatographie
<b>GC-MS</b>	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
<b>GlcN</b>	Glucosamin
<b>GlcN-6-P</b>	Glucosamin-6-Phosphat
<b>GlcNAc</b>	<i>N</i> -Acetyl-Glucosamin
<b>GNE</b>	UDP- <i>N</i> -Acetyl-Glucosamin-2-Epimerase
<b>GNE/MNK</b>	UDP- <i>N</i> -Acetyl-Glucosamin-2-Epimerase/ <i>N</i> -Acetyl-Mannosamin-Kinase
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>HUVECs</b>	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
<b>ICAM</b>	Intercellular Cell Adhesion Molecule
<b>KDN</b>	3-Deoxy-Non-2-Ulosonsäure
<b>K<sub>M</sub></b>	Michaelis-Menten-Konstante
<b>ManN</b>	Mannosamin
<b>ManNAc</b>	2- <i>N</i> -Acetyl-Mannosamin
<b>ManNBut</b>	2- <i>N</i> -Butyl-Mannosamin
<b>ManNProp</b>	2- <i>N</i> -Propionyl-Mannosamin
<b>ManNR</b>	2- <i>N</i> -Acyl-Mannosamin
<b>MAPK</b>	Mitogen Activated Protein Kinase
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid

*Kapitel 9 Abkürzungsverzeichnis*

<b>NANP</b>	<i>N</i> -Acetyl-Neuraminsäure-9-Phosphat-Phosphatase
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid
<b>NEU</b>	Neuraminidase
<b>LC</b>	Liquid Chromatography
<b>LC-ESI-MS</b>	Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry
<b>LDH</b>	Laktatdehydrogenase
<b>LT</b>	Heat Labile Enterotoxine
<b>NANS</b>	<i>N</i> -Acetyl-Neuraminsäure-Synthase
<b>NCAM</b>	Neural Cell Adhesion Molecule
<b>Neu5Ac</b>	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
<b>Neu5But</b>	<i>N</i> -Butylneuraminsäure
<b>Neu5Gc</b>	<i>N</i> -Glycolylneuraminsäure
<b>Neu5Prop</b>	<i>N</i> -Propionylneuraminsäure
<b>Neu5R</b>	<i>N</i> -Acylneuraminsäure
<b>NMR</b>	Nuclear Magnetic Resonance
<b>NRP1</b>	Neuropilin 1
<b>NRP2</b>	Neuropilin 2
<b>O-Ac<sub>4</sub>-GlcNAc</b>	1,3,4,6- <i>O</i> -Tetraacetyl-2- <i>N</i> -Acetyl-Glucosamin
<b>O-Ac<sub>4</sub>-GlcNBut</b>	1,3,4,6- <i>O</i> -Tetraacetyl-2- <i>N</i> -Butyl-Glucosamin
<b>O-Ac<sub>4</sub>-GlcNProp</b>	1,3,4,6- <i>O</i> -Tetraacetyl-2- <i>N</i> -Propionyl-Glucosamin
<b>O-Ac<sub>4</sub>-ManNAc</b>	1,3,4,6- <i>O</i> -Tetraacetyl-2- <i>N</i> -Acetyl-Mannosamin
<b>O-Ac<sub>4</sub>-ManNBut</b>	1,3,4,6- <i>O</i> -Tetraacetyl-2- <i>N</i> -Butyl-Mannosamin
<b>O-Ac<sub>4</sub>-ManNProp</b>	1,3,4,6- <i>O</i> -Tetraacetyl-2- <i>N</i> -Propionyl-Mannosamin
<b>O-Ac<sub>4</sub>-ManNR</b>	1,3,4,6- <i>O</i> -Tetraacetyl-2- <i>N</i> -Acyl-Mannosamin

<b>O-But<sub>4</sub>-ManNBut</b>	1,3,4,6- <i>O</i> -Tetrabutyl-2- <i>N</i> -Butyl-Mannosamin
<b>O-Prop<sub>4</sub>-ManNProp</b>	1,3,4,6- <i>O</i> -Tetrapropionyl-2- <i>N</i> -Propionyl-Mannosamin
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PolySia</b>	Polysialinsäure
<b>PSA-NCAM</b>	Polyialyliertes Neurales Zell Adhäsionsmolekül
<b>PSA-NRP1</b>	Polysialyliertes Neuropilin 1
<b>PSA-NRP2</b>	Polysialyliertes Neuropilin 2
<b>Rho</b>	Ras Homolog Gene Family
<b>RP</b>	Reversed Phase
<b>RP-HPLC</b>	Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography
<b>R<sub>T</sub></b>	Retentionszeit
<b>RT-PCR</b>	Real Time - Polymerase Chain Reaction
<b>SCFA</b>	Short-Chain Fatty Acid
<b>Sia</b>	Sialinsäure
<b>SLC17A5</b>	Solute Carrier Family 17 Member A5
<b>SLC35A1</b>	Solute Carrier Family 35 Member A1 (CMP-Sialic Acid Transporter)
<b>sLe<sup>a</sup></b>	Sialyl-Lewis a
<b>sLe<sup>x</sup></b>	Sialyl-Lewis x
<b>ST3Gal</b>	$\beta$ -Galactosid- $\alpha$ -2,3-Sialyltransferase
<b>ST3Gal1</b>	$\beta$ -Galactosid- $\alpha$ -2,3-Sialyltransferase 1
<b>ST6Gal</b>	$\beta$ -Galactosid- $\alpha$ -2,6-Sialyltransferase
<b>ST8SialII</b>	$\alpha$ - <i>N</i> -Acetylneuraminid- $\alpha$ -2,8-Sialyltransferase 2
<b>ST8SialIV</b>	$\alpha$ - <i>N</i> -Acetylneuraminid- $\alpha$ -2,8-Sialyltransferase 4

*Kapitel 9 Abkürzungsverzeichnis*

<b>SynCAM</b>	Synaptic Cell Adhesion Molecule
<b>TFA</b>	Trifluoroacetic Acid
<b>UDP</b>	Uridindiphosphat
<b>UDP-GlcNAc</b>	Uridindiphosphat- <i>N</i> -Acetyl-Glucosamin
<b>UTP</b>	Uridintriphosphat
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor

## Kapitel 10

### Literaturverzeichnis

- Udayanath Aich, Christopher T. Campbell, Noha Elmouelhi, Christopher A. Weier, S-Gopalan Sampathkumar, Sean S. Choi, and Kevin J. Yarema. Regioisomeric scfa attachment to hexosamines separates metabolic flux from cytotoxicity and muc1 suppression. *ACS chemical biology*, 3(4):230–240, 2008. ISSN 1554-8937. doi: 10.1021/cb7002708.
- G. Alessandri, P. Cornaglia-Ferraris, and P. M. Gullino. Angiogenic and angiostatic microenvironment in tumors—role of gangliosides. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 36(4):383–387, 1997. ISSN 0284-186X.
- Shira Amsili, Hagit Zer, Stephan Hinderlich, Sabine Krause, Michal Becker-Cohen, Daniel G. MacArthur, Kathryn N. North, and Stella Mitrani-Rosenbaum. Udp-n-acetylglucosamine 2-epimerase/n-acetylmannosamine kinase (gne) binds to alpha-actinin 1: novel pathways in skeletal muscle? *PloS one*, 3(6):e2477, 2008. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0002477.
- K. Angata, M. Suzuki, and M. Fukuda. Differential and cooperative polysialylation of the neural cell adhesion molecule by two polysialyltransferases, pst and stx. *The Journal of biological chemistry*, 273(43):28524–28532, 1998. ISSN 0021-9258.
- Takashi Angata and Ajit Varki. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chemical reviews*, 102(2):439–469, 2002. ISSN 0009-2665.
- M. Archana, T. L. Yogesh, and K. L. Kumaraswamy. Various methods available for detection of apoptotic cells—a review. *Indian journal of cancer*, 50(3):274–283, 2013. ISSN 1998-4774. doi: 10.4103/0019-509X.118720.
- Marina Aspholm, Farzad O. Olfat, Jenny Nordén, Berit Sondén, Carina Lundberg, Rolf Sjöström, Siiri Altraja, Stefan Odenbreit, Rainer Haas, Torkel Wadström, Lars

- Engstrand, Cristina Semino-Mora, Hui Liu, André Dubois, Susann Teneberg, Anna Arnqvist, and Thomas Borén. Saba is the h. pylori hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. *PLoS pathogens*, 2(10):e110, 2006. ISSN 1553-7374. doi: 10.1371/journal.ppat.0020110.
- Hugo F. Azurmendi, Justine Vionnet, Lauren Wrightson, Loc B. Trinh, Joseph Shi-loach, and Darón I. Freedberg. 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):11557–11561, 2007. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.0704404104.
- Muriel Bardor, Dzung H. Nguyen, Sandra Diaz, and Ajit Varki. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid n-glycolylneuraminic acid into human cells. *The Journal of biological chemistry*, 280(6):4228–4237, 2005. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M412040200.
- Nils B. Bayer, Uwe Schubert, Zehra Sentürk, Silvia Rudloff, Sandra Frank, Heike Hausmann, Hildegard Geyer, Rudolf Geyer, Klaus T. Preissner, and Sebastian P. Galuska. Artificial and natural sialic acid precursors influence the angiogenic capacity of human umbilical vein endothelial cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(3):2571–2586, 2013. ISSN 1420-3049. doi: 10.3390/molecules18032571.
- Astrid Blume, Wenke Weidemann, Ulrich Stelzl, Erich E. Wanker, Lothar Lucka, Peter Donner, Werner Reutter, Rüdiger Horstkorte, and Stephan Hinderlich. Domain-specific characteristics of the bifunctional key enzyme of sialic acid biosynthesis, udp-n-acetylglucosamine 2-epimerase/n-acetylmannosamine kinase. *The Biochemical journal*, 384(Pt 3):599–607, 2004. ISSN 1470-8728. doi: 10.1042/BJ20040917.
- Kaya Bork, Werner Reutter, Rita Gerardy-Schahn, and Rüdiger Horstkorte. The intracellular concentration of sialic acid regulates the polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *FEBS letters*, 579(22):5079–5083, 2005. ISSN 0014-5793. doi: 10.1016/j.febslet.2005.08.013.
- Kaya Bork, Christoph Kannicht, Sabine Nöhring, Werner Reutter, Wenke Weidemann, Gerald W. Hart, and Rüdiger Horstkorte. N-propanoylmannosamine interferes with o-glcnac modification of the tyrosine 3-monooxygenase and stimulates dopamine secretion. *Journal of neuroscience research*, 86(3):647–652, 2008. ISSN 1097-4547. doi: 10.1002/jnr.21526.

- E. G. Bremer, J. Schlessinger, and S. Hakomori. Ganglioside-mediated modulation of cell growth. specific effects of gm3 on tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry*, 261(5):2434–2440, 1986. ISSN 0021-9258.
- C. Fred Brewer, M. Carrie Miceli, and Linda G. Baum. Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. *Current opinion in structural biology*, 12(5):616–623, 2002. ISSN 1879-033X.
- Helen Y. Chen, Anil K. Challa, and Ajit Varki. 9-o-acetylation of exogenously added ganglioside gd3. the gd3 molecule induces its own o-acetylation machinery. *The Journal of biological chemistry*, 281(12):7825–7833, 2006. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M512379200.
- Jia-Yang Chen, Yen-An Tang, Sin-Ming Huang, Hsueh-Fen Juan, Li-Wha Wu, Ying-Chieh Sun, Szu-Chi Wang, Kuan-Wei Wu, Gopula Balraj, Tzu-Ting Chang, Wen-Shan Li, Hung-Chi Cheng, and Yi-Ching Wang. A novel sialyltransferase inhibitor suppresses fak/paxillin signaling and cancer angiogenesis and metastasis pathways. *Cancer research*, 71(2):473–483, 2011. ISSN 1538-7445. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1303.
- B. K. Chethana and Samir H. Mushrif. Brønsted and lewis acid sites of sn-beta zeolite, in combination with the borate salt, catalyze the epimerization of glucose: A density functional theory study. *Journal of Catalysis*, 323:158–164, 2015. ISSN 00219517. doi: 10.1016/j.jcat.2015.01.008.
- Wayne K. Chou, Stephan Hinderlich, Werner Reutter, and Martin E. Tanner. Sialic acid biosynthesis: stereochemistry and mechanism of the reaction catalyzed by the mammalian udp-n-acetylglucosamine 2-epimerase. *Journal of the American Chemical Society*, 125(9):2455–2461, 2003. ISSN 0002-7863. doi: 10.1021/ja021309g.
- Tae-Wook Chung, Hee-Jung Choi, Seok-Jo Kim, Choong-Hwan Kwak, Kwon-Ho Song, Un-Ho Jin, Young-Chae Chang, Hyeun Wook Chang, Young-Choon Lee, Ki-Tae Ha, and Cheorl-Ho Kim. The ganglioside gm3 is associated with cisplatin-induced apoptosis in human colon cancer cells. *PloS one*, 9(5):e92786, 2014. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0092786.
- Miriam Cohen and Ajit Varki. The sialome—far more than the sum of its parts. *Omics : a journal of integrative biology*, 14(4):455–464, 2010. ISSN 1557-8100. doi: 10.1089/omi.2009.0148.

- B. E. Collins, T. J. Fralich, S. Itonori, Y. Ichikawa, and R. L. Schnaar. Conversion of cellular sialic acid expression from n-acetyl- to n-glycolylneuraminic acid using a synthetic precursor, n-glycolylmannosamine pentaacetate: inhibition of myelin-associated glycoprotein binding to neural cells. *Glycobiology*, 10(1):11–20, 2000. ISSN 1460-2423.
- Roseman S. Comb, D. G. The sialic acids. i. the structure and enzymatic synthesis of n-acetylneuraminic acid. *The Journal of biological chemistry*, 235:2529–2537, 1960. ISSN 0021-9258.
- Terry D. Connell. Cholera toxin, It-i, It-iiia and It-iiib: the critical role of ganglioside binding in immunomodulation by type i and type ii heat-labile enterotoxins. *Expert review of vaccines*, 6(5):821–834, 2007. ISSN 1744-8395. doi: 10.1586/14760584.6.5.821.
- F. Dall’Olio. The sialyl-alpha2,6-lactosaminyl-structure: biosynthesis and functional role. *Glycoconjugate journal*, 17(10):669–676, 2000. ISSN 0282-0080.
- M. Delehedde, M. Seve, N. Sergeant, I. Wartelle, M. Lyon, P. S. Rudland, and D. G. Fernig. Fibroblast growth factor-2 stimulation of p42/44mapkphosphorylation and i b degradation is regulated by heparan sulfate/heparin in rat mammary fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 275(43):33905–33910, 2000. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M005949200.
- Jian Du, M. Adam Meledeo, Zhiyun Wang, Hargun S. Khanna, Venkata D. P. Paruchuri, and Kevin J. Yarema. Metabolic glycoengineering: sialic acid and beyond. *Glycobiology*, 19(12):1382–1401, 2009. ISSN 1460-2423. doi: 10.1093/glycob/cwp115.
- Laurence Duchesne, Béangère Tissot, Timothy R. Rudd, Anne Dell, and David G. Fernig. N-glycosylation of fibroblast growth factor receptor 1 regulates ligand and heparan sulfate co-receptor binding. *The Journal of biological chemistry*, 281(37):27178–27189, 2006. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M601248200.
- Katinka Eggers, Sebastian Werneburg, Andrea Schertzinger, Markus Abeln, Miriam Schiff, Matthias Alexander Scharenberg, Hannelore Burkhardt, Martina Mühlenhoff, and Herbert Hildebrandt. Polysialic acid controls ncam signals at cell-cell contacts to regulate focal adhesion independent from fgf receptor activity. *Journal of cell science*, 124(Pt 19):3279–3291, 2011. ISSN 1477-9137. doi: 10.1242/jcs.084863.
- V. P. Eswarakumar, I. Lax, and J. Schlessinger. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine & growth factor reviews*, 16(2):139–149, 2005. ISSN 1359-6101. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.01.001.

- Chiara Francavilla, Paola Cattaneo, Vladimir Berezin, Elisabeth Bock, Diletta Ami, Ario de Marco, Gerhard Christofori, and Ugo Cavallaro. The binding of ncam to fgfr1 induces a specific cellular response mediated by receptor trafficking. *The Journal of cell biology*, 187(7):1101–1116, 2009. ISSN 0021-9525. doi: 10.1083/jcb.200903030.
- S. Fukuta, J. L. Magnani, E. M. Twiddy, R. K. Holmes, and V. Ginsburg. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and escherichia coli heat-labile enterotoxins lth-i, lt-ii-a, and lt-ii-b. *Infection and immunity*, 56(7):1748–1753, 1988. ISSN 0019-9567.
- Daniel Gagiannis, Reinhart Gossrau, Werner Reutter, Martin Zimmermann-Kordmann, and Rüdiger Horstkorte. Engineering the sialic acid in organs of mice using n-propanoylmannosamine. *Biochimica et biophysica acta*, 1770(2):297–306, 2007. ISSN 0006-3002. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.09.023.
- Sebastian P. Galuska, Hildegard Geyer, Birgit Weinhold, Maria Kontou, René C. Röhrich, Ulrike Bernard, Rita Gerardy-Schahn, Werner Reutter, Anja Münster-Kühnel, and Rudolf Geyer. Quantification of nucleotide-activated sialic acids by a combination of reduction and fluorescent labeling. *Analytical chemistry*, 82(11):4591–4598, 2010. ISSN 1520-6882. doi: 10.1021/ac100627e.
- Sebastian P. Galuska, Hildegard Geyer, Werner Mink, Peter Kaese, Siegfried Kühnhardt, Benedikt Schäfer, Martina Mühlenhoff, Friedrich Freiburger, Rita Gerardy-Schahn, and Rudolf Geyer. Glycomic strategy for efficient linkage analysis of di-, oligo- and polysialic acids. *Journal of proteomics*, 75(17):5266–5278, 2012. ISSN 1876-7737. doi: 10.1016/j.jprot.2012.06.011.
- Eduardo Gascon, Laszlo Vutskits, and Jozsef Zoltan Kiss. Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. *Brain research reviews*, 56(1):101–118, 2007. ISSN 0165-0173. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.05.014.
- Paola Giussani, Cristina Tringali, Laura Riboni, Paola Viani, and Bruno Venerando. Sphingolipids: key regulators of apoptosis and pivotal players in cancer drug resistance. *International journal of molecular sciences*, 15(3):4356–4392, 2014. ISSN 1422-0067. doi: 10.3390/ijms15034356.

- H. J. Gross and R. Brossmer. Enzymatic introduction of a fluorescent sialic acid into oligosaccharide chains of glycoproteins. *European journal of biochemistry / FEBS*, 177(3):583–589, 1988. ISSN 0014-2956.
- H. J. Grünholz, E. Harms, M. Opetz, W. Reutter, and M. Cerný. Inhibition of in vitro biosynthesis of n-acetylneuraminic acid by n-acyl- and n-alkyl-2-amino-2-deoxyhexoses. *Carbohydrate research*, 96(2):259–270, 1981. ISSN 0008-6215.
- Feng Guan, Xin Wang, and Fa He. Promotion of cell migration by neural cell adhesion molecule (ncam) is enhanced by psa in a polysialyltransferase-specific manner. *PLoS one*, 10(4):e0124237, 2015. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0124237.
- A. F. Hadfield, S. L. Mella, and A. C. Sartorelli. N-acetyl-d-mannosamine analogues as potential inhibitors of sialic acid biosynthesis. *Journal of pharmaceutical sciences*, 72(7):748–751, 1983. ISSN 0022-3549.
- Senitiroh Hakomori. Glycosynapses: microdomains controlling carbohydrate-dependent cell adhesion and signaling. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 76(3):553–572, 2004. ISSN 0001-3765.
- Shoufa Han, Brian E. Collins, Per Bengtson, and James C. Paulson. Homomultimeric complexes of cd22 in b cells revealed by protein-glycan cross-linking. *Nature chemical biology*, 1(2):93–97, 2005. ISSN 1552-4469. doi: 10.1038/nchembio713.
- N. Hanai, T. Dohi, G. A. Nores, and S. Hakomori. A novel ganglioside, de-n-acetyl-gm3 (ii3neunh2laccr), acting as a strong promoter for epidermal growth factor receptor kinase and as a stimulator for cell growth. *The Journal of biological chemistry*, 263(13):6296–6301, 1988. ISSN 0021-9258.
- S. Hara, Y. Takemori, M. Yamaguchi, M. Nakamura, and Y. Ohkura. Fluorometric high-performance liquid chromatography of n-acetyl- and n-glycolylneuraminic acids and its application to their microdetermination in human and animal sera, glycoproteins, and glycolipids. *Analytical biochemistry*, 164(1):138–145, 1987. ISSN 0003-2697.
- Thomas Haselhorst, Fiona E. Fleming, Jeffrey C. Dyason, Regan D. Hartnell, Xing Yu, Gavan Holloway, Kim Santegoets, Milton J. Kiefel, Helen Blanchard, Barbara S. Coulson, and Mark von Itzstein. Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nature chemical biology*, 5(2):91–93, 2009. ISSN 1552-4469. doi: 10.1038/nchembio.134.

- J. Häyrynen, H. Jennings, H. V. Raff, G. Rougon, N. Hanai, R. Gerardy-Schahn, and J. Finne. Antibodies to polysialic acid and its n-propyl derivative: binding properties and interaction with human embryonal brain glycopeptides. *The Journal of infectious diseases*, 171(6):1481–1490, 1995. ISSN 0022-1899.
- M. Herrmann, von der Lieth, C W, P. Stehling, W. Reutter, and M. Pawlita. Consequences of a subtle sialic acid modification on the murine polyomavirus receptor. *Journal of virology*, 71(8):5922–5931, 1997. ISSN 0022-538X.
- Stephan Hinderlich, Wenke Weidemann, Tal Yardeni, Rüdiger Horstkorte, and Marjan Huizing. Udp-glcnac 2-epimerase/mannac kinase (gne): A master regulator of sialic acid synthesis. *Topics in current chemistry*, 2013. ISSN 0340-1022. doi: 10.1007/128\textunderscore2013\textunderscore464.
- R. Horstkorte, S. Nöhring, K. Danker, K. Effertz, W. Reutter, and L. Lucka. Protein kinase c phosphorylates and regulates udp-n-acetylglucosamine-2-epimerase/n-acetylmannosamine kinase. *FEBS letters*, 470(3):315–318, 2000. ISSN 0014-5793.
- Rüdiger Horstkorte, Martina Mühlenhoff, Werner Reutter, Sabine Nöhring, Martin Zimmermann-Kordmann, and Rita Gerardy-Schahn. Selective inhibition of polysialyltransferase st8sialii by unnatural sialic acids. *Experimental cell research*, 298(1): 268–274, 2004. ISSN 0014-4827. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.04.014.
- Tomoya Isaji, Yuya Sato, Tomohiko Fukuda, and Jianguo Gu. N-glycosylation of the i-like domain of beta1 integrin is essential for beta1 integrin expression and biological function: identification of the minimal n-glycosylation requirement for alpha5beta1. *The Journal of biological chemistry*, 284(18):12207–12216, 2009. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M807920200.
- C. L. Jacobs, S. Goon, K. J. Yarema, S. Hinderlich, H. C. Hang, D. H. Chai, and C. R. Bertozzi. Substrate specificity of the sialic acid biosynthetic pathway. *Biochemistry*, 40(43):12864–12874, 2001. ISSN 0006-2960.
- E. A. Jaffe, R. L. Nachman, C. G. Becker, and C. R. Minick. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. identification by morphologic and immunologic criteria. *The Journal of clinical investigation*, 52(11):2745–2756, 1973. ISSN 0021-9738. doi: 10.1172/JCI107470.
- Tao Ji, Yi Guo, Kapjun Kim, Peter McQueen, Samia Ghaffar, Alexander Christ, Carol Lin, Ramez Eskander, Xiaolin Zi, and Bang H. Hoang. Neuropilin-2 expression is inhibited

- by secreted wnt antagonists and its down-regulation is associated with reduced tumor growth and metastasis in osteosarcoma. *Molecular cancer*, 14(1):86, 2015. ISSN 1476-4598. doi: 10.1186/s12943-015-0359-4.
- Colin P. Johnson, Ichiro Fujimoto, Urs Rutishauser, and Deborah E. Leckband. Direct evidence that neural cell adhesion molecule (ncam) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion. *The Journal of biological chemistry*, 280(1): 137–145, 2005. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M410216200.
- Mark B. Jones, Howard Teng, Jun Kyu Rhee, Nicholas Lahar, Gautam Baskaran, and Kevin J. Yarema. Characterization of the cellular uptake and metabolic conversion of acetylated n-acetylmannosamine (mannac) analogues to sialic acids. *Biotechnology and bioengineering*, 85(4):394–405, 2004. ISSN 0006-3592. doi: 10.1002/bit.10901.
- Julia Jungnickel, Christian Brämer, Paul Bronzlik, Esther Lipokatic-Takacs, Birgit Weinhold, Rita Gerardy-Schahn, and Claudia Grothe. Level and localization of polysialic acid is critical for early peripheral nerve regeneration. *Molecular and cellular neurosciences*, 40(3):374–381, 2009. ISSN 1095-9327. doi: 10.1016/j.mcn.2008.12.003.
- Yukihiro Kanato, Ken Kitajima, and Chihiro Sato. Direct binding of polysialic acid to a brain-derived neurotrophic factor depends on the degree of polymerization. *Glycobiology*, 18(12):1044–1053, 2008. ISSN 1460-2423. doi: 10.1093/glycob/cwn084.
- H. Kayser, R. Zeitler, C. Kannicht, D. Grunow, R. Nuck, and W. Reutter. Biosynthesis of a nonphysiological sialic acid in different rat organs, using n-propanoyl-d-hexosamines as precursors. *The Journal of biological chemistry*, 267(24):16934–16938, 1992. ISSN 0021-9258.
- H. Kayser, C. Ats, J. Lehmann, and W. Reutter. New amino sugar analogues are incorporated at different rates into glycoproteins of mouse organs. *Experientia*, 49(10): 885–887, 1993. ISSN 0014-4754.
- O. T. Keppler, P. Stehling, M. Herrmann, H. Kayser, D. Grunow, W. Reutter, and M. Pawlita. Biosynthetic modulation of sialic acid-dependent virus-receptor interactions of two primate polyoma viruses. *The Journal of biological chemistry*, 270(3):1308–1314, 1995. ISSN 0021-9258.
- O. T. Keppler, M. Herrmann, von der Lieth, C W, P. Stehling, W. Reutter, and M. Pawlita. Elongation of the n-acyl side chain of sialic acids in mdck ii cells inhibits influenza a

- virus infection. *Biochemical and biophysical research communications*, 253(2):437–442, 1998. ISSN 0006-291X. doi: 10.1006/bbrc.1998.9650.
- O. T. Keppler, S. Hinderlich, J. Langner, R. Schwartz-Albiez, W. Reutter, and M. Pawlita. Udp-glcnac 2-epimerase: a regulator of cell surface sialylation. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5418):1372–1376, 1999. ISSN 0036-8075.
- O. T. Keppler, R. Horstkorte, M. Pawlita, C. Schmidt, and W. Reutter. Biochemical engineering of the n-acyl side chain of sialic acid: biological implications. *Glycobiology*, 11(2):11R–18R, 2001. ISSN 1460-2423.
- Eva Kiermaier, Christine Mousson, Christopher T. Veldkamp, Rita Gerardy-Schahn, Ingrid de Vries, Larry G. Williams, Gary R. Chaffee, Andrew J. Phillips, Friedrich Freiburger, Richard Imre, Deni Taleski, Richard J. Payne, Asolina Braun, Reinhold Förster, Karl Mechtler, Martina Mühlenhoff, Brian F. Volkman, and Michael Sixt. Polysialylation controls dendritic cell trafficking by regulating chemokine recognition. *Science (New York, N.Y.)*, 351(6269):186–190, 2016. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.aad0512.
- Eun Jeong Kim, Mark B. Jones, Jun Kyu Rhee, Srinivasa-Gopalan Sampathkumar, and Kevin J. Yarema. Establishment of n-acetylmannosamine (mannac) analogue-resistant cell lines as improved hosts for sialic acid engineering applications. *Biotechnology progress*, 20(6):1674–1682, 2004a. ISSN 8756-7938. doi: 10.1021/bp049841q.
- Eun Jeong Kim, Srinivasa-Gopalan Sampathkumar, Mark B. Jones, Jun Kyu Rhee, Gautam Baskaran, Scarlett Goon, and Kevin J. Yarema. Characterization of the metabolic flux and apoptotic effects of o-hydroxyl- and n-acyl-modified n-acetylmannosamine analogs in jurkat cells. *The Journal of biological chemistry*, 279(18):18342–18352, 2004b. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M400205200.
- H. Kitagawa and J. C. Paulson. Differential expression of five sialyltransferase genes in human tissues. *The Journal of biological chemistry*, 269(27):17872–17878, 1994. ISSN 0021-9258.
- A. Klein, S. Diaz, I. Ferreira, G. Lamblin, P. Roussel, and A. E. Manzi. New sialic acids from biological sources identified by a comprehensive and sensitive approach: liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (lc-esi-ms) of sia quinoxalinones. *Glycobiology*, 7(3):421–432, 1997. ISSN 1460-2423.
- Maria Kontou, Christian Bauer, Werner Reutter, and Rüdiger Horstkorte. Sialic acid metabolism is involved in the regulation of gene expression during neuronal differentiation

- of pc12 cells. *Glycoconjugate journal*, 25(3):237–244, 2008a. ISSN 0282-0080. doi: 10.1007/s10719-008-9104-1.
- Maria Kontou, Wenke Weidemann, Christian Bauer, Werner Reutter, and Rüdiger Horstkorte. The key enzyme of sialic acid biosynthesis (gne) promotes neurite outgrowth of pc12 cells. *Neuroreport*, 19(12):1239–1242, 2008b. ISSN 1473-558X. doi: 10.1097/WNR.0b013e32830b368a.
- Maria Kontou, Wenke Weidemann, Kaya Bork, and Rüdiger Horstkorte. Beyond glycosylation: sialic acid precursors act as signaling molecules and are involved in cellular control of differentiation of pc12 cells. *Biological chemistry*, 390(7):575–579, 2009. ISSN 1437-4315. doi: 10.1515/BC.2009.058.
- T. Korff and H. G. Augustin. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *The Journal of cell biology*, 143(5): 1341–1352, 1998. ISSN 0021-9525.
- S. Kornfeld, R. Kornfeld, E. F. Neufeld, and P. J. O'BRIEN. The feedback control of sugar nucleotide biosynthesis in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 52:371–379, 1964. ISSN 0027-8424.
- P. M. Lackie, C. Zuber, and J. Roth. Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule (n-cam) is widely expressed during organogenesis in mesodermal and endodermal derivatives. *Differentiation; research in biological diversity*, 57(2):119–131, 1994. ISSN 0301-4681.
- S. M. Lawrence, K. A. Huddleston, L. R. Pitts, N. Nguyen, Y. C. Lee, W. F. Vann, T. A. Coleman, and M. J. Betenbaugh. Cloning and expression of the human n-acetylneuraminic acid phosphate synthase gene with 2-keto-3-deoxy-d-glycero- d-galacto-nononic acid biosynthetic ability. *The Journal of biological chemistry*, 275(23): 17869–17877, 2000. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M000217200.
- M. R. Lifely, A. S. Gilbert, and C. Moreno. Sialic acid polysaccharide antigens of neisseria meningitidis and escherichia coli: esterification between adjacent residues. *Carbohydrate research*, 94(2):193–203, 1981. ISSN 0008-6215.
- Zhihui Liu, Qiaoqiao Ma, Yuxiu Liu, and Qingmin Wang. 4-(n,n-dimethylamino)pyridine hydrochloride as a recyclable catalyst for acylation of inert alcohols: substrate scope and reaction mechanism. *Organic letters*, 16(1):236–239, 2014. ISSN 1523-7052. doi: 10.1021/o14030875.

- Sarah J. Luchansky, Kevin J. Yarema, Saori Takahashi, and Carolyn R. Bertozzi. GlcnaC 2-epimerase can serve a catabolic role in sialic acid metabolism. *The Journal of biological chemistry*, 278(10):8035–8042, 2003. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M212127200.
- L. K. Mahal, K. J. Yarema, and C. R. Bertozzi. Engineering chemical reactivity on cell surfaces through oligosaccharide biosynthesis. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5315): 1125–1128, 1997. ISSN 0036-8075.
- L. K. Mahal, N. W. Charter, K. Angata, M. Fukuda, D. E. Koshland, and C. R. Bertozzi. A small-molecule modulator of poly-alpha 2,8-sialic acid expression on cultured neurons and tumor cells. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5541):380–381, 2001. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.1062192.
- Pushpa Maliekal, Didier Vertommen, Ghislain Delpierre, and Emile van Schaftingen. Identification of the sequence encoding n-acetylneuraminase-9-phosphate phosphatase. *Glycobiology*, 16(2):165–172, 2006. ISSN 1460-2423. doi: 10.1093/glycob/cwj050.
- Florence Malisan and Roberto Testi. Gd3 ganglioside and apoptosis. *Biochimica et biophysica acta*, 1585(2-3):179–187, 2002. ISSN 0006-3002.
- M. G. Manfredi, S. Lim, K. P. Claffey, and T. N. Seyfried. Gangliosides influence angiogenesis in an experimental mouse brain tumor. *Cancer research*, 59(20):5392–5397, 1999. ISSN 0008-5472.
- L. R. Mantey, O. T. Keppler, M. Pawlita, W. Reutter, and S. Hinderlich. Efficient biochemical engineering of cellular sialic acids using an unphysiological sialic acid precursor in cells lacking udp-n-acetylglucosamine 2-epimerase. *FEBS letters*, 503(1):80–84, 2001. ISSN 0014-5793.
- A. E. Manzi, H. H. Higa, S. Diaz, and A. Varki. Intramolecular self-cleavage of polysialic acid. *The Journal of biological chemistry*, 269(38):23617–23624, 1994. ISSN 0021-9258.
- R. P. McEver, K. L. Moore, and R. D. Cummings. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *The Journal of biological chemistry*, 270(19): 11025–11028, 1995. ISSN 0021-9258.
- G.-J Meyer, K.H Matzke, K. Hamacher, F. Füchtner, J. Steinbach, G. Notohamiprodjo, and S. Zijlstra. The stability of 2-[18f]fluoro-deoxy-d-glucose towards epimerisation

- under alkaline conditions. *Applied Radiation and Isotopes*, 51(1):37–41, 1999. ISSN 09698043. doi: 10.1016/S0969-8043(98)00193-6.
- T. J. Monica, D. C. Andersen, and C. F. Goochee. A mathematical model of sialylation of n-linked oligosaccharides in the trans-golgi network. *Glycobiology*, 7(4):515–521, 1997. ISSN 1460-2423.
- R. Montesano, M. S. Pepper, J. D. Vassalli, and L. Orci. Phorbol ester induces cultured endothelial cells to invade a fibrin matrix in the presence of fibrinolytic inhibitors. *Journal of cellular physiology*, 132(3):509–516, 1987. ISSN 0021-9541. doi: 10.1002/jcp.1041320313.
- M. Mühlenhoff, M. Eckhardt, A. Bethe, M. Frosch, and R. Gerardy-Schahn. Polysialylation of ncam by a single enzyme. *Current biology : CB*, 6(9):1188–1191, 1996. ISSN 0960-9822.
- Martina Mühlenhoff, Imke Oltmann-Norden, Birgit Weinhold, Herbert Hildebrandt, and Rita Gerardy-Schahn. Brain development needs sugar: the role of polysialic acid in controlling ncam functions. *Biological chemistry*, 390(7):567–574, 2009. ISSN 1431-6730. doi: 10.1515/BC.2009.078.
- Martina Mühlenhoff, Manuela Rollenhagen, Sebastian Werneburg, Rita Gerardy-Schahn, and Herbert Hildebrandt. Polysialic acid: versatile modification of ncam, syncam 1 and neuropilin-2. *Neurochemical research*, 38(6):1134–1143, 2013. ISSN 1573-6903. doi: 10.1007/s11064-013-0979-2.
- Daisuke Nakata and Frederic A. Troy. 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. *The Journal of biological chemistry*, 280(46):38305–38316, 2005. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M508762200.
- Suvi Natunen, Milla Lampinen, Heli Suila, Ilja Ritamo, Virve Pitkänen, Alison V. Nairn, Jarkko Råbinä, Saara Laitinen, Kelley W. Moremen, Werner Reutter, and Leena Valmu. Metabolic glycoengineering of mesenchymal stromal cells with n-propanoylmannosamine. *Glycobiology*, 23(8):1004–1012, 2013. ISSN 1460-2423. doi: 10.1093/glycob/cwt039.

- C. Oetke, S. Hinderlich, R. Brossmer, W. Reutter, M. Pawlita, and O. T. Keppler. Evidence for efficient uptake and incorporation of sialic acid by eukaryotic cells. *European journal of biochemistry / FEBS*, 268(16):4553–4561, 2001. ISSN 0014-2956.
- E. Ong, J. Nakayama, K. Angata, L. Reyes, T. Katsuyama, Y. Arai, and M. Fukuda. Developmental regulation of polysialic acid synthesis in mouse directed by two polysialyltransferases, pst and stx. *Glycobiology*, 8(4):415–424, 1998. ISSN 1460-2423.
- Sayaka Ono, Masaya Hane, Ken Kitajima, and Chihiro Sato. Novel regulation of fibroblast growth factor 2 (fgf2)-mediated cell growth by polysialic acid. *The Journal of biological chemistry*, 287(6):3710–3722, 2012. ISSN 1083-351X. doi: 10.1074/jbc.M111.276618.
- Hyein Park, Lisandra Pagan, Orkun Tan, Ahmed Fadiel, Necdet Demir, Kui Huang, Khusbhakhat Mittal, and Frederick Naftolin. Estradiol regulates expression of polysialated neural cell adhesion molecule by human vascular endothelial cells. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 17(12):1090–1098, 2010. ISSN 1933-7205. doi: 10.1177/1933719110379649.
- Robert A. Pon, Nancy J. Biggs, and Harold J. Jennings. Polysialic acid bioengineering of neuronal cells by n-acyl sialic acid precursor treatment. *Glycobiology*, 17(3):249–260, 2007. ISSN 1460-2423. doi: 10.1093/glycob/cwl075.
- Adriane Regina Todeschini and Sen-itiroh Hakomori. Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains. *Biochimica et biophysica acta*, 1780(3):421–433, 2008. ISSN 0006-3002. doi: 10.1016/j.bbagen.2007.10.008.
- Simona Rimoldi, Elena Papis, Giovanni Bernardini, Mariangela Prati, and Rosalba Gornati. Molecular cloning and expression of alpha2,8-sialyltransferase (st8sia i, gd3 synthase) in xenopus. *Molecular and cellular biochemistry*, 301(1-2):143–153, 2007. ISSN 0300-8177. doi: 10.1007/s11010-006-9406-1.
- Manuela Rollenhagen, Buettner, Falk F R, Marc Reismann, Adan Chari Jirmo, Melanie Grove, Behrens, Georg M N, Rita Gerardy-Schahn, Franz-Georg Hanisch, and Martina Mühlenhoff. Polysialic acid on neuropilin-2 is exclusively synthesized by the polysialyltransferase st8siaiv and attached to mucin-type o-glycans located between the b2 and c domain. *The Journal of biological chemistry*, 288(32):22880–22892, 2013. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M113.463927.

- Mona Saffarzadeh, Christiane Juenemann, Markus A. Queisser, Guenter Lochnit, Guillermo Barreto, Sebastian P. Galuska, Juergen Lohmeyer, and Klaus T. Preissner. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS one*, 7(2):e32366, 2012. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0032366.
- Srinivasa-Gopalan Sampathkumar, Mark B. Jones, M. Adam Meledeo, Christopher T. Campbell, Sean S. Choi, Kaoru Hida, Prasra Gomutputra, Anthony Sheh, Tim Gilmartin, Steven R. Head, and Kevin J. Yarema. Targeting glycosylation pathways and the cell cycle: sugar-dependent activity of butyrate-carbohydrate cancer prodrugs. *Chemistry & biology*, 13(12):1265–1275, 2006a. ISSN 1074-5521. doi: 10.1016/j.chembiol.2006.09.016.
- Srinivasa-Gopalan Sampathkumar, Adrienne V. Li, Mark B. Jones, Zhonghui Sun, and Kevin J. Yarema. Metabolic installation of thiols into sialic acid modulates adhesion and stem cell biology. *Nature chemical biology*, 2(3):149–152, 2006b. ISSN 1552-4469. doi: 10.1038/nchembio770.
- Annie N. Samraj, Oliver M. T. Pearce, Heinz Läubli, Alyssa N. Crittenden, Anne K. Bergfeld, Kalyan Banda, Christopher J. Gregg, Andrea E. Bingman, Patrick Secret, Sandra L. Diaz, Nissi M. Varki, and Ajit Varki. A red meat-derived glycan promotes inflammation and cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(2):542–547, 2015. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1417508112.
- Chihiro Sato and Ken Kitajima. Disialic, oligosialic and polysialic acids: distribution, functions and related disease. *Journal of biochemistry*, 154(2):115–136, 2013a. ISSN 0021-924X. doi: 10.1093/jb/mvt057.
- Chihiro Sato and Ken Kitajima. Impact of structural aberrancy of polysialic acid and its synthetic enzyme st8sia2 in schizophrenia. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7:61, 2013b. ISSN 1662-5102. doi: 10.3389/fncel.2013.00061.
- Yuya Sato, Tomoya Isaji, Michiko Tajiri, Shumi Yoshida-Yamamoto, Tsuyoshi Yoshinaka, Toshiaki Somehara, Tomohiko Fukuda, Yoshinao Wada, and Jianguo Gu. An n-glycosylation site on the beta-propeller domain of the integrin alpha5 subunit plays key roles in both its function and site-specific modification by beta1,4-n-

- acetylglucosaminyltransferase iii. *The Journal of biological chemistry*, 284(18):11873–11881, 2009. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M807660200.
- E. Saxon and C. R. Bertozzi. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5460):2007–2010, 2000. ISSN 0036-8075.
- R. Schauer. Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconjugate journal*, 17(7-9):485–499, 2000. ISSN 0282-0080.
- Roland Schauer. Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology (Jena, Germany)*, 107(1):49–64, 2004. ISSN 0944-2006. doi: 10.1016/j.zool.2003.10.002.
- Roland Schauer. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Current opinion in structural biology*, 19(5):507–514, 2009. ISSN 1879-033X. doi: 10.1016/j.sbi.2009.06.003.
- Ronald L. Schnaar, Rita Gerardy-Schahn, and Herbert Hildebrandt. Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiological reviews*, 94(2):461–518, 2014. ISSN 1522-1210. doi: 10.1152/physrev.00033.2013.
- Kareena L. Schnabl, Catherine Field, and M. T. Clandinin. Ganglioside composition of differentiated Caco-2 cells resembles human colostrum and neonatal rat intestine. *The British journal of nutrition*, 101(5):694–700, 2009. ISSN 1475-2662. doi: 10.1017/S0007114508048289.
- Peter Simon, Sören Bäumner, Oliver Busch, René Röhrich, Miriam Kaese, Peter Richterrich, Axel Wehrend, Karin Müller, Rita Gerardy-Schahn, Martina Mühlenhoff, Hildegard Geyer, Rudolf Geyer, Ralf Middendorff, and Sebastian P. Galuska. Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase ST8SIAII. *The Journal of biological chemistry*, 288(26):18825–18833, 2013. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M113.451112.
- Kai Simons and Julio L. Sampaio. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(10):a004697, 2011. ISSN 1943-0264. doi: 10.1101/cshperspect.a004697.

- E. R. Sjöberg, L. D. Powell, A. Klein, and A. Varki. Natural ligands of the b cell adhesion molecule cd22 beta can be masked by 9-o-acetylation of sialic acids. *The Journal of cell biology*, 126(2):549–562, 1994. ISSN 0021-9525.
- S. Soker, S. Takashima, H. Q. Miao, G. Neufeld, and M. Klagsbrun. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 92(6):735–745, 1998. ISSN 0092-8674.
- Boris Strilić, Jan Eglinger, Michael Krieg, Martin Zeeb, Jennifer Axnick, Pavel Babál, Daniel J. Müller, and Eckhard Lammert. Electrostatic cell-surface repulsion initiates lumen formation in developing blood vessels. *Current biology : CB*, 20(22):2003–2009, 2010. ISSN 1879-0445. doi: 10.1016/j.cub.2010.09.061.
- Kohta Takahashi, Junya Mitoma, Masahiro Hosono, Kazuhiro Shiozaki, Chihiro Sato, Kazunori Yamaguchi, Ken Kitajima, Hideyoshi Higashi, Kazuo Nitta, Hiroshi Shima, and Taeko Miyagi. Sialidase neu4 hydrolyzes polysialic acids of neural cell adhesion molecules and negatively regulates neurite formation by hippocampal neurons. *The Journal of biological chemistry*, 287(18):14816–14826, 2012. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M111.324186.
- Pam Tangvoranuntakul, Pascal Gagneux, Sandra Diaz, Muriel Bardor, Nissi Varki, Ajit Varki, and Elaine Muchmore. 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):12045–12050, 2003. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.2131556100.
- Martin E. Tanner. The enzymes of sialic acid biosynthesis. *Bioorganic chemistry*, 33(3): 216–228, 2005. ISSN 0045-2068. doi: 10.1016/j.bioorg.2005.01.005.
- Rachel E. Taylor, Christopher J. Gregg, Vered Padler-Karavani, Darius Ghaderi, Hai Yu, Shengshu Huang, Ricardo U. Sorensen, Xi Chen, Jaime Inostroza, Victor Nizet, and Ajit Varki. Novel mechanism for the generation of human xeno-autoantibodies against the nonhuman sialic acid n-glycolylneuraminic acid. *The Journal of experimental medicine*, 207(8):1637–1646, 2010. ISSN 1540-9538. doi: 10.1084/jem.20100575.
- Kou Tei, Naoko Kawakami-Kimura, Osamu Taguchi, Kensuke Kumamoto, Shigeki Higashiyama, Naoyuki Taniguchi, Ken'ichi Toda, Ryo Kawata, Yasuo Hisa, and Reiji Kannagi. Roles of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis induced by cotransplanta-

- tion of cancer and endothelial cells to nude rats. *Cancer research*, 62(21):6289–6296, 2002. ISSN 0008-5472.
- Joe Tiralongo and Ivan Martinez-Duncker. *Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function. Sialic Acid Glycoconjugates in Health and Disease*. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2013. ISBN 9781608053865. doi: 10.2174/97816080538651130101.
- Cristina Tringali, Barbara Lupo, Ilaria Silvestri, Nadia Papini, Luigi Anastasia, Guido Tetamanti, and Bruno Venerando. The plasma membrane sialidase neu3 regulates the malignancy of renal carcinoma cells by controlling  $\beta$ 1 integrin internalization and recycling. *The Journal of biological chemistry*, 287(51):42835–42845, 2012. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M112.407718.
- Ajit Varki. Sialic acids in human health and disease. *Trends in molecular medicine*, 14(8):351–360, 2008. ISSN 1471-4914. doi: 10.1016/j.molmed.2008.06.002.
- Ajit Varki. Multiple changes in sialic acid biology during human evolution. *Glycoconjugate journal*, 26(3):231–245, 2009a. ISSN 0282-0080. doi: 10.1007/s10719-008-9183-z.
- Ajit Varki. *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2nd ed. edition, 2009b. ISBN 0879697709.
- Ajit Varki and Takashi Angata. Siglecs—the major subfamily of i-type lectins. *Glycobiology*, 16(1):1R–27R, 2006. ISSN 1460-2423. doi: 10.1093/glycob/cwj008.
- Enrique Villar and Isabel Muñoz Barroso. Role of sialic acid-containing molecules in paramyxovirus entry into the host cell: a minireview. *Glycoconjugate journal*, 23(1-2): 5–17, 2006. ISSN 0282-0080. doi: 10.1007/s10719-006-5433-0.
- Karthik Viswanathan, Shawn Lawrence, Stephan Hinderlich, Kevin J. Yarema, Yuan C. Lee, and Michael J. Betenbaugh. Engineering sialic acid synthetic ability into insect cells: identifying metabolic bottlenecks and devising strategies to overcome them. *Biochemistry*, 42(51):15215–15225, 2003. ISSN 0006-2960. doi: 10.1021/bi034994s.
- Bing Wang, Patricia McVeagh, Peter Petocz, and Jennie Brand-Miller. Brain ganglioside and glycoprotein sialic acid in breastfed compared with formula-fed infants. *The American journal of clinical nutrition*, 78(5):1024–1029, 2003. ISSN 0002-9165.
- Zhiyun Wang, Zhonghui Sun, Adrienne V. Li, and Kevin J. Yarema. Roles for udp-glcna 2-epimerase/mannac 6-kinase outside of sialic acid biosynthesis: modulation of sialyl-

- transferase and bip expression, gm3 and gd3 biosynthesis, proliferation, and apoptosis, and erk1/2 phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 281(37):27016–27028, 2006. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M604903200.
- Wenke Weidemann, Ulrich Stelzl, Ulrike Lisewski, Kaya Bork, Erich E. Wanker, Stephan Hinderlich, and Rüdiger Horstkorte. The collapsin response mediator protein 1 (crmp-1) and the promyelocytic leukemia zinc finger protein (plzf) bind to udp-n-acetylglucosamine 2-epimerase/n-acetylmannosamine kinase (gne), the key enzyme of sialic acid biosynthesis. *FEBS letters*, 580(28-29):6649–6654, 2006. ISSN 0014-5793. doi: 10.1016/j.febslet.2006.11.015.
- Wenke Weidemann, Christian Klukas, Andreas Klein, Andreas Simm, Falk Schreiber, and Rüdiger Horstkorte. Lessons from gne-deficient embryonic stem cells: sialic acid biosynthesis is involved in proliferation and gene expression. *Glycobiology*, 20(1):107–117, 2010. ISSN 1460-2423. doi: 10.1093/glycob/cwp153.
- Birgit Weinhold, Melanie Sellmeier, Wiebke Schaper, Linda Blume, Brigitte Philippens, Elina Kats, Ulrike Bernard, Sebastian P. Galuska, Hildegard Geyer, Rudolf Geyer, Kirstin Worthmann, Mario Schiffer, Stephanie Groos, Rita Gerardy-Schahn, and Anja K. Münster-Kühnel. Deficits in sialylation impair podocyte maturation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 23(8):1319–1328, 2012. ISSN 1533-3450. doi: 10.1681/ASN.2011090947.
- David C. West, Chris G. Rees, Laurence Duchesne, Susannah J. Patey, Carla J. Terry, Jeremy E. Turnbull, Maryse Delehedde, Christian W. Heegaard, Fabrice Allain, Christophe Vanpouille, Dina Ron, and David G. Fernig. Interactions of multiple heparin binding growth factors with neuropilin-1 and potentiation of the activity of fibroblast growth factor-2. *The Journal of biological chemistry*, 280(14):13457–13464, 2005. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M410924200.
- Martina Willhauck, Thomas M. Moehler, Anette Merling, Susann Pusunc, Hartmut Goldschmidt, and Reinhard Schwartz-Albiez. Transcriptional regulation of the vascular endothelial glycome by angiogenic and inflammatory signalling. *Angiogenesis*, 13(1): 25–42, 2010. ISSN 1573-7209. doi: 10.1007/s10456-010-9162-4.
- Martina Willhauck-Fleckenstein, Thomas M. Moehler, Anette Merling, Susann Pusunc, Hartmut Goldschmidt, and Reinhard Schwartz-Albiez. Transcriptional regulation of the

- vascular endothelial glycome by angiogenic and inflammatory signalling. *Angiogenesis*, 13(1):25–42, 2010. ISSN 1573-7209. doi: 10.1007/s10456-010-9162-4.
- Lijun Xia and Rodger P. McEver. Targeted disruption of the gene encoding core 1 beta1-3-galactosyltransferase (t-synthase) causes embryonic lethality and defective angiogenesis in mice. *Methods in enzymology*, 416:314–331, 2006. ISSN 0076-6879. doi: 10.1016/S0076-6879(06)16021-8.
- Uichiro Yabe, Chihiro Sato, Tsukasa Matsuda, and Ken Kitajima. Polysialic acid in human milk. cd36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. *The Journal of biological chemistry*, 278(16):13875–13880, 2003. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M300458200.
- K. J. Yarema, S. Goon, and C. R. Bertozzi. Metabolic selection of glycosylation defects in human cells. *Nature biotechnology*, 19(6):553–558, 2001. ISSN 1087-0156. doi: 10.1038/89305.
- Jian Yin and Peng Miao. Apoptosis evaluation by electrochemical techniques. *Chemistry, an Asian journal*, 2015. ISSN 1861-471X. doi: 10.1002/asia.201501045.
- Natasha E. Zachara and Gerald W. Hart. Cell signaling, the essential role of o-glcna6. *Biochimica et biophysica acta*, 1761(5-6):599–617, 2006. ISSN 0006-3002. doi: 10.1016/j.bbali.2006.04.007.
- M. Ziche, L. Morbidelli, G. Alessandri, and P. M. Gullino. Angiogenesis can be stimulated or repressed in vivo by a change in gm3:gd3 ganglioside ratio. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 67(6):711–715, 1992. ISSN 0023-6837.
- Mary A. Zimmerman, Nagendra Singh, Pamela M. Martin, Muthusamy Thangaraju, Vaidivel Ganapathy, Jennifer L. Waller, Huidong Shi, Keith D. Robertson, David H. Munn, and Kebin Liu. Butyrate suppresses colonic inflammation through hdac1-dependent fas upregulation and fas-mediated apoptosis of t cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 302(12):G1405–15, 2012. ISSN 1522-1547. doi: 10.1152/ajpgi.00543.2011.

## Kapitel 11

### Publikationen und Kongressbeiträge im Zusammenhang mit dieser Arbeit

#### Publikationen

**Bayer NB**, Schubert U, Sentürk Z, Rudloff S, Frank S, Hausmann H, Geyer H, Geyer R, Preißner KT, Galuska SP.

„*Artificial and natural sialic acid precursors influence the angiogenetic capacity of human umbilical vein endothelial cells.*“

Molecules. 2013 Feb 26;28(3):2571-86.

Ulm C, Saffarzadeh M, Mahavadi P, Müller S, Prem G, Saboor F, Simon P, Midden-dorff R, Geyer H, Henneke I, **Bayer NB**, Rinné S, Lütteke T, BBöttcher-Friebertshäuser E, Gerhardy-Schahn R, Schwarzer D, Mühlenhoff M, Preißner KT, Günther A, Geyer R, Galuska SP.

„*Soluble polysialylated NCAM: a novel player of the innate immune system in the lung.*“

Cellular and Molecular Life Sciences. 2013 Apr 26.

#### Posterbeitrag

Sialoglyco 2012, Taipei, Taiwan:

N. B. Bayer, U. Schubert, H. Geyer, R. Geyer, K. T. Preissner, S. P. Galuska

„*Modulating the angiogenetic capacity of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) by artificial sialic acid precursors*“

## Kapitel 12

### Eidesstattliche Erklärung

#### Erklärung zur Dissertation:

„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

---

Nils Bastian Bayer

## Kapitel 13

### Danksagung

Mein größter Dank gebührt Sebastian und Rudolf, die mich mit ihrer leidenschaftlichen und mitreißenden Lehre motiviert haben, Forschung zu betreiben und mich in der Lehre zu engagieren. Durch euch habe ich gelernt wissenschaftlich und menschlich zu denken. Mein Wunsch, zu lehren und die universitäre Lehre zu verbessern, der inzwischen so wegweisend für mich geworden ist, folgt eurem Beispiel. Die Atmosphäre in eurer Arbeitsgruppe war so warm und herzlich, wie ich es selten erlebt habe. Eine besseres Umfeld und eine bessere Betreuung kann man sich als Doktorand nicht wünschen.

Mindestens an zweiter Stelle sind die Seele unseres Labors, Werner, und Uwe zu nennen. Von euch habe ich eigentlich alle Methoden in ihren Möglichkeiten und Tücken erlernt. Untrainiert und überfordert wie ich es war, konntet ihr mir immer helfen. Ohne euch hätte das nicht geklappt und darüber hinaus auch keinen Spaß gemacht. Danke auch an Peter und Sigggi. Auch wenn ich mit euch vielleicht nicht so eng zusammengearbeitet habe wie mit Werner und Uwe, habt ihr zahllose Messungen für mich durchgeführt und hattet immer ein offenes Ohr für mein Geweine.

Lieben Dank an alle damaligen Mitdoktoranden: Tina, Dennis, Sandra. Es war und ist unvorstellbar witzig mit euch. Ohne eure interdisziplinäre Expertise und euer einfaches Dasein wäre ich sonst sicherlich verzweifelt. Ein besonderer Dank geht an Peter als medizinischen Mitstreiter. Ich vermisse es, wie wir einander manchmal grundlos angeschrien haben. Ich wünsche euch das beste auf euren Wegen!

Danke Anakin und Erik. Ihr wart nicht nur meine Mitbewohner und habt mir wertvolle Korrekturen meiner Dissertation zukommen lassen. Es lässt sich nicht in Worte fassen, wie wichtig ihr mir geworden seid und wie viele persönliche Entwicklungen ihr mir ermöglicht habt. Ihr seid Gießen für mich und der beste Teil meines Studiums. I love you guys!

### *Kapitel 13 Danksagung*

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie. Trotz wechselseitiger Schwierigkeiten und einer langen Geschichte, wart ihr immer für mich da. Vor allem auch in einer Zeit, als ich mit Kraft versucht habe, mich von euch zu entfernen. Danke, dass ihr diese Spannungen ausgehalten habt und teilweise immer noch tragt. Es freut mich wie wir inzwischen wieder miteinander umgehen können, dass wir wieder Wege zueinander gefunden haben. Auch ohne euch wäre ich nicht ich. Ich bin froh und dankbar, euch in meinem Leben zu wissen!

Danke an Oma und Opa. Als ich meine ersten geistigen Entwicklungen durchgemacht habe wart ihr da. In allen Widrigkeiten und Verwirrungen habt ihr durchweg an mich geglaubt und mir immer ein starkes Gefühl von Heimat und Liebe gegeben. Ich vermisse den Austausch mit euch jeden Tag. Ohne euch könnte ich nicht der Mensch und Arzt sein der bin und noch werden will. Die vorliegende Dissertation ist euch gewidmet.

Abschließend möchte ich noch Pony danken. Auch wenn wir „erst“ ein Jahr zusammen sind, bist du mir doch schnell wichtiger geworden als ich es hätte erwarten können. Gerade in Krisenzeiten bist du mir nah und ein Anker, auch wenn ich ihn manchmal nur widerwillig greifen kann. Ich weiß nicht, wie sich die nächsten Jahre gestalten und wie wir uns entwickeln werden. Dennoch möchte ich an dieser Stelle sagen: Danke!



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
**STAUFBENGRING 15**  
**D-35396 GIESSEN**

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6501-0



9 783835 1965010