

Charakterisierung der Polysialylierung im Blut

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

vorgelegt von Saftenberger, Max Walter
aus Schweinfurt

Gießen 2019

Aus dem Biochemischen Institut, unter Leitung von Prof. Dr. Lienhard Schmitz, des
Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: PD Dr. Sebastian Galuska
 2. Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Sauer
- Tag der Disputation: 12.09.2019

*Für meine Eltern Ulrike und Gerhard
Saftenberger*

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Polysialinsäure (PolySia)	2
1.1.1	Struktureller Aufbau	2
1.1.2	Biosynthese	3
1.1.3	Biologische Funktion der Sialinsäuren	4
1.2	PolySia-NCAM.....	6
1.2.1	Neurales Zelladhäsionsmolekül (NCAM)	6
1.2.2	Polysialylierung von NCAM.....	7
1.2.3	Biologische Funktion von PolySia-NCAM	8
1.3	Blut	9
1.3.1	Blutplasma.....	10
1.3.2	Blutserum	10
1.4	Exosomen und andere extrazelluläre Vesikel	11
1.5	Neutrophil Extracellular Traps (NET)	15
2	Ziel der Arbeit	19
3	Material und Methoden.....	20
3.1	Verbrauchsmaterialien, Chemikalien	20
3.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	20
3.1.2	Chemikalien.....	20
3.1.3	Nährmedien und Zellkultursätze	20
3.2	Probenmaterial	21
3.2.1	Humanes Serum und Plasma	21
3.2.2	Extrazelluläre Vesikel	21
3.2.2.1	Methode 1 der Gewinnung von extrazellulären Vesikeln	21
3.2.2.2	Methode 2 der Gewinnung von extrazellulären Vesikeln	22
3.3	Biologische Materialien.....	24
3.3.1	Primäre und Sekundäre Antikörper	24
3.3.2	Enzyme	24
3.3.3	Zelllinie	25
3.4	Enzymverdau.....	25
3.5	Proteinanalytische Methoden.....	25
3.5.1	Affinitätsaufreinigung	25

3.5.1.1	Vorbereitung der Beads	25
3.5.1.2	Ligandenisolation	27
3.5.2	SDS-Gelelektrophorese	27
3.5.3	Western Blot	29
3.5.4	Immunfärbung und Entwicklung der Western Blots	30
3.5.5	Dot Blot	31
3.6	HPLC	32
3.7	Zellbiologische Methoden	34
3.7.1	Kultivierung der A549 Lungenepithelzellen	34
3.7.1.1	Passagieren von Zellen	34
3.7.1.2	Einfrieren der Zellen	35
3.7.1.3	Auftauen von Zellen	36
3.7.2	Zellzählung mittels Neubauer-Kammer und Trypanblaufärbung	36
3.7.3	Inkubation der Zellen mit Histonen und Exosomen	37
3.7.4	Zytotoxizitätsmessung	37
4	Ergebnisse	40
4.1	Polysialylierung fetalen Kälberserums (FBS)	40
4.2	PolySia in humanem Serum und Plasma	41
4.3	PolySia-Nachweis auf extrazellulären Vesikeln	42
4.4	Kettenlängenbestimmung PolySia	44
4.5	Zusammenhang zwischen PolySia und Histonen	46
4.6	Zytotoxizitäts-Assay	47
5	Diskussion	49
5.1	PolySia-Nachweis in Blutplasma und -serum	49
5.2	Extrazelluläre Vesikel und PolySia	50
5.3	PolySia im Zusammenhang mit Zytotoxizität von Histonen	52
6	Kurzzusammenfassung	58
7	Summary	59
8	Abkürzungen	60
9	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	63
10	Referenz	64
11	Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit	76
12	Ehrenwörtliche Erklärung	77
13	Danksagung	78

1 Einleitung

Zelluläre Kommunikation, so ist es aus heutiger wissenschaftlicher Sicht klar, bildet die Basis für die Funktion eines jeden Organismus. Dabei stößt die Wissenschaft in den Fragen, wie genau diese Kommunikation geregelt ist, wie tief sie greift und wie sie begrenzt wird, immer wieder an die eigenen Grenzen. Obwohl immer wieder neue Entdeckungen in diesem Feld gemacht werden, sind noch lange nicht alle Fragen beantwortet, sowie nicht alle Prozesse oder gar alle Feinheiten verstanden.

In einem besonderen Maße trifft das auf Kommunikationswege im Immunsystem zu. In den letzten Jahrzehnten sind hier bahnbrechende Errungenschaften gemacht worden, die unser Verständnis davon, wie sich ein Organismus gegen Eindringlinge verteidigt, erweitert, aber sicher noch nicht vervollständigt hat. So sind wir auch heute in der Medizin nicht in der Lage, allumfänglich auf die Frage zu antworten, warum manche Menschen eine Autoimmunerkrankung entwickeln oder welche Rolle das Immunsystem beim Entstehen maligner Erkrankungen spielt. Man ist sich allerdings darüber einig, dass das Immunsystem Einfluss auf eben diese Prozesse hat und führt deshalb extensive Untersuchungen, sowohl in der Grundlagen-, als auch in der klinischen Forschung durch, um möglichst ganzheitlich die Mechanismen unseres Immunsystems zu verstehen.

Mit dem Immun- ist das Blutsystem eng verknüpft und bildet einen maßgeblichen Faktor für die Funktion und den Erhalt einer geregelten Antwort auf die Anforderungen, denen unser Organismus ausgesetzt ist. Der Blutkreislauf mit all seinen Gefäßen erlaubt dabei einen Stofftransport bis in den „letzten Winkel“ unseres Körpers und ist damit Vermittler, Akzeptor- und Effektororgan in einem. Wie sich dabei das Blut- und Immunsystem gegenseitig beeinflussen und bedingen, ist Gegenstand unzähliger Forschungsvorhaben.

Im Rahmen dieser Dissertation geht es um eine posttranslationale Proteinmodifikation, deren Transport im Blut und ihre möglichen Auswirkungen auf immunmodulatorische Vorgänge im Gesamtorganismus Mensch.

1.1 Polysialinsäure (PolySia)

1.1.1 Struktureller Aufbau

Die Polysialinsäure (PolySia) ist ein Homopolymer aus *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), die aus mehr als 50 Sialinsäureresten aufgebaut sein kann (Corfield, Wember, Schauer, & Rott, 1982; Finne, 1982; S. P. Galuska et al., 2006) (Abbildung 1). Die Sialinsäuren sind α -Ketosäuren, die ein Grundgerüst aus neun Kohlenstoffatomen (C9-Gerüst) besitzen, mit einer Carboxylgruppe in C1-Position und einer Keto-Gruppe in C2-Position (T. Angata & Varki, 2002; Schauer, 2004). Man konnte bisher mehr als 50 natürlich vorkommende Neuraminsäure-Derivate identifizieren (K. Angata, Suzuki, & Fukuda, 2002; Kelm & Schauer, 1997), von diesen werden allerdings nur wenige zum Aufbau von PolySia genutzt. Neben der *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) zählen *N*-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc) und die Deaminoneuraminsäure (KDN) zu den am häufigsten exprimierten Strukturvarianten (Mühlenhoff, Eckhardt, & Gerardy-Schahn, 1998). Daneben kann die *N*-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc) zwar nicht von Menschen synthetisiert werden, wohl aber durch die Nahrung aufgenommen und für den Aufbau von Glykokonjugaten verwendet werden. Ein Umstand der zum Beispiel für die potenziell kanzerogene Wirkung von Fleisch verantwortlich gemacht (Samraj et al., 2015). PolySia taucht als terminale, posttranslationale Modifikation komplexer *N*- und *O*-Glykane auf (T. Angata & Varki, 2002; C. E. Galuska, T. Lutteke, et al., 2017).

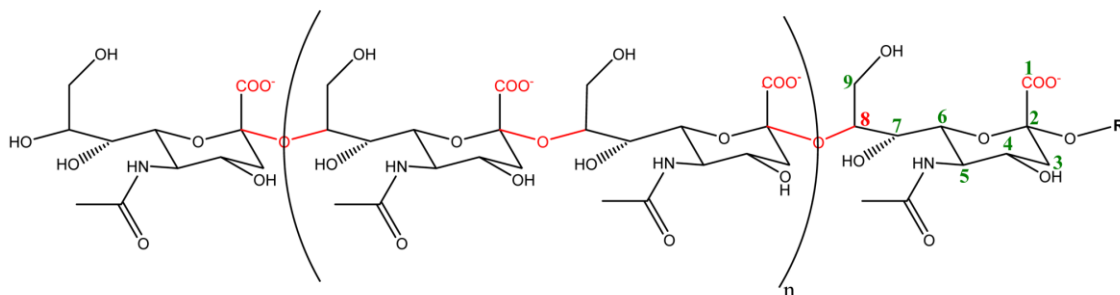


Abbildung 1: Darstellung eines α 2,8-verknüpften Neu5Ac-Polymers. Die Neu5AC gehört zur Familie der Sialinsäuren und hat ein Grundgerüst aus 9 Kohlenstoffatomen (grün dargestellt), sowie unter physiologischen Bedingungen ein Carboxylanion (ebenfalls rot dargestellt). Die Verknüpfungen an den Stellen 2 und 8 sind rot dargestellt. CC-BY Grafik modifiziert nach (C. E. Galuska, T. Lutteke, et al., 2017).

1.1.2 Biosynthese

Die Synthese von N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) erstreckt sich auf weite Teile der Zelle, vom Zellkern, über den Golgi-Apparat und dem vesikulären Transport an die Plasmamembran. Der gesamte Zyklus wird dabei im Sinne einer Feedback-Hemmung durch das Endprodukt CMP-Neu5Ac geregelt. Dieses wirkt hemmend auf das initiale Enzym UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (GNE), welches somit das Schlüsselenzym des Kreislaufs darstellt (Kornfeld, Kornfeld, Neufeld, & O'Brien, 1964). Die Biosynthese von PolySia ist im Gegensatz zu anderen Glykosylierungen proteinspezifisch, das heißt, nur wenige Proteine kommen als Substrate für die beiden Polysialyltransferasen im Golgi-Apparat, ST8SialII und ST8SialIV, in Frage (K. Angata et al., 2002; Colley, 2010). Weitere Enzyme der Sialyltransferasefamilie, die die N-Glykosylierung in Säugetieren leisten können, sind z.B. die ST6Gal-I, ST6Gal-II, ST3Gal-IV sowie die ST3Gal-VI. Sie sind im Unterschied zu den beiden oben genannten Transferasen nicht in der Lage eine Polysialinsäurekette zu generieren (Bhide & Colley, 2016), sondern können lediglich einen Sialinsäurerest an eine terminal Galaktose transferieren (Sato et al., 2000). Dies stellt jedoch die Grundvoraussetzung dar, damit ST8SialII und ST8SialIV mit der Synthese von PolySia beginnen können, da immer Neu5Ac als Akzeptor genutzt wird. Die Substratspezifität für die Polysialylierung wird wohl durch Protein-Protein-Interaktion gewährleistet, die so die Substrate binden kann (Bhide, Fernandes, & Colley, 2016; Colley, 2010; Colley, Kitajima, & Sato, 2014). Die Proteine, die PolySia tragen können, sind: das häufigste Akzeptormolekül „neural cell adhesion molecule“ NCAM (Finne, Finne, Deagostini-Bazin, & Goridis, 1983; Rothbard, Brackenbury, Cunningham, & Edelman, 1982), das „synaptic cell adhesion molecule“ SynCam-1 (S. P. Galuska et al., 2010), Neuropilin-2 (NRP-2) (Curreli, Arany, Gerardy-Schahn, Mann, & Stamatou, 2007), der C-C chemokine receptor type 7 (CCR7) (Kiermaier et al., 2016), E-selectin ligand-1 (Werneburg et al., 2016), die α -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals (James & Agnew, 1987; Zuber, Lackie, Catterall, & Roth, 1992), der CD36 Scavenger-Rezeptor in der Muttermilch (Yabe, Sato, Matsuda, & Kitajima, 2003) sowie die beiden Polysialyltransferasen selbst, die die Fähigkeit zur Autopolysialylierung besitzen (Mühlenhoff, Eckhardt, Bethe, Frosch, & Gerardy-Schahn, 1996; Simon et al., 2013). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass noch weitere Proteine PolySia tragen können. Die oben angesprochenen terminalen Sialinsäuren, die nötig sind, um an ST8SialII oder ST8SialIV zu binden, sind dabei in einer α 2,3- oder einer α 2,6-glykosidischen Bindung mit Galaktose verbunden. Weitere Verknüpfung der Neu5Ac-Untereinheiten erfolgt in α 2,8 glykosidi-

scher Bindung und lässt so eine PolySia-Kette bis über 80 Untereinheiten entstehen (S. P. Galuska, Geyer, Gerardy-Schahn, Mühlenhoff, & Geyer, 2008) (Abbildung 2).

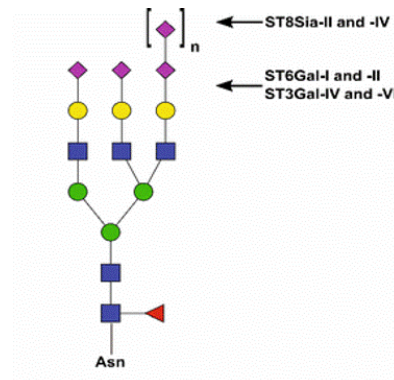


Abbildung 2: Schematische N-Glykan Darstellung nach Polysialylierung. Die schematisch gezeigte Polysialylierung eines N-Glykans verdeutlicht, dass nur die Enzyme ST8Sia-II und IV in der Lage sind, eine Polymerkette zu bilden. Pinke Rauten, Neu5Ac; gelbe Kreise, Galaktose; blaue Quadrate, N-Acetyl-Glucosamin; grüne Kreise, Mannose; Asn, Asparaginrest. CC-BY Grafik modifiziert nach (Bhide & Colley, 2016).

1.1.3 Biologische Funktion der Sialinsäuren

Die Polysialinsäure besitzt einen hohen Anteil an deprotonierten Carboxylgruppen, die dem Molekül im physiologischen pH-Wert eine stark negative Ladung geben. Es verhält sich damit ähnlich einer Phosphatgruppe, lediglich größer. Dabei können die negativ geladenen PolySia-Ketten oft länger als das Trägerprotein werden (Abbildung 3) und so eine beträchtliche Hydrathülle erzeugen. Zudem zeichnen sich diese linearen Ketten dadurch aus, dass sie in ihrer Struktur sehr flexibel sind.

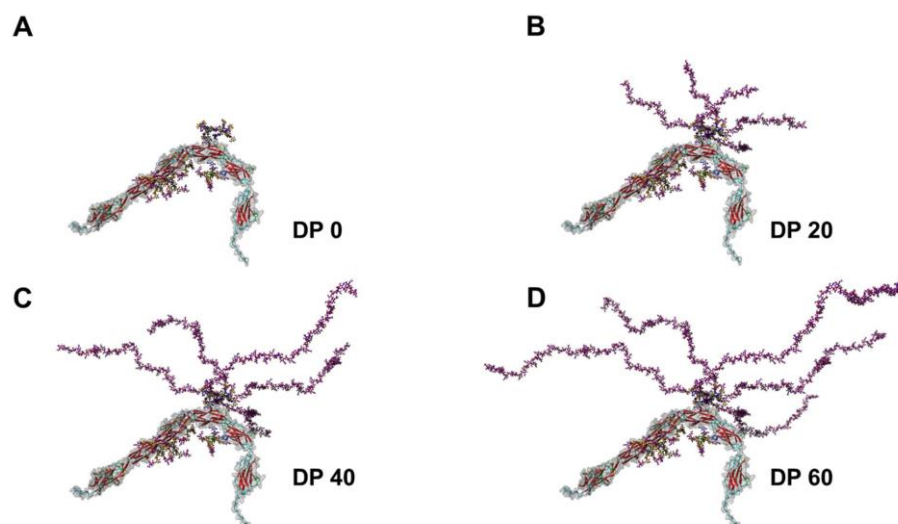


Abbildung 3: Darstellung von NCAM mit unterschiedlichem Polysialylierungsgrad. DP gibt hierbei die jeweilige Anzahl an Sialinsäuren pro Kette an (DP, degree of polymerization), ansteigend von A-D. Der genaue Aufbau des NCAM-Moleküls wird nochmals in Abbildung 4 dargestellt. CC-BY Grafik modifiziert nach (C. E. Galuska, T. Lutke, et al., 2017).

Generell können Sialinsäuren durch ihre chemischen Eigenschaften z.B. die Proteinkonformation bestimmen sowie zusätzlich die Protein-Protein- bzw. Protein-Extrazellulärmatrix-Interaktion regulieren. Sialylierte Glykane sind Bindungspartner für Lektine, bestimmen die Ligandenbindung sowie die Signalweitergabe an Rezeptoren und sind an der Zellmigration während der Entwicklung beteiligt (Bhide & Colley, 2016). Diese verschiedenen Proteinbindungen führen zu einer Vielzahl von Prozessen, an denen Sialinsäuren und PolySia beteiligt sind. So ist etwa die Sialylierung von Glykoproteinen ein wichtiger Eintrittsrezeptor für verschiedene Viren, wie z.B. die Adeno-, Influenza-, Corona-, Rota-, Toro-, Reoviren (Matrosovich, Herrler, & Klenk, 2015). Unter den Lektinen können Sialinsäuren an Siglecs binden, die sich auf einer Vielzahl von Immunzellen befinden und dem Immunsystem die Möglichkeit geben, zwischen körperfremd und körpereigen zu unterscheiden. Dieser Prozess wird von Bakterien, wie zum Beispiel der Gruppe B Streptokokken ausgenutzt, die durch einen Überzug aus sialylierten Glykanen so als körpereigen erkannt werden (Bhide & Colley, 2016; Macauley, Crocker, & Paulson, 2014). Daneben verhindern Siglec-2 und Siglec-10 Autoimmunprozesse, indem sie durch Ausbildung einer sogenannten B-Zell-Toleranz die Bildung von Autoimmunantikörpern verhindert (Macauley et al., 2014; Paulson, Macauley, & Kawasaki, 2012).

Neben den Siglecs sind Selektine wichtige Proteine im Zusammenspiel mit Sialinsäuren. Die kohlenhydratbindenden Proteine können die sialyl Lewis X structure (sLe^x) erkennen, diese binden und so die Adhäsion von Plättchen, Leukozyten und anderen Immunzellen an Stellen von Verletzung und Entzündung im Gefäßsystem steuern (McEver, 2015). Zusätzlich wird die Ausbildung von Selektinliganden auf malignen Zellen für deren Metastasierungsfähigkeit mitverantwortlich gemacht (Läubli & Borsig, 2010). Im Zusammenspiel mit der Tatsache, dass erhöhte PolySia-Werte bei Krebsarten wie dem kleinzelligen und nichtkleinzelligen Lungenkarzinom (Kibbelaar et al., 1989), dem Neuroblastom, dem Pankreaskarzinom, den Hypophysentumoren, dem Wilms-Tumor (Roth et al., 1988), dem Rhabdomyosarkom und Brusttumoren (Bhide & Colley, 2016; Falconer, Errington, Shnyder, Smith, & Patterson, 2012; X. Wang et al., 2016) gefunden wurden und im Zusammenhang mit deren Stadium und Metastasierung stehen, ergibt sich eine mögliche gegenseitige Beeinflussung mit Steigerung der Malignität von Tumoren. Dieser Zusammenhang zum Tumorwachstum lässt sich allerdings auch für die Sialidasen bzw. Neuraminidasen (NEU 1-4), also die Enzyme die den Abbau von Sialinsäuren koordinieren, nachweisen, sodass hier weitere Forschung und Differenzierung nötig ist (Miyagi & Yamaguchi, 2012; Pearce & Läubli, 2016).

1.2 *PolySia-NCAM*

Da bisher die meisten Studien über PolySia im Zusammenhang mit NCAM stehen, werden im folgenden Abschnitt ausgewählte Erkenntnisse aus diesen Arbeiten vorgestellt.

1.2.1 **Neurales Zelladhäsionsmolekül (NCAM)**

In der neuronalen Entwicklung sind Zelladhäsionsmolekül aus der Immunoglobulin Superfamilie (IgCAMs) schon länger als wichtiger Marker für die Entwicklung von Synapsen und zielgerichtetem Neuronenwachstum bekannt. Zu der Familie der IgCAMs gehören das neural cell adhesion molecule (NCAM), Neuroplastin, L1, nahe Verwandte des L1 (CHL1), Telencephalin (TLCN), Thy-1 und Contactine (Dityatev, Bukalo, & Schachner, 2008). NCAM ist dabei der am längsten bekannte Vertreter und wird sowohl auf Gliazellen, als auch auf Neuronen im ZNS exprimiert (Jorgensen & Bock, 1974).

Alle Vertreter der IgSF besitzen eine immunoglobulinähnliche Domäne, die in den extrazellulären Raum reicht. Im Falle von NCAM besteht dieser Bereich aus fünf Ig-Domänen, auf die zwei Fibronectin-III-ähnliche Domänen folgen (Cunningham et al., 1987). Dabei wird NCAM durch ein auf Chromosom 11 liegendes Gen codiert (Nguyen et al., 1986), welches durch alternatives Splicen, der pre-mRNA, 190 verschiedene Transkripte erlaubt. Dennoch werden nur drei Hauptisoformen auf Basis ihrer apparenten Molekülmasse unterschieden: NCAM-120, NCAM-140 und NCAM-180.

Die beiden großen Isoformen sind dabei single-pass Transmembranproteine, d. h. sie durchziehen die Membran ein Mal. Sie unterscheiden sich in ihrer intrazellulären Domäne voneinander, die beim NCAM-140 aus 120 Aminosäureeinheiten (AS) und beim NCAM-180 aus 385 AS besteht. NCAM-120 ist mit einem Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Anker mit der Zellmembran verbunden (Hinsby, Berezin, & Bock, 2004).

Die drei membranständigen Isoformen werden noch durch eine nicht membranständige, lösliche NCAM-Isoform ergänzt (Bock et al., 1987). Diese lösliche Form kann dabei durch unterschiedliche Prozesse entstehen: Entweder durch alternatives Splicen und unter der Voraussetzung eines zusätzlichen Exons, welches dazu führt, dass NCAM nicht in die Membran eingebaut wird (Bock et al., 1987), enzymatische Spaltung durch eine postulierte Phosphatidyl-Inositol-spezifische Phospholipase C, die die Verbindung des GPI-Ankers der NCAM-120 Isoform mit der Zellmembran löst, oder proteolytische Spaltung des extrazellulären Anteils einer der drei NCAM-Hauptisoformen (Olsen, Krog, Edvardsen, Skovgaard, & Bock, 1993; Secher, 2010). Diese unterschiedlichen

Freisetzungsmechanismen führen dazu, dass lösliches NCAM in apparenten Molekulargewichten nachgewiesen werden kann.

1.2.2 Polysialylierung von NCAM

Grundsätzlich können alle NCAM-Isoformen unterschiedlich posttranslational modifiziert werden. Welcher Mechanismus dabei zum Tragen kommt, hängt davon ab, ob der intra- oder extrazelluläre Anteil des Proteins modifiziert wird. So hat zum Beispiel der N-terminale Anteil der zytoplasmatischen Domäne eine Palmitoylierungsstelle (Murray, Hoffman, & Cunningham, 1987), die bei Palmitoylierung dazu führt, dass NCAM fester in der Zellmembran verankert oder in Membranmikrodomänen (lipid rafts) eingebaut wird (Niethammer et al., 2002). Transmembranäre Isoformen können über die Aminosäurereste von Serin und Threonin phosphoryliert werden (Sorkin, Hoffman, Edelman, & Cunningham, 1984), was wiederum bei der NCAM-180-Isoform zu Kontakt mit dem Zytoskelettbestandteil Spektrin führt (Sytnyk et al., 2002). Die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von intrazellulärem Threoninresten des NCAMs führt zur Regulation des NCAM-vermittelten NF κ B (nuclear factor, 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)-Signaltransduktionsweges (Little, Crossin, Krushel, Edelman, & Cunningham, 2001).

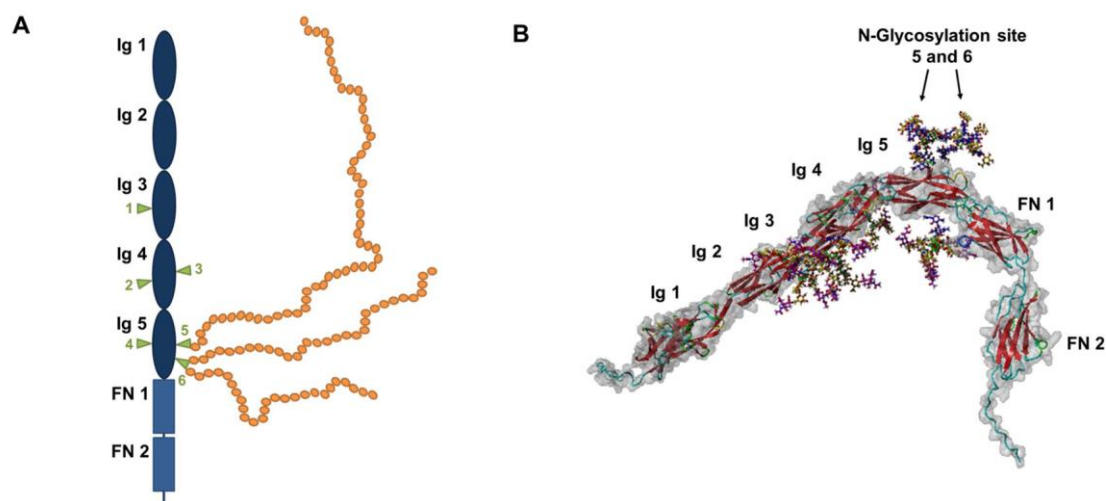


Abbildung 4: Die Domänen und N-Glykosylierungsstellen von NCAM sind als A) schematische Darstellung sowie B) als 3D-Modell visualisiert worden. N-Glykosylierungsstellen 5 und 6 sind in A) grüne Dreiecke, inklusive PolSia-Kette (gelbe Kreise). Ig: die immunglobulinähnliche Domäne, FN: Fibronectin-III-ähnliche Domänen. CC-BY Grafik modifiziert nach (C. E. Galuska, Lutteke, & Galuska, 2017).

Die weitreichendste posttranslationale Modifikation findet allerdings im Golgi-Apparat statt, die Glykosylierung, die Einfluss auf Proteinfaltung, Stabilität und Funktion nimmt (Kiss & Rougon, 1997). Die Ig-Domäne des NCAMs besitzt sechs potenzielle N-

Glykosylierungsstellen (Asn 203, 297, 329, 415, 441 und 470). Die PolySia-Kette wird dabei, als terminale Modifikation von N-Glykanen an Position 5 und 6 angehängt, die innerhalb der fünften Ig-Domäne lokalisiert sind (Abbildung 4) (Liedtke et al., 2001; von Der Ohe et al., 2002).

1.2.3 Biologische Funktion von PolySia-NCAM

NCAM ist für die Ausbildung calciumunabhängiger Zell-Zell- bzw. Zell-Extrazellulär-matrixkontakten bekannt, die es über homophile bzw. heterophile Wechselwirkungen erreicht. Dabei kann es die homophilen Wechselwirkungen in *cis*-Konfiguration (zwischen NCAM-Molekülen der gleichen Zelle) oder in *trans*-Konfiguration (zwischen NCAM-Molekülen benachbarter Zellen) ausbilden.

PolySia-NCAM ist sehr früh in der Entwicklung des Organismus, in allen drei Keimblättern (Entoderm, Mesoderm, Ektoderm), anzutreffen und wurde in den Organanlagen von Niere, quergestreifter Muskulatur, Herz und Lunge nachgewiesen (Lackie, Zuber, & Roth, 1990, 1991, 1994). Im Nervensystem wirkt NCAM als integraler Bestandteil beim Wachstum von Neuriten, in der Zellmigration und dem Zellwachstum, sowie der Ausbildung von Synapsen mit (Dityatev, Dityateva, & Schachner, 2000; Maness & Schachner, 2007). Aber nicht nur in der Entwicklung, sondern auch im adulten Hirn sind sowohl PolySia, NCAM und PolySia-NCAM im präfrontal Kortex (Gilabert-Juan, Castillo-Gomez, Pérez-Rando, Moltó, & Nacher, 2011), im Hippocampus (Nacher, Blasco-Ibáñez, & McEwen, 2002), in der Area entorhinalis (Gómez-Climent et al., 2011), der Amygdala (Gilabert-Juan et al., 2011; Nacher, Lanuza, & McEwen, 2002) und dem olfaktorischen Cortex (Carceller, Rovira-Esteban, Nacher, Castrén, & Guirado, 2016) präsent. Früher ging man davon aus, dass PolySia-NCAM nur über seine oben beschriebenen Eigenschaften einen Zell-Zell-Kontakt verhindert. Neuere Forschung konnte beweisen, dass PolySia/PolySia-NCAM auch direkt in der Lage ist, über Inhibierung von NMDA-Rezeptoren in die Funktion des ZNS einzugreifen (Hammond et al., 2006). Dies konnte nach einem Verdau der PolySia durch Endoneuraminidase (EndoN) im Zellkulturversuch ebenfalls bestätigt werden (Varbanov & Dityatev, 2016). Zusätzlich konnte im Mausmodell sowohl die PolySia-NCAM-positiven Hirnareale, als auch die Hypothese, dass PolySia-NCAM mit der neuronalen Plastizität und Lernprozessen im adulten Gehirn in Zusammenhang steht, bewiesen werden (Markram, Gerardy-Schahn, & Sandi, 2007; Stork et al., 2000). Dafür wurden Mäusen Antikörper gegen NCAM oder aktive EndoN zugeführt, bzw. Knockoutmodelle ohne NCAM-Produktion gezüchtet. In den Versuchen zeigten die Mäuse eine eingeschränkte Lernfähigkeit und ein geringeres Angstverhalten. Reaktionen, die nach neurologischem Kenntnisstand auf die oben genannten Hirnarealen zurück gehen

(Kochlamazashvili et al., 2010; Markram et al., 2007; Stork et al., 2000; Zerwas et al., 2016). Aus diesem Grund ist das PolySia-NCAM-Molekül auch im Zusammenhang mit neuropsychiatrischen Befunden von Interesse. Studien konnten Veränderungen der PolySia-NCAM-Menge im Zusammenhang mit Schizophrenie, Bipolarer Störung, Depression, Angststörungen und Alzheimer bringen (Brenneman & Maness, 2010). Dabei konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Serum-PolySia-Wert in Schizophrenie-Patienten mit einem höheren Maß an Negativsymptomen und einem kleineren Brodmann Areal in präfrontalen Kortex in Verbindung steht (Piras et al., 2015).

Das Tumorwachstum und die Metastasierung sind ebenfalls eng mit PolySia-NCAM verbunden und wurden bereits im Unterpunkt 1.1.3 beschrieben.

Weniger umfangreich ist die Funktion von PolySia-NCAM im Immunsystem erforscht. So ist auf ausgereiften dendritischen Zellen das Oberflächenprotein Neuropilin-2 polysialyliert und kann damit die Migration der Zellen modulieren (Bax, van Vliet, Litjens, Garcia-Vallejo, & van Kooyk, 2009; Rey-Gallardo, Delgado-Martin, Gerardy-Schahn, Rodriguez-Fernandez, & Vega, 2011; Rey-Gallardo et al., 2010). Außerdem konnte PolySia auf Oberflächenglykoproteinen von Monozyten/Makrophagen, natürlichen Killerzellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen nachgewiesen werden (Curreli et al., 2007; Drake et al., 2008; Drake et al., 2009; Husmann, Pietsch, Fleischer, Weisgerber, & Bitter-Suermann, 1989; Moebius, Widera, Schmitz, Kaltschmidt, & Piechaczek, 2007).

1.3 Blut

Blut ist integraler Bestandteil für das Überleben des Organismus mit einem vielschichtigen Aufgabenfeld. Darunter fallen der Transport von u. a. Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid, Nährstoffen, Stoffwechselprodukten, Elektrolyten, Wärme, die Signalübermittlung über Hormone und andere Botenstoffe, Stabilisierung des Säure-Base-Haushaltes im Zusammenspiel mit anderen Organen und die immunologische Abwehr. Das Blutssystem bildet mit dem Nerven- und Lymphsystem ein Kommunikations- und Transportweg im Körper, welches die Vernetzung verschiedener Organe und deren Versorgung ermöglicht. Dabei lässt sich das Blut in einen zellulären und einen flüssigen Anteil aufteilen, deren Verhältnis zueinander im sogenannten Hämatokrit Ausdruck findet. Die Blutzellen haben verschiedene Aufgaben, so sind die Erythrozyten für den Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxid-Transport verantwortlich. Unter den Leukozyten, den weißen Blutkörperchen, sind die neutrophilen Granulozyten die Häufigsten. Sie gewährleisten eine unspezifische Immunabwehr, während die Mono- und Lymphozyten für eine gerichtete Immunantwort gebraucht werden. Die Thrombozyten sind wichtige Induktoren

der Gerinnung und erfüllen so Aufgaben in der Hämostase. Der zelluläre Bestandteil des Blutes wird zu 99 % durch die Erythrozyten gebildet, sodass der Hämatokrit zusammen mit dem Hämoglobinwert in der klinischen Praxis häufig als Prädiktor für die Menge an roten Blutkörperchen genutzt wird (Herold, 2017; Silbernagl & Despopoulos, 2012; Silbernagl & Lang, 2013).

1.3.1 Blutplasma

Unter Blutplasma versteht man die nicht-zellulären Anteile des Blutes. Es besteht dabei zu 90 % aus Wasser und zu 10 % aus darin gelösten Stoffen. Das Plasma erfüllt die Aufgabe des Transportes von Elektrolyten, Nährstoffen wie der Glukose oder Lipiden, Stoffwechselprodukten, wie zum Beispiel Kreatinin und Hormonen. Zusätzlich ist es Träger der Plasmaproteine, die man nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung in Albumin und vier Globulin-Unterklassen aufteilen kann (α_1 -, α_2 -, β -, γ -Globuline). Albumin ist mit 60 %, der stärkste Vertreter der Plasmaproteinklasse, mit einer Proteingesamtkonzentration von ca. 60-80 g/l. Die Globuline sind hauptsächlich Glyko-, Lipo- und Metalloproteine. Die Plasmaproteine sind für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks, des Blut-pH-Wertes und des spezifischen sowie unspezifischen Transportes von wasserunlöslichen Stoffen verantwortlich. Zudem sind sie Teil des Komplementsystems, teilweise Akut-Phase-Proteine und mit der γ -Globulingruppe, den Immunglobulinen, wichtiger Teil des Immunsystems. Zusätzlich enthält das Blutplasma die Gerinnungsfaktoren und deren Inhibitoren, sodass das Plasma die Hämostase überhaupt erst möglich macht (Adkins et al., 2002; Berg, 2015; Berg, Tymoczko, & Stryer, 2013).

1.3.2 Blutserum

Das Serum ist der flüssige Anteil des Blutes, der keine geronnenen Blutbestandteile mehr enthält. Es ist also das Blutplasma, abzüglich seiner Gerinnungsfaktoren, sodass es eine leicht veränderte Proteinzusammensetzung im Vergleich zum Plasma hat, mit einem geringfügig höheren Albuminanteil am Proteinanteil, mit 62 % Albumin, bei nur 7 % Protein im Vergleich zu 91 % Wasser, die restlichen 2–3 % entfallen auf Elektrolyte, Nähr- und Abfallstoffe, wie auch im Blutplasma (Behrends, Bischofberger, & Deutzmann, 2017; Berg et al., 2013).

1.4 Exosomen und andere extrazelluläre Vesikel

Bedenkt man die Entdeckung und Benennung von Exosomen vor gut 30 Jahren durch Trams, im Rahmen der Entstehung von Vesikeln, hat es eine erstaunlich lange Zeit gedauert, bis sie zu einem größeren Interesse in der Wissenschaft führten (Trams, Lauter, Salem, & Heine, 1981). Dabei ist die Namensgebung für Exosomen nicht einheitlich geregelt, wobei viele Autoren zwischen Exosomen und Mikrovesikeln unterscheiden (Cocucci, Racchetti, & Meldolesi, 2009). Während Mikrovesikel von der Zellmembran abgekapselt werden, entstehen die Exosome aus dem Endosom der Zellen. Dabei werden Exosomen als Vesikel mit einer Größe zwischen 30–120 nm betrachtet, die einen sphärischen Aufbau und eine Lipid-Bilayer-Membran besitzen (Zheng, Chen, Zhang, Zhang, & Lin, 2014). Aufgrund der Bilayer-Struktur und damit verbundenen physikalischen Überlegungen postuliert man ein Fassungsvermögen von etwa 10^{-24} l, ein Volumen, welches die Aufnahme von bis zu 100 Proteinen bzw. bis zu 10 000 Nukleotiden ermöglicht (Vlassov, Magdaleno, Setterquist, & Conrad, 2012). Aus einem Milliliter Blutplasma sind, je nach Autor, zwischen 3×10^6 – 3×10^{12} Exosomen/ml zu extrahieren (Li et al., 2014; Vlassov et al., 2012).

Den Grundstein, nach der Namensgebung durch Trams, legte eine elektronenmikroskopische Darstellung, der Exozytose von Transferrinrezeptoren aus maturierenden Retikulozyten (Harding, Heuser, & Stahl, 1983). Dabei postulierten die Forscher die Entstehung von sogenannten MVBs (multivesicular bodies) oder MVEs (multivesicular endosomes) aus dem Endosom. Diese MVEs/MVBs konnten dann entweder mit der Plasmamembran verschmelzen und aus der Zelle heraustreten, oder aber Richtung Lysosom transportiert und innerhalb der Zelle abgebaut werden (Abbildung 5) (Harding, Heuser, & Stahl, 1984). Dieser Transport zur Zelloberfläche oder zum Lysosom scheint durch die Zusammensetzung der Membran der MVEs bestimmt zu sein. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass eine Membran mit wenig Cholesterol zu einer Migration hin zum Lysosom führte, während die cholesterinreichen MVBs zu Exosomen wurden (Möbius et al., 2002). Man glaubte deshalb, bei Exosomen müsse es sich um die „Müllbeutel“ der Zelle handeln, die das Lysosom unterstützen, beziehungsweise den Zellen, die nahe an Ausscheidungsorganen liegen, eine zusätzliche Möglichkeit des Abtransports geben (Vlassov et al., 2012). Spätestens nachdem aber aktive Enzyme (Johnstone, Adam, Hammond, Orr, & Turbide, 1987) und Proteine sowie RNA (Valadi et al., 2007) in Exosomen nachgewiesen wurden, wandelte sich das Bild vom Abfallsystem hin zum Kommunikationssystem zwischen Zellen.

Mittlerweile hat man herausgefunden, dass beinahe alle Zellen, wie unter anderem hämatopoetische Zellen, B- und T-Zellen, dendritische Zellen, Mastzellen, Zellen des neuronalen Systems, sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* Exosomen bilden (Yamada, Inoshima, Matsuda, & Ishiguro, 2012) und man diese in Körperflüssigkeiten, wie zum Beispiel Blut (Caby, Lankar, Vincendeau-Scherrer, Raposo, & Bonnerot, 2005), Sperma (Ronquist & Brody, 1985), Urin (Pisitkun, Shen, & Knepper, 2004), Saliva, Sputum (Ogawa et al., 2011), Liquor (Vella et al., 2007), Muttermilch (Admyre et al., 2007), Amnionflüssigkeit (Asea et al., 2008), Galle (Masyuk et al., 2010), Aszites und malignen Ergüssen (Andre et al., 2002), isolieren kann.

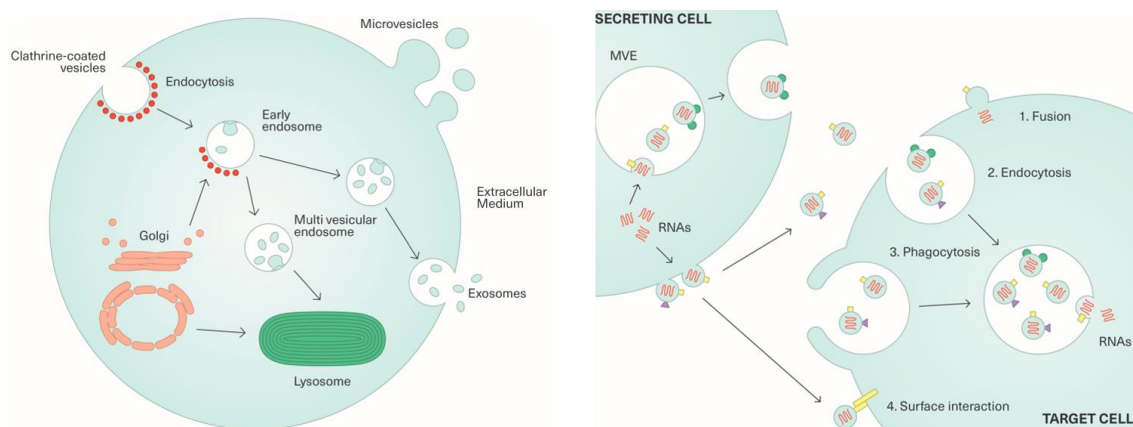


Abbildung 5: Exosomen-Entstehungsweg und RNA-Transport über Exosomen. Die gezeigten Bilder, stehen schematisch für die intrazelluläre Entstehung und Beladung von Exosomen. Dabei wird in der linken Grafik gezeigt, wie aus einem Endosom ein MVE entsteht, welches dann entweder Richtung intrazellulären Abbau im Lysosom wandert oder als Exosome aus der Zelle freigesetzt wird. In der rechten Grafik wird die Beladung der MVEs mit RNA aus der „Mutterzelle“ (secreting cell) gezeigt, die dann über den Exosomentransport zur Zielzelle (target cell) gelangt und zur dortigen Anlagerung über Verschmelzung mit der Membran bzw. Phagozytose aufgenommen wird und RNA in der Zielzelle freigesetzt wird (Schritte 1–4). CC-BY Grafik modifiziert nach (Guenat, Hermetet, Pretet, & Mougín, 2017; Raposo & Stoorvogel, 2013).

Aufgrund ihrer Vielzahl von Ursprungszellen ist ein einheitlicher Faktor für deren Klassifikation noch nicht gefunden. Dennoch scheinen Exosomen, regelmäßig Membrantransport- und Fusionsproteine (u.a. GTPasen), Oberflächenantigene (CD9, CD63, CD81, CD82), Heat shock-Protein (Hsp 70, Hsp 90) und Proteine, die zur MVB-Differenzierung notwendig sind (Alix, TSG101) (Conde-Vancells et al., 2008; Subra et al., 2010), zu besitzen. Außerdem ist die Außenseite von Exosomen reich an Sacchariden wie Mannose, Polylaktosaminen, α -2,6-Sialinsäuren und komplexen N-Glykanen (Batista, Eng, Pilobello, Hendricks-Muñoz, & Mahal, 2011).

Zu Beginn der biochemischen Forschung zur interzellulären Kommunikation ging man davon aus, sie sei auf einen direkten Zell-Zellkontakt bzw. auf von Zellen freigesetzte

Moleküle angewiesen. In den letzten zwei Jahrzehnten erweiterte man die Zellkommunikation um den Weg, der durch Zellen aufgenommen extrazellulären Vesikel, zu denen auch die Exosomen gehören. Während ein Teil der Untersuchungen, die Vesikel als Miniaturabbilder ihrer Mutterzellen sieht, die sich im Proteom oder der Zusammensetzung der RNA gleichen (Raimondo, Morosi, Chinello, Magni, & Pitto, 2011), konnten andere Studien zeigen, dass bestimmte RNAs in den Exosomen angereichert waren, was wiederum auf eine selektive Einlagerung in diese schließen lässt (Nolte-'t Hoen et al., 2012; Skog et al., 2008; Valadi et al., 2007). Viel wichtiger ist aber die Tatsache, dass diese mRNA, miRNA, t-RNA, small noncoding RNA, vault RNA, Y RNA sowie small interfering RNA (Bellingham, Coleman, & Hill, 2012; Nolte-'t Hoen et al., 2012) in die Zielzellen aufgenommen und dort in Proteine umgeschrieben werden kann (Ratajczak, Wysoczynski, Hayek, Janowska-Wieczorek, & Ratajczak, 2006; Valadi et al., 2007), somit einen enormen Einfluss auf die Zellfunktion hat und damit auch Möglichkeiten zur Intervention bietet (Abbildung 5).

Die Funktionen der Exosome sind so vielfältig wie ihre Entstehungsorte und häufig mit diesem verknüpft. Da sie einen „Spiegel“ ihrer Mutterzellen darstellen und auch wieder an diese binden können, wird darüber diskutiert, sie als Vehikel für Impfungen, Medikamente und Gentherapie zu nutzen (H. G. Zhang & Grizzle, 2014). Aufgrund ihres Vorkommens in allen Körperflüssigkeiten sind sie non-invasiven bzw. minimal-invasiven Eingriffen zugänglich, schnell zu isolieren und somit als wirksame Diagnostiktools im Gespräch.

Im Bereich der Diagnostik wurde der Begriff der tumor-derived Exosomes (TD-Exosomes) geprägt, der sich auf die, speziell von Tumorzellen gebildeten Exosomen, bezieht. Es konnte gezeigt werden, dass Exosomen an der Metastasierung und Angiogenese von Tumoren beteiligt sind (Hood, San, & Wickline, 2011; Rak, 2010) und über immunsuppressive Moleküle, die die Aktivität von T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen herabsetzen, das Immunsystem beeinflussen (H. G. Zhang & Grizzle, 2011). Daneben sind TD-Exosome in der Lage, ein günstiges Mikroenvironment für Tumorzellen zu schaffen, indem sie die Angiogenese und damit den Sauerstofftransport zu den Zellen erhöhen (Park et al., 2010; Tauro et al., 2013; H. G. Zhang & Grizzle, 2014). Dabei sind die TD-Exosome reich an TGF- β und VEGF (Hong et al., 2009; Park et al., 2010) und können darüber hinaus, je nach Tumorart, verschiedene weitere proangiogenetische Proteine beinhalten. Die bisher genannten Fähigkeiten der TD-Exosomen, gepaart mit der Fähigkeit, maligne Zellen zur Migration aus dem Primärtumor zu animieren, sind ein wichtiger Faktor der Metastasierung. Dabei exprimieren TD-Exosome ihren chemotaktischen Inhalt bzw. aktivieren non-maligne Zellen zur Freisetzung chemotaktischer Moleküle und bilden zusätzlich eine Matrix zur Anheftung der malignen Zellen.

nen Zellen am Metastasierungsort (Hood et al., 2011; Peinado et al., 2016; Pultz et al., 2017).

Da Exosomen, wie weiter oben erwähnt, Teil des Abfallsystems sind, konnten mehrere Studien zeigen, dass sie ein entscheidender Teil in der Resistenz gegen Chemotherapeutika sind. So konnte für die Resistenz gegen Doxorubicin eine Verknüpfung mit den Mikrovesikeln hergestellt werden (Chen, Posada, Blazer, Zhao, & Rosania, 2006; Shedden, Xie, Chandaroy, Chang, & Rosania, 2003).

In den letzten Jahren wurde auch die Möglichkeit der oben erwähnten „liquid biopsy“ mit Hilfe der Exosomen diskutiert und eine Vielzahl von Marker-Molekülen für verschiedene Tumoren gefunden. Der Nachweis für bestimmte Proteine gelang dabei für: Brust-, Prostata-, Pankreas-, Kolorektal- und Ovarialkarzinome sowie Glioblastome (Khan et al., 2014; Khan et al., 2012; Melo et al., 2015; Moon et al., 2016; Nilsson et al., 2009; Rupp et al., 2011; Szajnik et al., 2013; Yoshioka et al., 2014; Zhao, Yang, Zeng, & He, 2016). Außerdem konnten spezifische RNA/miRNA in TD-Exosomen für Brust-, Ösophagus-, Ovarial-, Kolon-, Prostata- und Pankreaskarzinome sowie Glioblastome nachgewiesen werden (Bryant et al., 2012; Hannafon et al., 2016; Kahlert et al., 2014; Liu et al., 2016; Manterola et al., 2014; Ogata-Kawata et al., 2014; Que, Ding, Chen, & Cao, 2013; Tanaka et al., 2013; Taylor & Gercel-Taylor, 2008).

Aufgrund ihrer Fähigkeit, T-Zellen und andere Zellen des Immunsystems zu steuern, sind Exosomen nicht nur Ziel in der Tumorthherapie, sondern wecken auch das Interesse der Immunologie. So konnte gezeigt werden, dass mit *Mykobakterium avium* beladene Makrophagen in der Lage sind, Exosomen zu bilden, die wiederum die Produktion von Antigen-präsentierenden Zellen erhöhen (Bhatnagar & Schorey, 2007; Bhatnagar, Shinagawa, Castellino, & Schorey, 2007). Für bestimmte Erreger, wie z.B. die Leishmaniose, konnte gezeigt werden, dass diese Exosome produzieren, die die Immunverteidigung des Wirtes herabsetzen und so eine Verbreitung des Erregers erleichtern (Silverman et al., 2010). Zusätzlich wurde gezeigt, dass sich im Falle einer Inflammation die Menge an Exosomen und MVs erhöht (Marengo, 2008; Qu et al., 2009; Ramachandra et al., 2010).

Daneben wird die Rolle von Exosomen bzw. in diesem Zusammenhang Epididymosomen und Prostatasomen, in der Spermienreifung und Befruchtung der Eizelle diskutiert. Die Epididymosomen tragen dabei verschiedene Glykoproteine in der Membran, die während der Maturation der Spermien in diese eingebaut werden (Marengo, 2008; Thimon, Frenette, Saez, Thabet, & Sullivan, 2008). Diese Exosome tragen Proteine, die die adaptive und angeborene Immunantwort auf Spermien im weiblichen Genitaltrakt verhindern können (Pandya & Cohen, 1985; Thompson, Barratt, Bolton, & Cooke, 1992).

1.5 *Neutrophil Extracellular Traps (NET)*

Unter den weißen Blutkörperchen sind die neutrophilen Granulozyten die häufigsten Vertreter und integraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems in der Abwehr gegen Mikroorganismen. Dazu haben sie die Fähigkeit zur Produktion antimikrobieller Peptide, reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) und zur Phagozytose (Decoursey & Ligeti, 2005; Nathan, 2006). Ein dritter Weg der Abwehr rückt nun in den Fokus der Wissenschaft: die Bildung sogenannter neutrophil extracellular traps, kurz NET. Dabei setzen neutrophile Granulozyten das Chromatin aus ihrem Zellkern zusammen mit Zellproteinen und Granula frei, sodass ein Netz entsteht, das unter anderem eindringende Mikroorganismen einfangen kann (Fuchs et al., 2007; van der Poll & Herwald, 2014) (Abbildung 6). Dieser Prozess konnte auch bei anderen weißen Blutkörperchen wie den Makrophagen und Mastzellen beobachtet werden (Boe, Curtis, Chen, Ippolito, & Kovacs, 2015; Möllerherm, von Köckritz-Blickwede, & Branitzki-Heinemann, 2016). Die NET-Formation erfüllt damit eine wichtige Funktion in der Abwehr, kann aber auch irregulär ausgelöst werden und wird deshalb in Zusammenhang mit mehreren Erkrankungen wie Präeklampsie (Gupta, Hasler, Gebhardt, Holzgreve, & Hahn, 2006), Parodontitis (Vitkov, Klappacher, Hannig, & Krautgartner, 2009), Appendizitis (Brinkmann et al., 2004), Asthma (Dworski, Simon, Hoskins, & Yousefi, 2011), Morbus Crohn (Yousefi et al., 2008), Mukoviszidose (Manzenreiter et al., 2012), Atherosklerose (Döring et al., 2012), Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematoses (Lande et al., 2011; Leffler et al., 2015) oder Psoriasis (Lin et al., 2011), Sepsis (Clark et al., 2007), Acute Lung injury bzw. Acute Respiratory Distress Syndrom (Caudrillier et al., 2012) sowie TRALI (Thomas et al., 2012) gebracht.

Mikroorganismen sind dabei nicht die einzigen Auslöser für die NETosis, sondern auch inflammatorische Reize und der Kontakt mit aktivierten Plättchen (Zawrotniak & Rapala-Kozik, 2013).

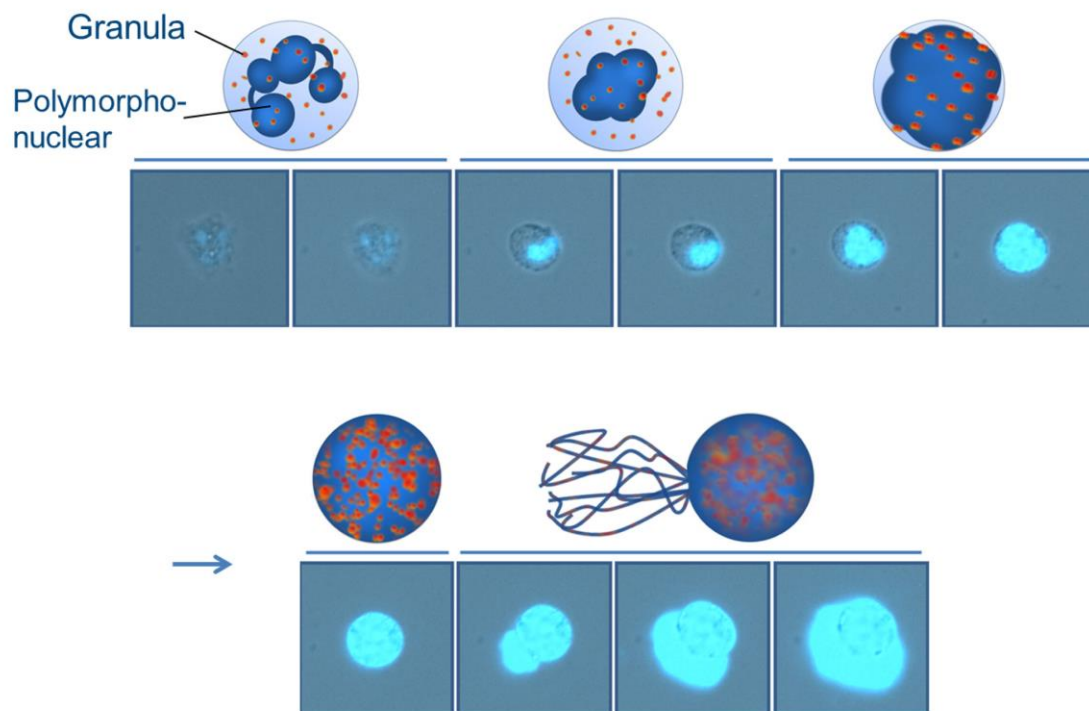


Abbildung 6: Schematische und mikroskopische Darstellung der NETosis. Dabei kommt es zu einer Dekondensation der DNA und zur Auflösung der Zellkernmembran (dunkel blau), dadurch vermischte sich das Chromatin mit den antimikrobiellen Granula (rot-orange). Letztendlich löst sich die Zellmembran auf und es kommt zur Freisetzung eines klebrigen Netzes aus DNA und antimikrobiellen Komponenten (türkis), welche Bakterien und Fremdkörper binden kann. Man spricht deshalb auch vom „beneficial suicide“ der Zelle. CC-BY Grafik modifiziert nach (Kühnle et al., 2019).

Bei der NETosis handelt es sich um einen kontrollierten Zelltod und konsekutiv der Freisetzung intrazellulärer Bestandteile (Abbildung 6) wie Chromatin/DNA und antimikrobieller Proteine, wie zum Beispiel Cathepsin G, neutrophile Elastase (NE), Myeloperoxidase (MPO) und Histone (Kolaczowska et al., 2015; Kolaczowska & Kubes, 2013), sodass ein Netz entsteht, das die Bakterien einfangen und bekämpfen kann. Im Gegensatz zur Apoptose, bei der es im Kern zu einer Chromatinkondensation und DNA-Segmentierung kommt, sowie der Nekrose, bei der die Plasmamembran vor der Kernmembran zerstört wird (Fuchs et al., 2007), handelt es sich bei der NETosis um einen mehrstufigen Zelltod, bei dem zuerst bestimmte Enzyme aus den Granula in den Zellkern wandern, dort die Chromatinkette und Histone durch neutrophilen Elastase abbauen, bevor sich Kernmembran und Granulamembran auflösen und der Zelltod folgt (Papayannopoulos, Metzler, Hakkim, & Zychlinsky, 2010; Y. Wang et al., 2009). Zusätzlich erfolgt über diese Kaskade die Induktion einer erhöhten ROS-Produktion

(Metzler et al., 2011) sowie die Ausschüttung anti-apoptotischer Proteine (Hakkim et al., 2011). Im Zusammenhang mit der NETosis und ihrer weitreichenden Funktionen spricht man deshalb auch vom „beneficial suicide“, bei dem die Zelle ihre eigene Integrität zum Schutz des Organismus aufgibt (Brinkmann & Zychlinsky, 2007).

NET werden vermehrt mit Thrombosen in Verbindung gebracht, bei der neben der Virchow Trias, bestehend aus Stase, Hyperkoagulabilität und Endothelschädigung, auch eine immunologische Entstehungskomponente diskutiert wird, die auf dem Zusammenspiel aus NET, vWF und Fibrin beruht (Fuchs, Brill, & Wagner, 2012), welche in mehreren Tierversuchsreihen nachgewiesen werden konnte (Brill et al., 2012; Fuchs et al., 2010; von Bruhl et al., 2012).

Dabei dient das NET-Netz als Anlagerungsstelle für die verschiedenen Komponenten der Koagulation. Es scheint vor allem, dass das Zusammenspiel aus Plättchen und NET eine Rolle für die Bildung des Thrombus spielt. So konnte gezeigt werden, dass ein Komplex aus aktivierten Plättchen und NET eine höhere adhäsive Wirkung, höhere Phagozytose- und ROS-Kapazitäten hat als die Einzelkomponenten alleine (Peters et al., 1999). Neutrophile Granulozyten können außerdem Tissue Factor (TF), Synonym mit Faktor III oder Thromboplastin, freisetzen, welcher normalerweise von geschädigtem Endothel freigesetzt wird und so die extrinsische Koagulation antreibt (Butenas, Orfeo, & Mann, 2008; Wildhagen et al., 2015). Dieser TF wird, an NET gebunden, freigesetzt (Kambas, Mitroulis, & Ritis, 2012) und kann so die Plättchen aktivieren, die wiederum einen positiven Einfluss auf weitere NET-Freisetzung haben (Fuchs et al., 2012) und so einen bestehenden Thrombus vergrößern können. Über den TF ist NET also an der Induktion der extrinsischen Koagulation beteiligt, zusätzlich konnte ein Zusammenspiel mit Faktor XII gezeigt werden, worüber auch die intrinsische Koagulation gefördert wird. Ein Zusammenspiel, das für die Entstehung der tiefen Venenthrombose (TVT) verantwortlich gemacht wird (von Bruhl et al., 2012). Für die gemeinsame Endstrecke der Koagulationswege bietet NET zusätzlich die Möglichkeit der Anlagerung von Fibrin und damit die Bildung des Blutgerinnsels (Fuchs et al., 2010; Massberg et al., 2010; von Bruhl et al., 2012).

Außerdem hat es einen Einfluss auf das Endothel, da es durch die NET-Bildung zum Zelltod der Endothel-Zellen kommt (Clark et al., 2007; Gould et al., 2014), für die insbesondere Histone verantwortlich gemacht wurden (Saffarzadeh et al., 2012). Gleichzeitig liegt in ihrer positiven Ladung ein möglicher Angriffspunkt für stark negativ geladene Teilchen, wie zum Beispiel Heparin oder Albumin (Lam et al., 2013; Wildhagen et al., 2014). In zahlreichen Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass PolySia-Ketten mit einer Länge von mehr als 20 Sialinsäureresten ebenfalls vielversprechende Moleküle sind, um die cytotoxischen Eigenschaften von Histonen zu inaktivieren (C. E.

Galuska, J. A. Dambon, et al., 2017; S. P. Galuska et al., 2017; C. Ulm et al., 2013; Zlatina, Lutteke, & Galuska, 2017; Zlatina et al., 2018). Wie in Abbildung 7 gezeigt umwickeln diese linearen Homopolymere ähnlich wie DNA die Histonkomplexe.

Neben den pathologischen kommt es auch in physiologische Situationen, wie etwa nach Insemination im weiblichen Geschlechtstrakt zur NET-Formation, die die eindringenden Spermien in einem Netz aus DNA und Histonen festhält (Alghamdi & Foster, 2005). Neben den im Sperma vorkommenden DNasen können sich die Spermien wohl außerdem davor schützen, indem Exosomen vermittelt (Unterpunkt 1.4), Glykoproteine, unter anderem auch PolySia, während ihrer Maturation in diese eingebaut werden. Dieser Prozess wurde in einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe als mögliches Zeichen für die zytoprotektiven und immunmodulatorischen Fähigkeiten der PolySia im Reproduktionsprozess von Säugetieren angesehen (Simon et al., 2013).

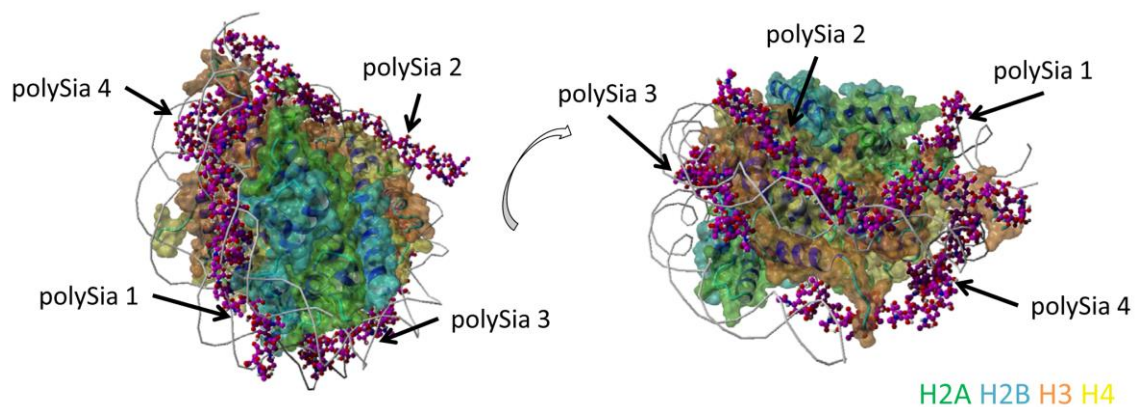


Abbildung 7: Modell der PolySia-Interaktion mit Histonen. Dieses Modell setzt sich aus dem Histon-Oktamer-DNA Komplex, der als Rezeptor dient, und 4 PolySia-Ketten mit jeweils einen Polymerisierungsgrad von 20 zusammen. Die PolySia-Ketten sind nummeriert und durch Pfeile gekennzeichnet. Die beiden Darstellungen zeigen zwei unterschiedliche Perspektiven auf das Modell, wobei der Doppelpfeil die Rotationsrichtung angibt. Farbschema: H2A in grün, H2B in blau, H3 in orange und H4 in gelb, PolySia-Kette in lila, DNA-Stränge in grau. CC-BY Grafik modifiziert nach (Zlatina et al., 2017).

2 Ziel der Arbeit

In mehreren Publikationen unserer Arbeitsgruppe bzw. in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen konnte ein Zusammenhang zwischen NET-induzierter Zellschädigung und deren Einschränkung durch PolySia gezeigt werden (C. E. Galuska, J. A. Dambon, et al., 2017; S. P. Galuska et al., 2017; Saffarzadeh et al., 2012; Simons & Raposo, 2009; C. Ulm et al., 2013; Zlatina et al., 2017; Zlatina et al., 2018). Zusätzlich konnten in der Arbeit von Saffarzadeh Histone als Hauptverantwortliche für die Zellschädigung benannt werden (Saffarzadeh et al., 2012). Daneben geben weitere Studien am männlichen Reproduktionstrakt erste Hinweise darauf, dass PolySia über extrazelluläre Vesikel als lösliche Komponente im Ejakulat präsent sind, um möglicherweise die toxischen Eigenschaften von Histonen aus NET zu reduzieren.

Ziel dieser Arbeit war es, die bis jetzt nur lokal gezeigten Vorgänge im Körper, auf das Gesamtsystem Mensch zu transformieren und damit gegebenenfalls eine Verbindung zwischen diesen Prozessen zu schaffen. Dafür wurde das Blutsystem als Hauptkommunikationsmedium in immunologischen Prozessen gewählt und untersucht. Auf der Grundlage mögliche polysialylierte Strukturen im Blut zu detektieren und sie in den Kontext der bisherigen Ergebnisse zu stellen, ergaben sich folgende Ziele und Aufgaben:

- Immunologischer PolySia-Nachweis im Serum und Plasma
- Bestimmung des Polymerisationsgrades der PolySia-Ketten im Serum und Plasma
- Aufzeigen möglicher Assoziationsverhältnisse der PolySia zu extrazellulären Vesikeln
- Mögliche Auswirkungen auf Zelltoxizität der Histone durch isolierte extrazelluläre Vesikel untersuchen

3 Material und Methoden

3.1 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien

3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Film	GE Healthcare (Chalfont, GB)
Filterpapier "Whatman-Paper"	Schleicher & Schuell (Dassel, D)
Kodan Tinktur forte 250 ml	Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt, D)
Molekulargewichtsmarker	
PageRuler™ Plus Prestained Ladder	
[kDa] 250, 130, 95,72,55,36,28	NEB (Massachusetts, USA)
Petrischalen	Greiner (Kremsmünster, A)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, D)
Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt & Co (Nürnberg, D)
PVDF-Membran	GE Healthcare (Chalfont, GB)
Reaktionsgefäße (1,5 mL, 0,5 ml)	Eppendorf (Hamburg, D)

3.1.2 Chemikalien

Die angegebenen Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in p.a.-Qualität bzw. als Lösungsmittel für die HPLC bezogen (Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Fluka, Neu-Ulm; Serva, Heidelberg; Sigma, Taufkirchen; alle D). Die Aufbereitung zu analytisch reinem Wasser erfolgte über die Elix UV5-Anlage (Vorreinigung) und durch „Milli-Q Ultra-pure water System“ (Millipore, Eschborn) (Entsalzung). Fortan wird dieses aufgereinigte Wasser als Aqua dest. bezeichnet.

3.1.3 Nährmedien und Zellkultursätze

Nährmedien, Seren, Zusätze und Reagenzien, die für die Zellkultur benötigt wurden, sind über die Firma PAA (Marburg, Deutschland) in höchster Qualitätsstufe bezogen worden.

3.2 Probenmaterial

3.2.1 Humanes Serum und Plasma

Forschungsgegenstand war bovines Serum und humanes Blut bzw. dessen Bestandteile Serum und Plasma. Die ersten Ergebnisse im Western Blot wurden dabei mit Fötalem Bovinen Serum (FBS) von Biochrom gewonnen. Weitere Versuche wurden mit humanem Donor-Plasma und -Serum durchgeführt. Es handelte sich dabei um *Pooled Normal Human Plasma Anticoagulant K3 EDTA* und das *Pooled Normal Human Serum* (Dunn Labortechnik, Asbach, Deutschland).

3.2.2 Extrazelluläre Vesikel

Die Gewinnung von extrazellulären Vesikeln erfolgte je nach Methode teilweise zweischrittig. Dabei war der erste Schritt eine Isolation der extrazellulären Vesikel aus dem Plasma, der zweite eine Affinitätspräzipitation des Isolats. In der vorliegenden Dissertation konnten mit Hilfe von zwei verschiedenen Kits für die Isolation von Exosomen, Material aus dem Plasma isoliert werden. Da man aber nicht ausschließen kann, dass andere extrazelluläre Vesikel, wie z.B. Mikrovesikel mit isoliert werden, wird im Folgenden nur die allgemeine Bezeichnung extrazelluläre Vesikel benutzt. In ihrer Anwendung gab es dabei geringe Unterschiede, die im Folgenden dargestellt werden.

3.2.2.1 Methode 1 der Gewinnung von extrazellulären Vesikeln

Material:

ExoQuick™ Exosome Precipitation Solution

Die Exo-Quick™ Exosome Precipitation Solution (System Biosciences (SBI), Mountain View, USA) stellte das einfachere Isolationssystem dar. Die Plasmaproben wurden hier zu Beginn mit $3000 \times g$ 15 min zentrifugiert, um alle unlöslichen Komponenten zu entfernen. Danach sammelte man den Überstand in einem sterilen Reaktionsgefäß, gab pro 250 µl Probe, 63 µl Exo-Quick µl hinzu und inkubierte die Proben für 30 min im Kühlschrank. Das ExoQuick™-Polymer bindet dabei an extrazelluläre Vesikel und fällt diese durch Verdrängung des Wassers aus, sodass nach der Inkubationszeit eine deutliche, weiße Trübung der Flüssigkeit zu sehen war. Zur Trennung der isolierten extrazellulären Vesikel von der Flüssigkeit war ein weiterer Zentrifugationsschritt mit

1.500 × g für 30 min notwendig, an dessen Ende ein beiges Pellet im Reaktionsgefäß zurückblieb.

Abschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1/10 des Ausgangsvolumens in PBS resuspendiert. Mit dieser Methode gewonnene extrazellulären Vesikel ließen waren Ausgangsmaterial für die Western Blot-Analysen.

3.2.2.2 Methode 2 der Gewinnung von extrazellulären Vesikeln

Material:

Total Exosome Isolation (from Plasma)

Exosome – Human CD 63 Isolation/Detection (from cell culture media)

0,1 % BSA in PBS

Elutionslösung (100 mM Triethylamin, 150 mM NaCl)

Diese Methode beruht auf der zweistufigen Trennung der extrazellulären Vesikel: Zuerst eine Isolation aus dem Plasma und dann eine Immunpräzipitation mit Hilfe magnetischer Beads.

Den ersten Schritt leistete das Total Exosome isolation (from Plasma) Kit (Invitrogen™ by Life Technologies, Oslo Norwegen), indem es als Reagens Wassermoleküle an sich band und so die wenig löslichen Exosomen ausfielen.

Dafür wurde die Probe erst mit 2.000 × g für 20 min, danach mit 10.000 × g für 20 min zentrifugiert, um alle unlöslichen Komponenten zu entfernen. Im Anschluss mischte man das Plasma mit PBS (Plasmavolumen + 0,5 × Plasmavolumen PBS) und gab dann 0,2 Volumeneinheiten des Exosomen-Reagens dazu (Plasmavolumen + PBS = Volumeneinheiten). Nach Zugabe des Reagens wurde die Lösung trüb, wolkig und konnte für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nach der Inkubation wurden die Exosomen mit 10.000 × g für 30 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Pro 100 µl Ausgangsplasmavolumen wurde dann mit 25–50 µl PBS resuspendiert. Die absolute Flüssigkeitsmenge richtete sich dabei nach dem Lösungsverhalten der Pellets, überschritt aber niemals die angegebenen 50 µl/ 100 µl Obergrenze.

Der in dieser Methode angewandte zweite Schritt diente hauptsächlich der besseren weiteren Aufreinigung und höheren Spezifizierung der Exosomen, denn die resuspendierten Proben wurden dann mit Hilfe der Exosome – Human CD 63 Isolation / Detec-

tion (from cell culture media) (invitrogen™ by life technologies, Oslo Norwegen) (von hier an Dynabeads oder Beads) einer Immunpräzipitation (IP) unterzogen. Die Dynabeads waren dabei superparamagnetische polysterene Beads, die mit einem primären, monoklonalen Antikörper gegen CD63 beladen waren. Dieser Antikörper erkannte das CD63 Membranantigen, das auf den meisten humanen Exosomen exprimiert wird (Conde-Vancells et al., 2008).

Vor dem eigentlichen Isolationsbeginn musste eine 0,1 % BSA in PBS Lösung (von hier an Isolation-Puffer) hergestellt werden. Dieser Isolation-Puffer wurde an mehreren Stellen im Versuchsverlauf verwendet.

Zuerst wurden die vorkonzentrierten extrazellulären Vesikel so verdünnt, dass pro 100 µl Gesamtvolumen maximal 50 µl extrazelluläre Vesikel vorlagen (50 µl extrazelluläre Vesikel + 50 µl Isolation-Puffer). Danach wurden die Beads resuspendiert, anschließend in Reaktionsgefäße pipettiert und am Magneten mit 500 µl Isolation-Puffer zweimal gewaschen. Im Anschluss konnten Beads und Exosomenlösung vermischt werden und für 18 – 22 h auf dem Rüttler bei 4°C inkubiert werden. Es folgten zwei Waschschrte mit Isolation-Puffer, bevor die Lösung der CD63 positiven Exosomen von den Beads mit Hilfe des Eluierpuffers erfolgte (15 µl Elutionslösung pro 100 µl Exosomenausgangslösung). Der Elutionslösung wurden vor der 15-minütigen Inkubationszeit bei 4°C noch Proteinaseinhibitoren zugesetzt. Nach dem Inkubieren konnten dann Elutionslösung und Beads getrennt werden und der Elutionsüberstand entweder direkt für weitere Untersuchung verwendet oder mit Hilfe eines Vakuum-Konzentrators (SpeedVac™) konserviert werden.

3.3 Biologische Materialien

3.3.1 Primäre und Sekundäre Antikörper

Tabelle 1

	Eigenschaften	Verdünnung Western Blot	Referenz/ Firma*
α -PolySia ¹ (735)	mAk (Maus IgG2A); α 2,8-verknüpfte PolySia-Ketten ab 8 Sialinsäureresten erkannt	1mg/ml	Arbeitsgruppe Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn (MHH Hannover)
Anti-Histone H1, clone AE-4 ¹	mAk (Maus IgG2a), erkennt hauptsächlich Histon H1 aufgrund der Hyperphosphorylierung der H1-Subpopulationen, kreuzreagiert mit anderen Iso-formen in folgender Signalstärke: H3, H2B > H4 > H2A	1mg/ml / x	Millipore
pAk Ziege α -Maus Ig ²	HRP-Konjugat	-	DAKO

* EMD Millipore Corporation (Billerica, USA), Dako (Glostrup, Dänemark), ¹ Primärantikörper,

² Sekundärantikörper

3.3.2 Enzyme

Endoneuraminidase N: „Die Endoneuraminidase N stammt aus einem *E. coli* K1 Phagen. Sie bindet an α 2,8-verknüpften Sialinsäuren, ab einem Polymerisationsgrad von mindestens acht Resten und spaltet ein Oktamer in drei (nicht reduzierendes Ende) und fünf (reduzierendes Ende) Reste (Stummeyer, Dickmanns, Mühlenhoff, Gerardy-Schahn, & Ficner, 2005)“ (Christina Ulm, 2012). Bereitgestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn (MHH Hannover).

Inactive

Endoneuraminidase N: Zwei, im aktiven Zentrum, induzierte Punktmutationen führen dazu, dass das Enzym PolySia-Ketten noch binden, jedoch nicht mehr schneiden kann, sodass es sich als Immunfluoreszenzmarker bzw. als Träger für die Affinitätspräzipitation eignet (Schwarzer et al., 2009). Bereitgestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn (MHH Hannover).

3.3.3 Zelllinie

A549 Zellen – humane Lungen-Adenokarzinomzelllinie (Giard et al., 1973)

3.4 Enzymverdau

Die eingesetzte Endoneuraminidase N (EndoN) wurde für den Enzymverdau in der aktiven, funktionsfähigen Form verwendet. Sie ist als Sialidase spezifisch für die α 2,8-verknüpften N-Acetylneuraminsäure von Polysialinsäure und konnte diese so bis auf Restfragmente von bis zu sieben Untereinheiten enzymatisch abbauen. Der verwendete Antikörper mAk 735 (Unterpunkt 3.3.1) war nicht mehr in der Lage, an dieses Restfragment zu binden, da er ein Restgerüst von mindestens acht Untereinheiten zur Anbindung benötigt. Die EndoN wurde in einem Verhältnis von 1:100 mit NaCl freien Lysepuffer (1 M Tris/HCl pH 7,5 250 mM EDTA, 10 % Triton-X-100, 5 % Na-Desoxycholat) verdünnt, die Probe dann mit der verdünnten EndoN versetzt und bei 37°C auf dem Rüttler inkubiert.

3.5 Proteinanalytische Methoden

3.5.1 Affinitätsaufreinigung

3.5.1.1 Vorbereitung der Beads

Nicht vor jedem Western Blot wurde eine Affinitätspräzipitation (von hier an AP) durchgeführt. Jedoch ist meist eine AP gemacht worden, um Ergebnisse in ihrer Qualität zu verbessern, d.h. wenn zum Beispiel eine Probenart ohne AP ein Signal im Western Blot ergab, wurde häufig eine AP dieser Probe durchgeführt, um die Qualität und Spezifität im Western Blot zu steigern und abermals zu verifizieren.

Die AP ist dabei eine biochemische Methode, die eine geringe Abwandlung zur Immunpräzipitation (von hier an IP) darstellt (Unterpunkt 3.2.2.2). Während bei der IP mit Hilfe von gekoppelten Antikörpern ein Antigen zielgerichtet aus einem Gemisch von Antigenen gefiltert werden kann, benutzt man bei der AP anstelle von gekoppelten Antikörpern Marker, Rezeptoren oder wie in diesem konkreten Fall ein inaktiviertes Enzym. Es ist also keine Immunkopplung, sondern eine Annäherung durch Affinität zwischen Substrat und Enzym, die die gezielte Isolation des gesuchten Agens möglich macht.

Für die AP wurden zwei Komponenten verwendet: magnetische Dynabeads® (von hier an teilweise Beads) und inaktivierte Endoneuraminidase (EndoN) (Unterpunkt 3.3.2).

Die EndoN ist an den Punkten Arg596 Ala/Arg 647Ala durch zwei induzierte Punktmutationen im aktiven Zentrum so verändert, dass sie zwar PolySia-Ketten noch binden, nicht aber schneiden kann (Schwarzer et al., 2009).

Die verwendeten Beads sind Dynabeads® M-280 Tosylactivated (Invitrogen by life technologies AS, Oslo) [Konzentration 30mg beads/ml]. Die Tosylaktivierung erlaubt dabei die kovalente Bindung von Liganden, die eine Amino- oder Sulfhydrylgruppe besitzen. Darüber hinaus sind die Beads magnetisch, sodass sie leicht, nachdem sie den Liganden gebunden haben, mit einem Magneten isoliert werden können.

Die Beads wurden wie folgt beladen: Zuerst wurden sie in ihrem Originalgefäß resuspendiert. Danach wurden 165 µl (entspricht ca. 5mg Beads/ml) der Suspension abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Dieses Reaktionsgefäß wurde an einem Magneten fixiert und somit die Beads von der flüssigen Phase getrennt. Anschließend wurden die Beads mit 500 µl Na-Phosphat-Puffer (0.1 M, pH 7,4) gewaschen.

Allgemein gilt für die Waschvorgänge: Resuspendierte Beads wurden an den Magneten gebracht und so während einer kurzen Wartezeit von der Flüssigkeit getrennt. Dann wurde der Überstand abgenommen, das Reaktionsgefäß vom Magneten gelöst und durch erneute Zugabe von Flüssigkeit wurden die Beads resuspendiert.

Anschließend wurden 10 µl (entspricht ca. 100 µg) EndoN mit 140 µl Na-Phosphat-Puffer (0.1 M, pH 7,4) gemischt und zu den gewaschenen Beads pipettiert. Danach wurden 100 µl Kopplungspuffer zugegeben (3 M Ammoniumsulfat in 0,1 M Na-Phosphat-Puffer pH 7,4) und resuspendiert und für 12–18 h bei 37°C auf dem Rüttler inkubiert. Diese Zeit war nötig, um die tosylaktivierten Dynabeads® ausreichend mit den Aminogruppen der inaktivierten EndoN reagieren zu lassen. Dabei bildete sich unter Abspaltung des Tosylrestes ein sekundäres Amin, das kovalent an den Bead gekoppelt war.

Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand mit Hilfe des Magneten abgenommen und mit 500 µl PBS-BSA 0,5 % (pH 7,4) eine weitere Stunde bei 37°C auf dem Rüttler inkubiert (1000 rpm). Danach zweimaliges Waschen mit je 500 µl PBS-BSA 0,1 % (pH 7,4) und finales Lösen der Beads in 240 µl PBS-BSA 0,1 % (pH 7,4).

3.5.1.2 Ligandenisolation

Waschpuffer 1 20 mM Tris/HCl, pH 8,0

150 mM NaCl

0,5 % (v/v) Triton-X-100

Waschpuffer 2 20 mM Tris/HCl, pH 8,0

150 mM NaCl

Elutionspuffer 100 mM Triethylamin

150 mM NaCl

Die resuspendierten Beads wurden mit dem Magneten von ihrer flüssigen Phase getrennt und anschließend je zweimal mit Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2 gewaschen. Die so gereinigten Beads wurden dann mit 400 µl Probe gemischt und für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubiert. Mit Hilfe des Magneten nahm man den Überstand ab und wusch die Beads abermals je zweimal mit Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2. Im Anschluss wurden die Beads in 50 µl Eluierpuffer resuspendiert und 2 min auf Eis inkubiert. Der basische Charakter des Eluierpuffers löste die Bindung zwischen EndoN und Substrat, sodass das Substrat in die flüssige Phase und damit in den Eluierpuffer übertrat. Dieser Eluierpuffer wurde nach Magnettrennung der Beads in ein separates Reaktionsgefäß überführt und das Eluat mit Hilfe der Speedvac™ (Jouan RC 10.22, Thermo Fischer) trocken gezogen. Die Beads wurden abermals gewaschen und konnten, in Waschpuffer 2 gelöst, gelagert werden.

3.5.2 SDS-Gelelektrophorese

Das Prinzip der Gelelektrophorese ist im Endeffekt das eines Siebes, in dem große Teilchen in einem elektrischen Feld langsamer wandern als kleinere. Um allen Molekülen in unserem Versuch die gleiche, negative Ladung zu geben, wurde das negative Detergens SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat) verwendet und so alle Testsubstrate zu Anio-

nen gemacht. Die Gele, die zur Auftrennung in der Elektrophorese benutzt wurden, waren Polyacrylamidgele, sodass das ganze Verfahren auch SDS-Page (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, diskontinuierlich nach Laemli) genannt werden kann. Das Acrylamidgitter ermöglichte dabei kleinen Molekülen ein schnelleres Durchwandern des Gels, sodass diese von den größeren, langsameren Molekülen getrennt wurden. Die in den Versuchen verwendeten Gele zeichneten sich durch zwei Phasen aus, 3 % Polyacrylamidgel (Sammelgel) und ein 7 % Polyacrylamidgel (Trenngel) wurden verwendet. Die unterschiedlichen Polyacrylamidgehalte führten zu verschiedenen Durchlaufeigenschaften, sodass im 3 %-Gel die Substrate gleich schnell zur Grenze und dem eigentlichen Startpunkt am 7 %-Gel laufen konnten und somit die Wandereigenschaften im Gel vergleichbar wurden.

Acrylamidlösung:	30 % Acrylamid (gebrauchsfertig von Roth, D)
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
SDS-Lösung:	10 % SDS
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
APS-Lösung:	Ammoniumperoxodisulfat 10 % in Aqua dest.
TEMED:	N, N, N, N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Laufpuffer:	50 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (v/v) SDS-Lösung

Das verwendete Gelelektrophoresegerät von Bio-Rad (München, Deutschland) hieß „Mini-Protean Elektrophorese-System“. Bevor die Elektrophorese begann, wurden die Acrylamidgele im Labor gegossen. Dafür wurden für das Trenngel mit 7 % Acrylamidanteil folgende Bestandteile gemischt (Angaben für zwei Gele, für vier Gele die entsprechend doppelte Menge): 2,3 ml Acrylamidlösung, 2,5 ml Trenngelpuffer, 7 ml Aqua dest., 120 µl SDS-Lösung. Danach wurden 120 µl APS und 12 µl TEMED hinzugegeben, unter Schwenken gemischt und sofort zwischen zwei eingespannte Glasplatten gefüllt. Über die Gelschicht wurde eine Schicht aus Aqua dest. gelegt und ca. 15 min bis zum Aushärten des Trenngels gewartet. Danach wurde das Sammelgel angesetzt: 650 µL Acrylamidlösung, 1,25 mL Sammelgelpuffer, 3 mL Aqua dest., 50 µL

SDS-Lösung, 50 μ L APS-Lösung und 5 μ L TEMED. Nachdem die Wasserschicht über dem Trenngel entfernt war, brachte man das Sammelgel zwischen die Platten ein, platzierte Trennkämme und wartete abermals auf die Polymerisation.

3.5.3 Western Blot

Transferpuffer: 39 mM Glycin

 48 mM Tris

 20 % (v/v) Methanol

Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung war die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine proteinbindende PVDF-Membran (Roti®-PVDF, Porengröße 0,45 μ m, Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe) der nächste Schritt. PVDF steht dabei für Polyvinylidenfluorid, ein teilkristalliner, thermoplastischer Fluorkunststoff. Die PVDF-Membranen haben eine hohe Proteinbindekapazität, eine hohe Reißfestigkeit und ein gutes Signal/Hintergrund-Verhältnis bei der Auswertung mit Chemilumineszenz-Detektionskits. Genau wie bei der SDS-Gelelektrophorese lief auch beim Western Blot der Strom senkrecht durch die Membran. Durch die Schichtung im Western Blot wurde so eine exakte Kopie des Gels auf die Membran gezogen, da Gel und Membran in 90 Grad zum elektrischen Strom lagen. Die aufgetrennten Proteine wurden somit durch Spannung vom Gel auf die PVDF-Membran übertragen.

Diesen elektrophoretischen Transfer kann man sowohl mit einem Wet- oder Tank Blot und dem Semi-Dry Blot leisten. Im Rahmen dieser Dissertation wurde lediglich der Semi-Dry Blot mit PVDF-Membranen verwendet.

Um den Western Blot zu starten, musste man alle Bestandteile zuerst mit Transferpuffer equilibrieren. Dazu wurde die PVDF-Membran für ca. 10 s in Methanol getaucht, um ihre hydrophoben Eigenschaften zu reduzieren. Danach überführte man die „pre-wet“ PVDF-Membran in Transferpuffer. Außerdem wurden die *Whatman*-Filterpapiere und das SDS-Gel ebenfalls für mindestens 5 min im Transferpuffer belassen, bevor man sie zum Western Blot Sandwich stapelte. Dieses Sandwich bildete die Verbindung zwischen Anode und Kathode der Blottingapparatur und lag in folgender Schichtung zwischen beiden: *Whatman*-Filterpapier, PVDF-Membran, SDS-Gel, *Whatman*-Filterpapier. Dabei war darauf zu achten, dass alle Komponenten etwa die gleiche Größe hatten und luftblasenfrei aufeinander lagen.

Der eigentliche Blotting-Apparat (Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bestand aus zwei Kohlenstoffelektroden, die über das „Blotting Sandwich“ Kontakt bekamen, und einem elektrischen Netzteil (Electrophoresis Power Supply EPS 600, Pharmacia Biotech AG, Dübendorf CH). Über das Netzteil wurde die Stromstärke von 1 mA/cm² und die Dauer von 60 min eingestellt und so die elektrische Übertragung der Proteine gestartet.

3.5.4 Immunfärbung und Entwicklung der Western Blots

PBS-T Puffer

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

1,4 mM KH₂PO₄

4,3 mM Na₂PO₄ x 2 H₂O

0,25 % Tween-20 (Polyoxyethylen(20) - sorbitan-monolaurat)

Lösungen im Chemilumineszenz-Kit:

Lösung 1: Luminol/ Verstärker-Lösung

Lösung 2: stabiler Peroxid-Puffer

Der Vorgang von der Entnahme aus der Blot Apparatur über Wasch- und Inkubations-schritte hin zur Entwicklung der Filme war ein variabler Prozess, dem in der folgenden Darstellung Rechnung getragen werden soll. Das Gerüst der Einzelschritte war dabei gleich, jedoch variierten die Inkubationszeiten teilweise stark, was durch die Angabe von Zeiträumen dargestellt wird.

Nach der Entnahme aus der Blot-Apparatur wurde die Membran in Roti-Block (Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe) überführt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Roti-Block fungierte hier als Blockpuffer. Die Membran blieb für 2–14 h bei 4°C im Roti-Block. Im Anschluss folgte ein 3-maliger Waschvorgang (3 x 5 min), der wie alle anderen folgenden Waschschrte auch auf einem Schaukelbrett und damit unter leichter Bewegung erfolgte. Nach dem Waschen wurde der Primärantikörper (Unterpunkt

3.3.1) im Blockpuffer verdünnt und auf die Membran aufgegeben. Die Inkubationszeit lag zwischen 2 h bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4°C. Allgemein wurde im Anschluss an die Inkubation wiederum dreimal mit Roti-Block gewaschen (3 x 5 min). Der sekundäre HRP gekoppelte Antikörper (Unterpunkt 3.3.1) musste dann für 1–2 h bei Raumtemperatur auf der Membran inkubiert werden, bevor abermals dreimal mit Roti-Block für je 5 min und danach mit PBS-T zweimal für je 5 min gewaschen wurde. Auch der sekundäre Antikörper wurde in Roti-Block gelöst.

Die Chemilumineszenz-Lösung „Super-Signal® West Dura Extended Duration Substrate“ (Thermo Scientific, Rockford, USA) mischte man im Verhältnis 1:1 (Lösung 1: Lösung 2) frisch an, gab sie auf die Membran, die man davor in eine Polypropylen-Folie (Carl-Roth GmbH + Co, Karlsruhe) gelegt hatte und inkubierte diese für 10 min unter Lichtschutz. Nach Abschluss wurde die überschüssige Chemilumineszenz mit Hilfe einer Pipette abgenommen und die Membran möglichst blasenfrei zwischen den Folienhälften verstaut.

Alle folgenden Schritte erfolgten im Fotolabor unter Rotlichtlampe und Lichtreduktion. Auf die Membranen wurde Detektionspapier „Amersham Hyperfilm™ ECL“ (GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK) gelegt und die Röntgenkassette verschlossen. Die Filme wurden dann zwischen 10 s und 1 h belichtet sowie anschließend foto-technisch entwickelt und fixiert.

3.5.5 Dot Blot

Genau wie der Western Blot unterlag auch der Dot Blot einem gewissen Maß an zeitlicher Varianz, die auch hier mit Zeitspannen angegeben wird.

Der Dot Blot wurde in dieser Dissertation verwendet, weil er Einfachheit mit einer sehr hohen Sensitivität paart und nur sehr wenig Probenmaterial benötigt.

Das angewendete Verfahren unterscheidet sich in seinen Wasch- und Inkubationsschritten nur gering von denen des Western Blots. Der Hauptunterschied liegt im Auftragen der Probe auf die PVDF-Membran. Während im Western Blot die Elektrophorese, Proteinauftrennung und anschließende elektrophoretische Übertragung zu einer beladenen Membran führen, ist der Weg beim Dot Blot erheblich direkter.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Dot Blots mit Affinitäts-Präzipitation aufgereinigten Serum- und Plasmaproben angefertigt. Das heißt, es wurden dem Dot Blot Aufreinigungsschritte vorangestellt, die für die AP (Unterpunkt 3.5.1) vorgestellt sind.

Sobald das Ausgangsmaterial bereitgestellt war, wurde eine PVDF-Membran zurechtgeschnitten. Je nach Anzahl der Proben wurde dann mit einer Pipettenspitze Markierungen auf die Membran gedrückt, um ein wiederholtes Probenaufbringen auf der glei-

chen Stelle möglich zu machen. Anschließend wurde die Membran in einer Petrischale auf eine Heizplatte gestellt, die konstant eine Temperatur von 37°C hatte. Die Heizplatte sollte ein schnelleres Antrocknen der Proben auf der Membran und damit eine geringere räumliche Ausbreitung der einzelnen Spots ermöglichen. Pro Spot wurden etwa 15–30 µl Gesamtprobe aufgetragen, wobei pro Durchlauf meist nur 2–10 µl Material pipettiert wurde und erst nachdem die Membran augenscheinlich getrocknet war, ein erneuter Durchlauf startete.

Nach der Beladung legte man die Membran in Roti-Block und verwahrte sie über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Membran geteilt und mit den einzelnen Antikörpern (Unterpunkt 3.3.1) für 1–2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem Auftragen der sekundären Antikörper (Unterpunkt 3.3.1) musste dreimal à 5 min mit Roti-Block auf dem Rüttler gewaschen werden. Auch der sekundäre Antikörper hatte eine Inkubationszeit von 1–2 h bei Raumtemperatur, an die sich abermals Waschgänge mit dreimal je 5 min Roti-Block und zweimal je 5 min PBS-T anschlossen. Die gewaschenen Membranen wurden dann zwischen Polypropylenfolien gelegt und mit Chemilumineszenz-Lösung bedeckt. Die Chemilumineszenz musste für 10 min unter Lichtschutz auf der Membran verbleiben, bevor sie im Fotolabor abpipettiert wurde und die Membran luftblasenfrei zwischen den Folienhälften für die Filmentwicklung bereit war.

Da die Schritte ab dem Auftragen des primär-AKs bis zum Entwickeln der Filme denen des Western Blots sowohl in der Verwendung der Materialien, als auch im Vorgehen glichen, wird für eine ausführliche Darstellung auf Unterpunkt 3.5.4 verwiesen.

3.6 HPLC

<u>DMB-Puffer</u>	18 mM Na-Hydrosulfit
	1 M Mercaptoethanol
	40 mM TFA
<u>DMB-Reagenz</u>	1,22 mg DMB in 1 ml DMB-Puffer

In der vorliegenden Arbeit diente die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, von hier an HPLC) zum Nachweis von PolySia und ihrer Kettenlänge bzw. dem Polymerisationsgrad. Die HPLC-Anwendung lieferte außerdem den Beweis für die Richtigkeit der Ergebnisse des Western Blots mit einer

völlig unabhängigen Methode. Hier soll erwähnt werden, dass mit dieser Technik nicht die exakte Kettenlänge bestimmt werden kann, da durch die Fluoreszenzmarkierung im sauren Milieu intramolekulare Kettenbrüche auftreten und somit Degradationsprodukte entstehen.

Die HPLC erlaubt den chromatographischen Aufschluss von α -Ketocarbonsäuren, die zuvor mit 1,2-Diamino-4,5-Methylenedioxybenzol (DMB) markiert wurden. Die HPLC funktioniert dabei nachfolgendem Prinzip: Die HPLC-Säule nach Anionenaustauschprinzip eine Trennung der Sialinsäurepolymere nach ihrer Länge und somit nach der Anzahl an sauren Gruppen (pro Sialinsäure, eine Carboxylgruppe). Die Trennung wird mittels Fluoreszenzdetektor verfolgt.

Zur Vorbereitung der HPLC wurden die Proben mittels AP (Unterpunkt 3.5.1) aufgereinigt und in der Speedvac™ trockengezogen. Um die Proben zu resuspendieren, wurde DMB-Puffer zu gleichen Teilen mit 25 mM Tris/HCl gemischt und die Probe darin aufgenommen. Der saure pH-Wert im DMB-Puffer erreichte eine Abspaltung der PolySia-Kette. In unserem Fall bestand die PolySia-Kette aus α -2,8-verknüpften Neu5Ac. Diese sind als Einzelbausteine α -Ketosäuren und bilden eine lange Kette, die aufgrund der hohen Zahl an Carboxyl-Gruppen stark negativ geladen ist. Im sauren pH-Milieu lagerte sich das DMB an das reduzierende Ende der N-Acetylneuraminsäurekette an und markierte sie somit fluoreszenzsch. Die DMB-Anlagerung durch Kondensationsreaktion dauerte eine Nacht (11°C/ Rüttler), bevor die Reaktion durch Zugabe von 1 M NaOH gestoppt wurde. Dieser Schritt war nötig, um die Laktone zu spalten, die sich im sauren Milieu innerhalb der Neuraminsäurekette gebildet hatten. Diese Spaltung gelang, indem die Lösung eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (8°C, 14.400 x g, 10 min) wurde. Mit dem Überstand konnte die eigentliche HPLC durchgeführt werden.

Die Auftragung auf die HPLC-Säule fand in einem Auto-Sampler (Spark Holland, Emmen, Niederlande) statt. Die HPLC kann über zwei Elutionsmittel, E1 (MilliQ, H₂O) und E2 (2 M Ammonium-Acetat Puffer, C₂H₇NO₂), die nacheinander als mobile Phase über die stationäre Phase liefern, einen Konzentrationsgradienten erzeugen. Die stationäre Phase war die DNA-Pak Pa 100 (Dionex) Säule, die als Anionenbinder fungierte. Die Reaktion fand bei Raumtemperatur und einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min statt. Zuerst wurde mit Wasser vorgespült und dann die Probe in das System gegeben. Die stark negativ geladenen Neuraminsäureketten banden durch ionische Wechselwirkungen an die Anionenaustauschersäule. Die Stärke dieser Wechselwirkung hing dabei von der Anzahl der negativen Ladungen ab. Je stärker negativ geladen, desto stärker waren die Wechselwirkung. Daraus ergaben sich die Auftrennung der Kettenlänge und deren Bestimmung, denn anschließend wurde die Anionenaustauschersäule mit E2 in

aufsteigender Konzentration gewaschen. Der Gradient war: 0 min = 0 % E2; 5 min = 0 % E2; 15 min = 8 % E2; 20 min = 11 % E2; 35 min = 14 % E2; 55 min = 16 % E2; 100 min = 20 % E2; 130 min = 23 % E2 und 131 min = 100 % E2.

Das Salz verdrängte die gebundenen Neuraminsäureketten zunehmend aus der Wechselwirkung mit der Anionenaustauschersäule, sodass diese weiterwanderten und über den Fluoreszenzdetektor erfasst wurden. Dabei wurden die Ketten mit wenig negativer Ladung (mutmaßlich kurzkettige Neuraminsäuren) zuerst verdrängt und damit am ehesten detektiert. Langkettige PolySia dagegen wurde erst bei hohen LM-B-Konzentrationen ausgewaschen und damit erst spät im Reaktionsverlauf detektiert. Aus dieser Zeit/Konzentrationsabhängigkeit konnte dann eine graphische Kettenlängenbestimmung generiert werden.

Als Standard wurde 10 µg/ml Colominsäure-Lsg. 1:400 mit dem DMB-Tris/HCl Gemisch (v/v) verdünnt.

3.7 Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten nach Prinzipien der „aseptischen“ Arbeitsweise bzw. in Steriltechnik. Die eingesetzten Verbrauchsmaterialien waren entweder bei 500°C im Glühofen sterilisiert oder autoklaviert. Die Lösungen wurden werksseitig durch Gammastrahlung oder durch Millipore® Membranfilter (0,2 µm Porengröße) sterilfiltriert. Eine Klasse 2-Sicherheitswerkbank der Firma Nunc (Langenselbold, Deutschland) diente als Arbeitsplatz für die Zellkulturversuche.

3.7.1 Kultivierung der A549 Lungenepithelzellen

Die als adhärenente Monolayerkultur wachsenden A549 Zellen entsprechen einer Adenokarzinom Zelllinie aus humanem Lungengewebe. Als Zellkulturmedium diente „Earles Minimum Essential Medium“ mit L-Glutamin, angereichert mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin. Dabei ist das Wachstum und die Zellvitalität von Brutschrankbedingungen mit 37°C und 5 % CO₂ abhängig (Brutschrank: Binder, Tuttlingen, Deutschland).

3.7.1.1 Passagieren von Zellen

Wie oben erwähnt, wachsen die A549 Zellen als adhärenenter Monolayer und müssen deshalb zur weiteren Kultivierung von der Zellkulturschale gelöst werden. Dafür wurde ein Gemisch aus Trypsin und EDTA verwendet (0,5 mg/ml Trypsin, 0,22 mg/ml EDTA

in PBS), in dem das Trypsin als Pankreasprotease die Zell-Matrix-Verbindungen und das EDTA als Ca^{2+} -Chelatbildner die Zell-Zell-Kontakte lösen konnte.

Konfluente Zellkulturschalen wurden zuerst mit angewärmten Dulbeccos PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lsg./ 75cm^2 benetzt, bevor sie für 3–5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurden.

Die Zellablösung wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 7 ml Vollmedium gestoppt. Die entstandene Zellsuspension wurde abgezogen und bei 1000 RZB für 3–5 min zentrifugiert, sodass ein Zellpellet entstand, dessen Überstand verworfen wurde und in 1 ml Vollmedium resuspendiert werden konnte. Das Zellsuspensat wurde dann mit 9 ml Medium auf 10 ml aufgefüllt und je nach Zelldichte 0,5–1,5 ml Zellsuspension in eine T-Flasche pipettiert, in die zuvor 25 ml Vollmedium vorgelegt wurden.

Für Versuchsansätze in Mehrfachkulturschalen wurde zusätzlich die Zellzahl bestimmt (Unterpunkt 3.7.2), um standardisierte Bedingung zu gewährleisten.

3.7.1.2 Einfrieren der Zellen

Die Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C bzw. in dessen Gasphase bei -150°C bis -160°C , erlaubt eine beinahe unbegrenzte Lagerung der Zellen, da ab einer Temperatur von -130°C keine biochemischen Prozesse mehr ablaufen, die die Zellalterung und damit den Zelltod vorantreiben können.

Allerdings bedarf das Einfrieren eines Frostschutzmittels, um Zellschäden zu vermeiden. Das Dimethylsulfoxid (DMSO) verhindert dabei die intra- und extrazelluläre Kristallbildung, indem es sich an das zelluläre Wasser bindet und dieses verdrängt. Das Einfrieren erfolgt dabei in Suspension mit Hilfe zweier Einfriermedien. Die einzufrierenden Zellen sollten dabei am besten im Stadium der perfekten Anpassung an das Nährmedium mit maximaler Teilungsrate (log-Phase) und kurz vor Konfluenz stehen.

Lösung 1: 80 % serumfreies Medium
 20 % DMSO

Lösung 2: 60 % serumfreies Medium
 40 % FCS

Die Lösungen wurden frisch unter Sterilbedingungen angesetzt und im Eisbad gekühlt, die Zellen wie in den oben beschriebenen Schritten (Unterpunkt 3.7.1.1) von der Schale gelöst, zentrifugiert und der Überstand verworfen, bevor das Pellet, in FCS-reicher Lösung 2, resuspendiert und in das Einfrierröhrchen vorgelegt wurde. Anschließend

erfolgte die Zugabe von 500 µl DMSO-haltiger Lösung 1. Nach Durchmischung wurde das Einfrierröhrchen auf Eis platziert. Stufenweise vorbereitende Lagerung bei -20°C für 2–4 h, sowie bei -80°C über Nacht, gingen der letztendlichen Überführung in den Stickstofftank voraus.

3.7.1.3 Auftauen von Zellen

Das Auftauen sollte zum Schutz der Zellen vor Schädigung möglichst zügig erfolgen. Dazu wurden die Einfrierröhrchen aus dem Stickstoffbehälter entnommen und im 37°C warmem Wasserbad erwärmt, die aufgetaute Zellsuspension mit 9 ml vorgewärmten Medium gemischt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. So konnte das Frostschutzmittel DMSO entfernt werden, bevor die Zellen in frischem Medium resuspendiert wurden und in 75 cm²-Kulturschalen ausgesät werden konnten.

3.7.2 Zellzählung mittels Neubauer-Kammer und Trypanblaufärbung

Um die Standardisierung der einzelnen Zellkulturversuche zu gewährleisten, war die Zählung der Zellen notwendig. Dafür wurde eine Neubauer-Kammer vorbereitet, indem ein Deckglas mit leichtem Druck auf die Stege der Kammer geschoben wurde, sodass sogenannte Newtonsche Ringe an den Auflageflächen sichtbar wurden. So entstanden 3 x 3 Großquadrate mit einer Kantenlänge von jeweils 1 mm und konsekutiv einer Grundfläche von 1 mm².

Danach wurden die Zellen, wie in Unterpunkt 3.7.1.1 beschrieben, bis zur Resuspension aufbereitet und anschließend, je nach Konfluationsdichte, mit Trypanblau im Verhältnis 1:2–1:4 vermischt. Der saure Farbstoff Trypanblau erlaubt die Bestimmung der Zellvitalität, da er über seine saure Eigenschaft leicht an Zellproteine binden kann. Diese liegen allerdings nur frei, wenn die Zelle abgestorben ist, während eine vitale Zelle kein Trypanblau aufnimmt und somit nicht angefärbt wird.

Die mit Trypanblau versetzte Zellsuspension wurde in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Zellkammer pipettiert und die vitalen Zellen der vier Eckquadrate mikroskopisch ausgezählt. Aus diesen wurde dann der Mittelwert gebildet und mit folgenden Formeln die Gesamtzahl bestimmt:

$$\frac{\sum \text{Zellzahl der 4 Eckquadrate} \times \text{Verdünnung}}{4} = \text{Mittelwert Zellzahl/Quadrat}$$

$$\text{Mittelwert der } \frac{\text{Zellzahl}}{\text{Quadrat}} \times 10^4 = \text{Zellen pro ml}$$

$$\text{Zellen pro ml} \times \text{Volumen der Zellsuspension} = \text{Gesamtzahl}$$

Um eine Vitalitätsbestimmung zu erreichen, wurden sowohl vitale, als auch abgestorbene Zellen nach der oben gezeigten Methode ausgezählt und mit folgender Formel in ein prozentuales Verhältnis zueinander gesetzt:

$$\frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen}} \times 100 = \text{lebende Zellen in \%}$$

Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen in 24- oder 96-well-Platten ausgesät. Dabei wurden in eine 24-well-Platte 100.000 Zellen/well und in einer 96-well-Platte 30.000 Zellen/well ausplattiert.

3.7.3 Inkubation der Zellen mit Histonen und Exosomen

Die Zellkultursubstanzen werden grundsätzlich in dem zur Zelllinie gehörigem serumfreien Medium (Hungermedium) angesetzt. Außerdem wurden die Zellen vor der Inkubation für zwei Stunden „gehungert“, d.h. ihr Vollmedium wurde durch serumfreies Hungermedium ersetzt. Daneben bleibt pro Inkubationsdurchlauf eine Probe unbehandelt und dient als Negativkontrolle.

Für die Stimulationsversuche wurden die Zellen mit Histonen (Histone from calf thymus, Type II-A; Sigma), vorher isolierten Exosomen bzw. mit der Kombination aus Exosomen und Histonen, gemeinsam inkubiert. Dabei wurden die Histone mit einer Konzentration von 75 µg/ml angesetzt. Die Menge an Exosomen wurde nicht quantifiziert, aber immer aus 3 ml Plasma isoliert.

Anschließend wurde die Zytotoxizität der einzelnen Kombinationen bestimmt und miteinander verglichen.

3.7.4 Zytotoxizitätsmessung

Die Zytotoxizität wurde mit Hilfe des „LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay Kit II“ (Biovision INC., Milpitas, USA) gemessen. Dazu wird das ubiquitär, in allen eukaryotischen Zellen, vorkommende Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) bestimmt, welches sich erst nach Absterben der Zelle und dem damit einhergehenden Verlust der Membranintegrität im Assay nachweisen lässt. Dabei nutzt der eingesetzte Assay *water soluble tetrazolium* (WST) als Farbstoff, welches über eine enzymatische Koppelreaktion, bei der Laktat durch LDH oxydiert wird und NADH entsteht, welches anschließend mit dem WST weiterreagiert und zu einem messbaren Farbumschlag führt. Die Farbintensität hängt dabei direkt von der Menge an lysierten Zellen ab und lässt damit im Plate Reader (ΔOD 450 nm), eine Quantifizierung der untergegangenen Zellen zu.

Der Inhalt des LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay Kit II:

- *WST Substrate Mix*
- *LDH Assay Buffer*
- *Cell Lysis Solution*
- *Stop Solution*
- *LDH*

Diese wurden wie folgt zu sogenannten Arbeitslösungen gemischt. Der *WST Substrate Mix* wurde mit ddH₂O gemischt und ergab so eine Lösung, die bei 4°C für mehrere Monate stabil war. Das *LDH* wurde im *LDH Assay Buffer* gelöst und ergab so die Lösung für die LDH-Positivkontrolle. Der *LDH Reaction Mix* setzt sich aus *WST Substrate Mix* und *LDH Assay Buffer* zusammen, der bei 4°C mehrwöchig haltbar war.

Um die Zellversuche vergleichbar zu machen, wurden Maximal-, Minimal- und Backgroundcontrols angelegt. Für die Backgroundcontrol wurde in die wells nur das Hungermedium ohne zugehörige Zellen gebracht, sodass darüber der „LDH-Background“ des Mediums bestimmen werden konnte. Die Maximalkontrolle zeichnete sich durch die Zugabe von Cell Lysis Solution zur Zellsuspension aus, die so die maximale LDH Freisetzung zeigen sollten, während in der Minimalkontrolle lediglich die Zellsuspension ohne Zusatz anderer Stoffe und somit die niedrigste LDH Freisetzung der Zellen kontrolliert werden konnte.

Die in den wells ausgesäten Zellen wurden vor den Versuchen im Hungermedium inkubiert und einmalig mit PBS gewaschen, bevor sie mit den Stimulationslösungen beimpft und die 24-well-Platten über Nacht (16–18 h) unter Brutschrankbedingungen inkubiert wurden. Anschließend konnten die well-Platten mit 600 x g für 10 min zentrifugiert und die Überstände in eine 96-well-Platte überführt werden. In diese wells wurde dann zusätzlich *LDH Reaction Mix* gegeben und für 10–30 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation folgte die Auslese im Elisa-Reader bei $\lambda=450$ nm. Dabei sollte die Extinktion der Maximalkontrolle in etwa bei 2 liegen, während die Extinktion der Minimalkontrolle einen Wert von etwa 0,6–0,8 annehmen sollte. Mit folgender Formel konnte die Zytotoxizität in Prozent berechnet werden.

$$\text{Zytotoxizität in \%} = \frac{\text{erhobener Mittelwert} - \text{Minimalkontrolle}}{\text{Maximalkontrolle} - \text{Minimalkontrolle}} \times 100$$

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism 7 Software und der Varianzanalyse (ANOVA „analysis of variance“) gepaart mit einem Tukey Post-test für multiple Vergleiche. Unterschiede wurden ab einem Wert von $p < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet. Signifikante Unterschiede sind: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4 Ergebnisse

4.1 Polysialylierung fetalen Kälberserums (FBS)

Mehrere Studien konnten einen PolySia-Nachweis auf Blutzellen wie Makrophagen, natürlichen Killerzellen, hämatopoetischen Vorläuferzellen (Curreli et al., 2007; Drake et al., 2008) sowie humanem Blut zeigen (Gluer, Schelp, et al., 1998; Gluer, Wunder, Schelp, Radtke, & Gerardy-Schahn, 1998). Die erste Zielsetzung dieser Arbeit war nun der Nachweis von PolySia im zellfreien Kälberserum. Hierzu wurde zu Beginn fetales Kälberserum (FBS) untersucht. Eine unbehandelte FBS-Probe wurde aufgeteilt in eine Negativkontrolle, die mit dem PolySia-spezifischen Enzym EndoN verdaut wurde und einer weiterhin unbehandelten Probe. Diese wurden dann gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse untersucht (Abbildung 8).



Abbildung 8: Western Blot-Analyse polysialylierter Proteine in FBS. Spur 1 zeigt die unbehandelten FBS-Proben, Spur 2 zeigt die Serumproben nach EndoN-enzymatischem Verdau. Es handelt sich hier um eine Immunfärbung mit einem monoklonalen anti-PolySia-Antikörper (mAk) (Unterpunkt 3.3.1). Die molekularen Größen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Pro Spur wurden 5 µl FBS aufgetragen.

In der Spur 1 wurde dabei die typische PolySia-Schmier im Bereich zwischen 80–250 kDa sichtbar. Da dieser Schatten in Spur 2 nicht zu sehen ist und es sich hier um die Negativkontrollen nach EndoN-Verdau handelt, ist davon auszugehen, dass es sich hier um ein PolySia-spezifisches Signal handelt. Somit wurde PolySia in FBS als nach-

gewiesen betrachtet und weitere Untersuchungen an humanem Serum und Plasma angestellt.

4.2 PolySia in humanem Serum und Plasma

Basierend auf dem Vorversuch wurde humanes Plasma und Serum genutzt. Auch diese wurden jeweils aufgeteilt, sodass eine Negativkontrolle mit EndoN-Verdau durchgeführt werden konnte, bevor die gel-elektrophoretische Auftrennung erfolgte. Mit dieser wurde abermals eine Western Blot-Analyse durchgeführt, welche in Abbildung 9 für das Plasma in Spuren 1 sowie für das Serum in Spur 3 einen PolySia-„Schmier“ im typischen Größenbereich von 100 bis 250 kDa zeigte und sich durch das Fehlen der Schatten, in Spur 2 und 4 nach EndoN-Verdau, verifizieren ließ. Dies wurde als PolySia-Nachweis in humanem Plasma und Serum gewertet.

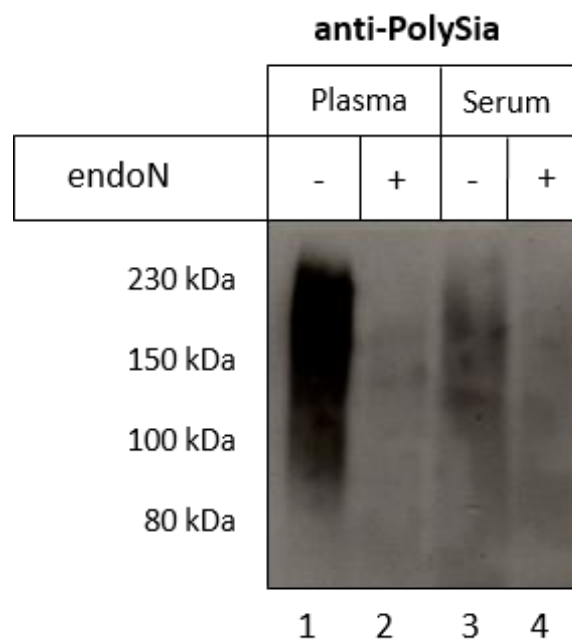


Abbildung 9: Western Blot-Analyse polysialylierter Proteine in humanem Plasma und Serum. Die Spuren 1 und 3 zeigen die unbehandelten Plasma-/Serum-Proben, die Spuren 2 und 4 zeigen die Proben nach EndoN-enzymatischem Verdau. Es handelt sich hier um eine Immunfärbung mit einem monoklonalen anti-PolySia-Antikörper (mAk) (Unterpunkt 3.3.1). Die molekularen Größen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Pro Spur wurden 5 µl Plasma/Serum aufgetragen.

Die Überprüfung des PolySia-Nachweises in der direkten Plasmaprobe erfolgte nochmals in einem veränderten Versuchsansatz. Dabei wurde humanes Plasma mit Hilfe der Affinitätspräzipitation (Unterpunkt 3.5.1) aufgereinigt. Durch den Einsatz von Beads

beladen mit inaktivierter EndoN entstand ein Überstand, der nach Lösung von den Beads nur noch PolySia-haltiges Material beinhalten sollte. Ein positives Ergebnis in der Western Blot-Analyse wäre dann durch zwei Stufen - die Affinitätspräzipitation und den PolySia spezifischen mAk - verifiziert. Auch bei den so isolierten Proteinen konnte man ein PolySia-spezifisches Signal nachweisen (Abbildung 10) und somit das Vorhandensein von PolySia in humanem Blutplasma bestätigen.

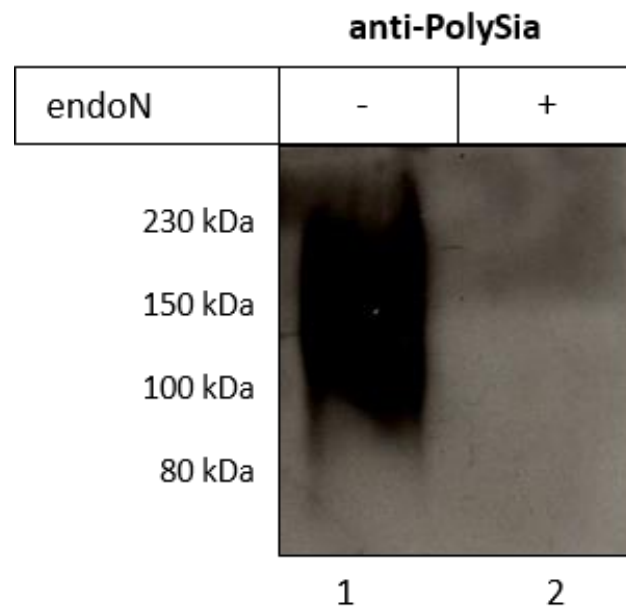


Abbildung 10: Western Blot-Analyse polysialylierter Proteine in humanem Plasma nach Affinitätspräzipitation. Spur 1 zeigt die AP behandelte Plasmaprobe, Spur 2 zeigt die AP Plasmaprobe, nach EndoN-enzymatischem Verdau. Es handelt sich hier um eine Immunfärbung mit einem monoklonalen anti-PolySia-Antikörper (mAk) (Unterpunkt 3.3.1). Die molekularen Größen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Pro Spur wurden 10 µl Plasma aufgetragen.

4.3 PolySia-Nachweis auf extrazellulären Vesikeln

Um unsere Hypothese zu überprüfen, dass extrazellulären Vesikel und PolySia assoziiert sein könnten und im wechselseitigen Einfluss zueinanderstehen, wurden in den nächsten Versuchen extrazellulären Vesikeln aus Blut-Plasma extrahiert. Dafür sind im Unterpunkt 3.2.2 zwei Methoden zur Exosomen-Isolation dargestellt. Beide Verfahren wurden mit dem gleichen Ergebnis zur Exosomen-Isolation vor Western Blot-Analyse eingesetzt.

Im Western Blot in Abbildung 11 kann nach Exosomenisolation mit Hilfe der Exo-Quick™ Exosome Precipitation Solution in Spur 1 das typische PolySia-Signal im Be-

reich von 100–250 kDa nachgewiesen werden, welches in Spur 2, der EndoN behandelten Probe, fehlt.

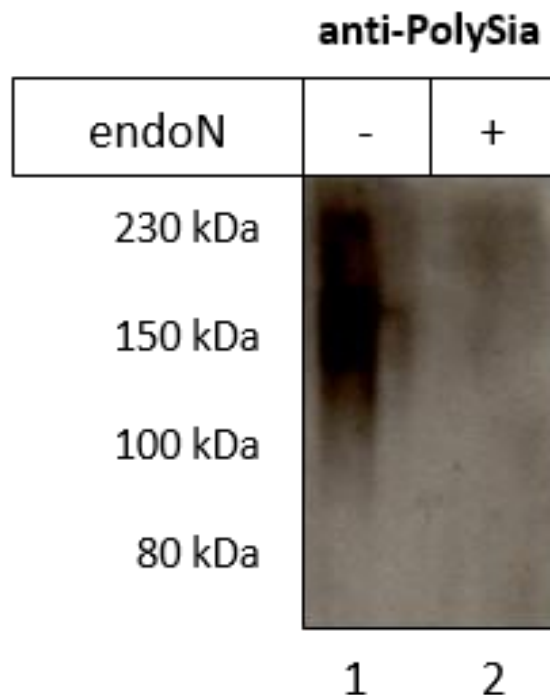


Abbildung 11: Western Blot-Analyse zur Detektion von PolySia auf Exosomen Spur 1 zeigt die Plasma-Proben nach einfacher Exosomen-Isolation (3.2.2.1), Spur 2 zeigt die Probe nach EndoN-enzymatischem Verdau. Es handelt sich hier um eine Immunfärbung mit einem monoklonalen anti-PolySia-Antikörper (mAk) (Unterpunkt 3.3.1). Die molekularen Größen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Pro Spur wurden 5 µl Exosomenisolat aufgetragen.

Um das Ergebnis zu spezifizieren, wurde eine weitere Analyse mit Hilfe von Beads aufgereinigter Exosomen durchgeführt (Unterpunkt 3.2.2.2). Dabei wurde mit Hilfe der Exosome – Human CD 63 Isolation / Detection (from cell culture media) (invitrogen™ by life technologies, Oslo Norwegen) eine Immunpräzipitation (IP) durchgeführt. Die superparamagnetische polysterene Beads, die mit einem primären, monoklonalen Antikörper gegen CD63 beladen waren, erkannten das CD63 Membrantigen, das auf den meisten humanen Exosomen exprimiert wird (Conde-Vancells et al., 2008), sodass eine zusätzliche Spezifizierung der vorkonzentrierten Plasmaexosomen erfolgte und mögliche Verunreinigungen eliminiert wurden. Diese können jedoch auch auf anderen extrazellulären Vesikeln vorkommen, sodass man nicht automatisch von einer reinen Exosomenfraktion ausgehen kann.

Mit den so behandelten extrazellulären Vesikel konnte ebenfalls in den Spuren 1 und 3 ein PolySia-spezifischer „Schmier“ detektiert werden, der sich in der Negativkontrolle

nicht darstellen lässt (Abbildung 12). Die Ergebnisse aus den Western Blot-Analysen lassen den Schluss zu, dass extrazellulären Vesikel und PolySia im Blut assoziiert sein können.

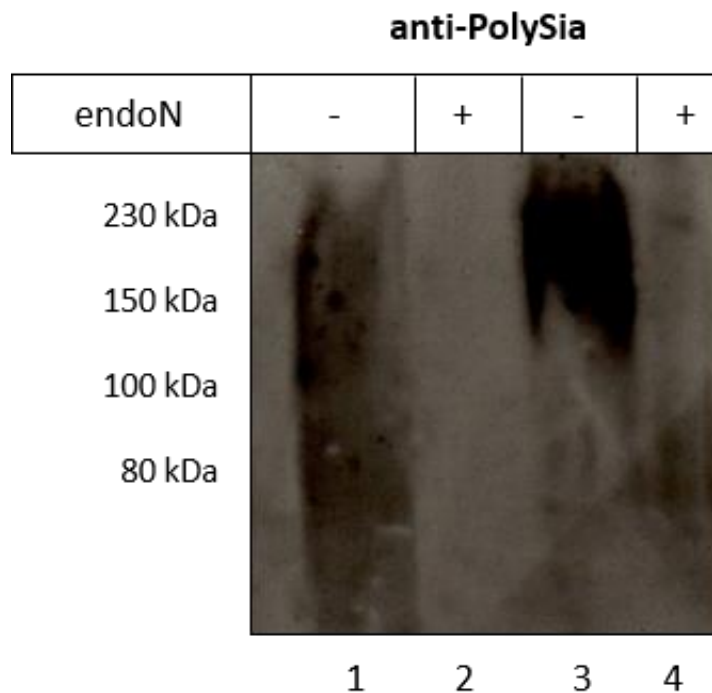


Abbildung 12: Western Blot-Analyse zur Detektion von PolySia auf Exosomen nach AP. Die Spuren 1 und 3 zeigen die Plasma-Proben nach IP-Exosomen-Isolation (3.2.2.2), Spur 2 und 4 zeigen die Proben nach EndoN-enzymatischem Verdau. Es handelt sich hier um eine Immunfärbung mit einem monoklonalen anti-PolySia-Antikörper (mAk) (Unterpunkt 3.3.1). Die molekularen Größen sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Pro Spur wurden 5 µl Exosomenisolat aufgetragen.

4.4 Kettenlängenbestimmung PolySia

Nach dem erfolgreichen Nachweis von Sialinsäuren im Blut und ihrem Zusammenhang mit Histonen und extrazellulären Vesikeln sollte die Kettenlänge der Polysialinsäurekette bestimmt werden. Dafür wurde die High performance liquid chromatography (HPLC) verwendet (Unterpunkt 3.6). Nach Abspaltung der PolySia-Kette vom Trägermolekül im schwach sauren Milieu wird mit Hilfe von fluoreszierendem DMB das reduzierende Ende markiert. Man spricht aufgrund dieses Vorgehens auch von einer milden DMB-Derivatisierung (Inoue & Inoue, 2001; Inoue, Lin, Lee, & Inoue, 2001). Durch das gleichmäßige Fluoreszenzsignal kann dann eine Aussage über die Kettenlänge gemacht werden, denn jeder Peak steht für die Verlängerung der PolySia-Kette um einen Sialinsäurerest und damit um eine weitere Carboxylgruppe. Dabei steigt die Bindungsfähigkeit von PolySia an die Säule, je länger die Kette ist und konsekutiv wird mehr

Laufmittel (Ammoniumacetat) benötigt, um sie von der Anionenaustauschersäule zu eluieren. Ab einer Kettenlänge von mindestens acht Sialinsäuremolekülen spricht man von PolySia. Da der verwendete Primärantikörper in den Western Blots erst ab einer Kettenlänge von über sieben Sialinsäureresten band, sollte die Kettenlänge also mindestens dieser Zahl entsprechen. Für die HPLC wurden das Plasma und Serum zuvor einer Affinitätspräzipitation unterzogen (Unterpunkt 3.5.1).

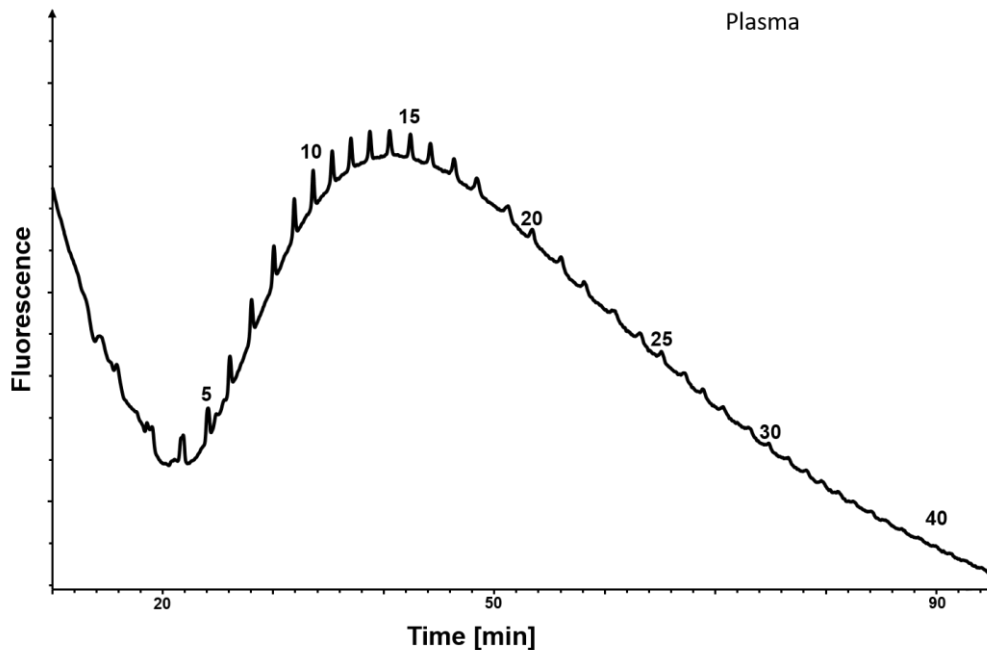


Abbildung 13: HPLC von Blutplasma nach AP. Die gezeigte PolySia-Kette wurde aus einer Plasmaprobe mit Hilfe einer Affinitätspräzipitation über inaktive EndoN extrahiert und einer milden DMB-Derivatisierung unterzogen. Die Anzahl der Sialinsäuremoleküle in der Kette wird an exemplarischen Peaks oberhalb selbiger dargestellt.

Das erste Signal tritt in der Plasma-Probe (Abbildung 13) nach etwa acht Minuten auf und wird etwa ab Minute 24 regelmäßig, mit periodischen Abständen und abnehmender Amplitude. Nach entsprechender Vergrößerung konnte eine Kettenlänge von über 40 Sialinsäureresten im Plasma nachgewiesen werden.

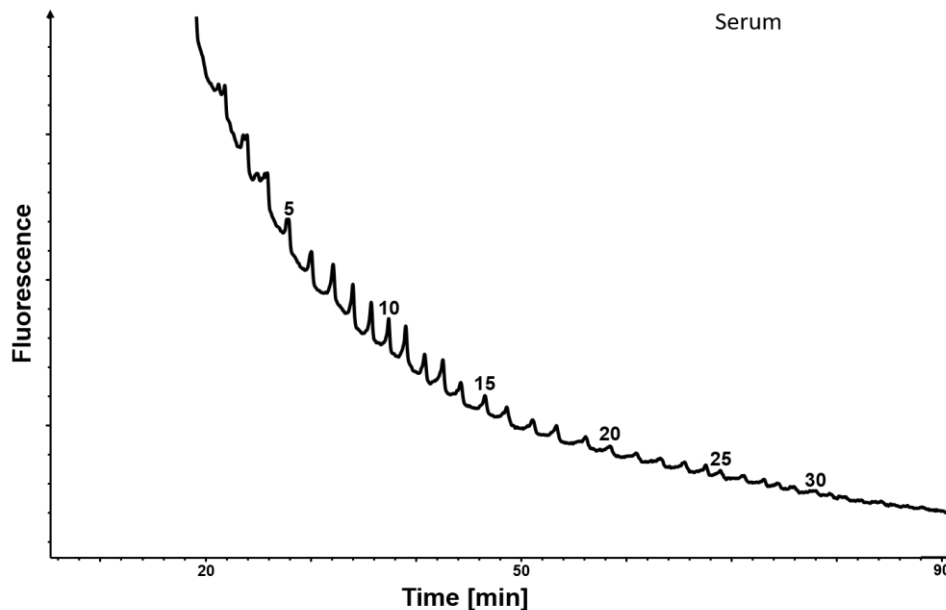


Abbildung 14: HPLC und Serum-Probe. Die gezeigte PolySia-Kette wurde aus einer Serumprobe mit Hilfe einer Affinitätspräzipitation über inaktive EndoN extrahiert und einer milden DMB-Derivatisierung unterzogen. Die Anzahl der Sialinsäuremoleküle in der Kette wird an exemplarischen Peaks oberhalb selbiger dargestellt.

In der Serumprobe (Abbildung 14) ist der Beginn des Signals bei etwa 22 Minuten und wird ab 36 Minuten regelmäßiger. In der Serum-Probe konnte eine Kettenlänge von über 30 Monomeren bestimmt werden, also etwas kürzer im Vergleich zur Plasmaprobe. Somit sind im Blut PolySia-Ketten vorhanden, die eine Interaktion zwischen dem Zuckerpolymer und Histonen ermöglichen.

4.5 Zusammenhang zwischen PolySia und Histonen

Nach der Feststellung, dass die erforderlichen Kettenlängen von PolySia vorhanden sind, um mit Histonen zu interagieren, sollte überprüft werden, ob Histone und PolySia im Blut assoziiert sind. Deshalb wurde ein Dot Blot (Unterpunkt 3.5.5) nach Affinitätspräzipitation gegen PolySia an Serum- und Plasma-Proben (Unterpunkt 3.5.1) durchgeführt.

Sowohl nach AP gegen PolySia in Serum-, als auch in Plasmaproben konnten Signale für PolySia und Histon H1 nachgewiesen werden. Wie in den HPLC-Analysen, zeigt sich bei gleichen Probenmengen ein stärkeres Signal in den Plasma-Proben (Abbildung 15). Eine Proteinmengenbestimmung wurde allerdings nicht durchgeführt, sodass lediglich ein visueller Unterschied auszumachen ist.

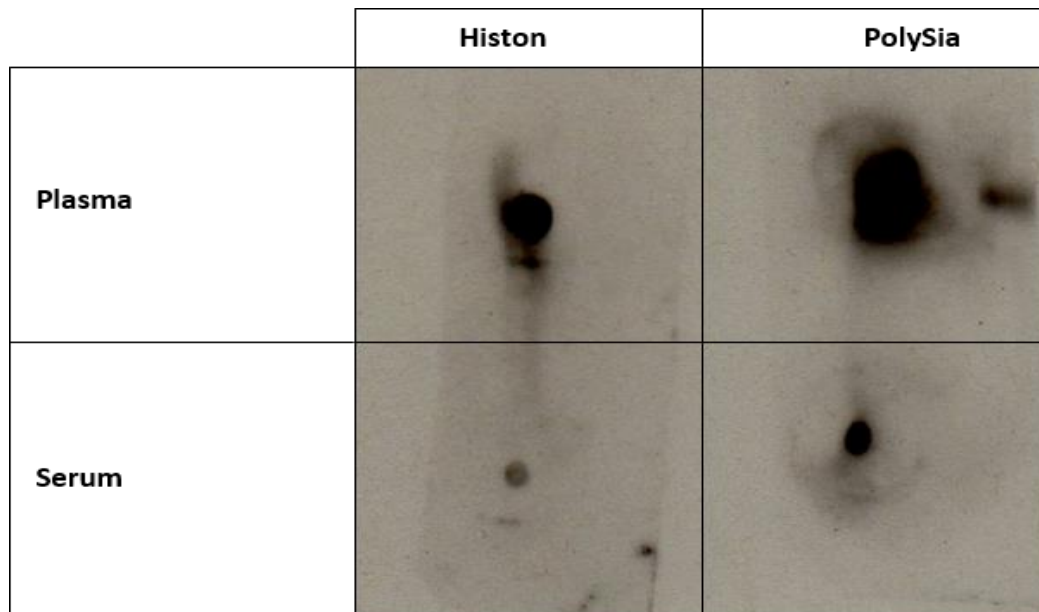


Abbildung 15: Dot Blot-Analyse zum Nachweis von Histonen und PolySia aus Plasma/Serum-Proben nach AP. Die Dots in der ersten Spalte zeigen die Plasma/Serum-Proben nach AP-Isolation (3.5.1) und Färbung gegen Histon H1 mAk (Maus IgG2a), die zweite Spalte zeigt die Immunfärbung mit einem monoklonalen anti-PolySia-Antikörper (mAk) (Unterpunkt 3.3.1). Die Negativkontrolle nach EndoN-enzymatischem Verdau ist nicht abgebildet, diese zeigte kein Signal. Pro Spur wurden 12,5 µl AP-Isolat aufgetragen.

Die Ergebnisse nach AP lassen den Schluss zu, dass PolySia und Histone im Blut in Verbindung stehen und bei der Präzipitation gegen PolySia kopräzipitieren. Eine Aussage über das Ausmaß dieser Verbindung ist dabei aus dem Dot Blot-Ergebnissen nicht möglich.

4.6 Zytotoxizitäts-Assay

In einer weiteren Versuchsreihe sollte getestet werden, ob generell extrazelluläre Vesikel aus Plasma die Eigenschaft besitzen, die zytotoxischen Eigenschaften von Histonen zu reduzieren. In den Zytotoxizitätsversuchen wurden A549 Zellen dem Einfluss von Histonen und extrazellulären Vesikeln ausgesetzt. Anschließend wurde die zytotoxische Wirkung der Einzelkomponenten bzw. deren Zusammenspiel auf die Zellen mit Hilfe des „LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay Kit II“ (Biovision INC., CA, USA), bestimmt. Dabei wurde die Sterberate der Zellen anhand der LDH-Freisetzung berechnet (Unterpunkt 3.7.4).

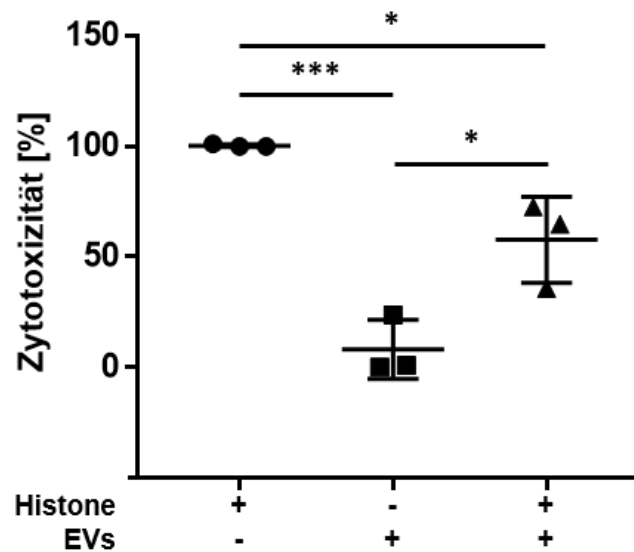


Abbildung 16: Zytotoxizitätstest in Abhängigkeit von Histonen und extrazellulären Vesikeln (EVs). Die Abbildung zeigt die zytotoxische Wirkung von Histonen und deren Abhängigkeit von extrazellulären Vesikeln auf A549 Zellen, welche mittels LDH-Messung (Unterpunkt 3.7.4) bestimmt wurde. Die Zytotoxizität von mit Histon behandelten Zellen wurde dabei mit 100% festgesetzt. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda=450$ nm. Die Anzahl der Symbole entspricht der Versuchszahl, jeweils als Varianz um den Mittelwert dargestellt. ● : Histonwirkung auf die Zellen, ■ : EV-Wirkung auf die Zellen, ▲ : gemeinsame Wirkung von Histonen und EVs auf die Zelle. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism 7 Software und der Varianzanalyse (ANOVA „analysis of variance“), gepaart mit einem Tukey Post-Test für multiple Vergleiche. Unterschiede wurden ab einem Wert von $p < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet. Signifikante Unterschiede sind: * $p < 0,01$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Die Grenzwerte des Versuches stellen die Einzelwirkungen von Histonen bzw. EVs auf die Zellen da (Abbildung 16). Dabei wurde die bereits bekannte zytotoxische Wirkung von Histonen als oberer Grenzwert der Messung mit 100 % gewertet. Im Vergleich dazu konnte für die Einwirkung von EVs keine messbare Zytotoxizität bis hin zu einem positiven Effekt auf die Zellvitalität gemessen werden. Dies wurde als unterer Grenzwert definiert. Beim pfte man EVs und Histone gemeinsam, konnte eine deutlich abgemilderte LDH-Freisetzung gezeigt und somit bewiesen werden, dass aus dem Blut isolierte EVs die Zytotoxizität durch Histone signifikant reduzieren können.

5 Diskussion

5.1 PolySia-Nachweis in Blutplasma und -serum

Durch verschiedene Glykokonjugate, die meist in Säugern sialyliert sind wird ein dichter „Rasen“ um die Zellen gebildet, der als Glykokalix dazu führt, dass sie z.B. vom Immunsystems des Körpers als körpereigen erkannt werden, somit ein Überschießen der Erregerabwehr und eine Autoimmunität verhindern, gleichzeitig aber auch als Eintrittspforte für Bakterien wie zum Beispiel die *Streptokokken der Gruppe B* oder *Neisseria meningitidis* dienen, die sich mit einer ähnliche Glykokalix wie der Organismus ummanteln und damit dem Immunsystem entgehen (Bhide & Colley, 2016; Liao, Zhou, Suryawanshi, Mondal, & Guo, 2016). Dabei können Sialinsäuren nicht nur als Monomere sondern auch als Polymere, der sogenannten PolySia, vorliegen. Bisherige Untersuchungen konnten PolySia auf verschiedenen Blutzellen nachweisen, wie zum Beispiel den dendritischen Zellen, Monozyten/Makrophagen, natürlichen Killerzellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen (Curreli et al., 2007; Drake et al., 2008). Dabei fällt der PolySia häufig eine ähnliche Rolle wie im zentralen Nervensystem zu, in dem es die Anlagerung von Zellen und deren Migration ermöglicht (Bax et al., 2009; Kiermaier et al., 2016). Die Sialinsäure ist dabei meist an das Membranprotein Neuropilin-2 gekoppelt (Curreli et al., 2007). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Makrophagen in ihrer Aktivität direkt durch PolySia-Bindung an Siglec-11 gehemmt werden (Shahraz et al., 2015) und auch das Komplementsystem herabreguliert wird, sodass im Mausmodel weniger zelluläre und vaskuläre Schäden entstanden (Karlstetter et al., 2017). Diese Aufgaben der PolySia im Blut sind allerdings an zelluläre Bestandteile gebunden und nur für diese untersucht.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte ein von Trägerzellen unabhängiger Nachweis von α -2,8-verknüpfter Polysialinsäure erbracht werden, der deren Vorkommen im Serum von Kälbern (Abbildung 8) und im Blutplasma/-serum von Menschen (Abbildung 9 und 10) beweisen konnte. Der Nachweis gelang dabei sowohl in der Western Blot-Analyse als auch mittels HPLC-Analysen (Abbildung 13 und 14). Zusätzlich konnte über das angewendete HPLC-Verfahren die Kettenlänge der Polysialinsäurekette bestimmt werden (Abbildung 13 und 14). Hierbei zeigten sich zwischen dem Blutserum und Blutplasma geringe Unterschiede was die Signalintensität angeht. Die Kettenlänge im Blutserum mit etwas über 30 Polysialinsäurereste war jedoch kürzer ist als im Plasma, wo Ketten mit über 40 Sialinsäuremolekülen detektiert wurden (Kühnle et al., 2019). Dieser Unterschied mag auch eine Erklärung für die visuellen Unterschiede zwi-

schen Serum und Plasma in der Western und Dot Blot-Analyse sein, bedarf jedoch weiterer Überprüfung.

5.2 Extrazelluläre Vesikel und PolySia

Unter extrazellulär Vesikeln versteht man eine Zusammenfassung von drei verschiedenen Vesikelarten die von Zellen gebildet werden können und hauptsächlich durch ihre Größe und Sezernierungsmechanismus unterschieden werden. Darunter fallen die Exosomen (50-150 nm), Mikrovesikel (100-1000 nm) und apoptotische Körper (über 1000 nm) (Abels & Breakefield, 2016; van der Pol, Böing, Harrison, Sturk, & Nieuwland, 2012).

Exosomen und andere extrazelluläre Vesikel werden von fast allen Zellen gebildet, darunter auch hämatopoetische Zellen, B- und T-Lymphozyten, dendritische Zellen und Mastzellen (Yamada et al., 2012). Auf der Oberfläche der Exosomen konnte z.B. eine Vielzahl von komplex aufgebauten Kohlenhydraten nachgewiesen werden, unter anderem High-Mannose-Typ N-Glykane, Polylaktosamin-Einheiten und α 2,6-gebundene Sialinsäuren an komplexen N-Glykanen (Batista et al., 2011). PolySia wurde bisher noch nicht an extrazellulär Vesikeln nachgewiesen.

Nachdem ein Nachweis aus allen Körperflüssigkeiten möglich ist, können extrazelluläre Vesikel auch aus dem Blut isoliert werden (Caby et al., 2005), daneben konnte unsere Arbeitsgruppe aus früheren Arbeiten Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Spermienreifung und Epididymosomen, den Exosomen des Nebenhodens (Marengo, 2008; Simon et al., 2013) zeigen. Auf Basis dieser Erkenntnisse wollten wir der Frage nach einer Assoziation von PolySia und extrazellulär Vesikeln im Blutkreislauf nachgehen.

Aufgrund der Vielzahl an Ursprungszellen, aus denen unterschiedliche extrazelluläre Vesikel entstehen, ist noch kein einheitlicher Marker für deren Klassifikation gefunden. Es konnten allerdings Fusionsproteine, Proteine zur MVB-Differenzierung, Heat Shock-Proteine und Oberflächenantigene definiert werden, die regelmäßig auf der Oberfläche von Exosomen exprimiert werden (Conde-Vancells et al., 2008; Subra et al., 2010). Im Rahmen dieser Dissertation wurden extrazelluläre Vesikel deshalb neben einer physikalischen Isolation mit Hilfe eines Antikörpers gegen das Oberflächenantigen CD 63 isoliert, einer der am häufigsten exprimierten Exosomenmarker. Neuere Forschungsarbeiten in diesem noch jungen Forschungsfeld stellen allerdings die Genauigkeit der Exosomenisolation aus Zellpräparaten/Flüssigkeiten in Frage. So ging man zu Beginn noch davon aus, dass eine effektive Möglichkeit der Exosomenisolation in deren Größenunterschieden lag. Durch Filtration (22 μ m) und Ultrazentrifugation wurde in ersten Forschungsarbeiten eine ausreichende Selektion postuliert (Gardiner et al., 2016;

Théry, Amigorena, Raposo, & Clayton, 2006). In folgenden Studien wurde ein zusätzlicher Selektionsmechanismus eingeführt, indem eine Immunpräzipitation der Ultrazentrifugation nachgestellt wurde. Dabei wurden vor allem die Oberflächenantigene CD9, CD63 und CD81 neben vielen anderen in den Fokus der einzelnen Arbeitsgruppen genommen (Chaput & Théry, 2011; Colombo et al., 2013; Kowal et al., 2016). Das in dieser Forschungsarbeit genutzte CD63 Antigen konnte dabei spezifisch auf der kleinsten Exosomensubpopulation gleichzeitig aber auf anderen, deutlich größeren extrazellulären Vesikeln nachgewiesen werden (Holm, Kaiser, & Schwab, 2018), sodass eine letztlich effektive Trennung zwischen den einzelnen Gruppe kritisch gesehen werden muss. Zusätzlich konnten Forscher zeigen das einzelne extrazelluläre Vesikelpopulationen unterschiedliche, teils konträre Funktionen aufweisen. So konnte unter anderem für Neuroblastomzellen und Prostatakarzinomzellen ein unterschiedliches Wachstums- und Metastasierungsverhalten, je nach extrazelluläre Vesikel Milieu nachgewiesen werden (Keerthikumar et al., 2015; Minciacchi et al., 2017). Basierend auf dieser Erkenntnis sollte vor allem im Rahmen funktioneller Studien darauf geachtet werden ein möglichst hohes Maß an Selektion zwischen den einzelnen extrazelluläre Vesikel zu erreichen, wie dies allerdings zu erreichen ist, ob über zusätzliche selektivere Oberflächenmarker, Proteomic-Ansätze und dem weitreichenden Austausch und Aufbau transparenter Datenbanken ist Gegenstand der aktuellen Forschung und Diskussion (Holm et al., 2018; Van Deun et al., 2017).

Die oben genannten Einschränkungen müssen beachtet werden, wenn man bedenkt, dass durch beide Isolationsverfahren eine klare Assoziation zwischen PolySia und extrazellulären Vesikeln in der Western Blot-Analyse gezeigt werden konnte (Abbildung 11 und 12). Um eine genauere Differenzierung des polysialylierten Typus von extrazellulären Vesikeln zu ermöglichen, sollten gegebenenfalls weitere Isolationsschritte, wie etwa eine zusätzliche Affinitätspräzipitation oder Zentrifugationen, durchgeführt werden. Außerdem sollte eine elektronenmikroskopische Aufnahme in Betracht gezogen werden, um PolySia direkt auf extrazellulären Vesikel zu visualisieren.

Die Assoziation von extrazellulären Vesikeln und PolySia könnte diverse Bedeutungen haben. Dabei sollen exemplarisch in dieser Diskussion die Felder der Tumorausbreitung und der immunologischen Antwort dargestellt werden. So stehen z.B. Exosomen und Mikrovesikel schon länger in der Diskussion darüber, dass sie verschiedene RNAs, Wachstumsproteine und Botenstoffe beinhalten, welche von möglichen Zielzellen aufgenommen werden und deren Aktivität bedeutend verändern können (Guenat et al., 2017; Nolte-'t Hoen et al., 2012; Ratajczak et al., 2006; Valadi et al., 2007). Dieser Prozess wurde als Erweiterung der bis dahin bekannten Zellkommunikationswege verstanden und wird zunehmend auch mit dem Wachstum von Tumoren assoziiert. Denn

die extrazellulären Vesikel sind in der Lage, ein für Tumorwachstum und Metastasierung günstiges Milieu zu schaffen. So können sie die Angiogenese und damit den Sauerstofftransport zu den Zellen erhöhen (Park et al., 2010; Tauro et al., 2013; H. G. Zhang & Grizzle, 2014). Außerdem können sie die Aktivität von T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen herabsetzen (H. G. Zhang & Grizzle, 2011), was ein Erkennen durch das Immunsystem erschwert. Im Unterpunkt 1.4 sind weitere Exosomen-Einflüsse auf das Tumorwachstum aufgelistet. Bedenkt man nun, dass auch PolySia im Zusammenhang mit einer erhöhten Metastasierungsfähigkeit (Läubli & Borsig, 2010) diskutiert wird und bei verschiedenen Tumorarten (Unterpunkt 1.1.3) nachweisbar ist, eröffnet sich ein mögliches Forschungsfeld, welches sowohl Chancen zur Diagnostik, als auch zur Therapie bieten könnte. Dabei könnte die PolySia als möglicher Richtungsweiser für extrazelluläre Vesikel zu Tumoren und vice versa einen interessanten Ansatzpunkt bieten. Erste Studien in diesem Feld konnten zeigen, dass mit Epirubicin beladene Liposome einer solchen Richtungsweisung mit Hilfe von PolySia folgten und sich am Tumor Ort anreichern konnten (T. Zhang et al., 2016) bzw. das mit Doxorubicin beladene hydrophob modifizierte polysialylierte (HPSA) Nanopartikel ebenfalls gerichtet zu Tumoren wandern, dort zielgerichtet das Chemotherapeutikum freisetzen und damit eine niedrigere Zelltoxizität für den Gesamtorganismus ermöglichen (Jung et al., 2017).

Im Bereich der Immunologie konnte die Arbeitsgruppe um Bhatnagar einen Einfluss von Exosomen aus B-, T-Lymphozyten und Makrophagen auf das Immunsystem zeigen, welches durch solche Exosomen nach Kontakt mit einem Antigen die Bildung von antigenpräsentierenden Zellen erhöhte (Bhatnagar & Schorey, 2007; Bhatnagar et al., 2007). Des Weiteren konnte eine erhöhte Produktion von Exosomen an Entzündungsorten (Marengo, 2008; Ramachandra et al., 2010) festgestellt werden. Unter der Prämisse, dass sowohl Exosomen als auch PolySia an Entzündungsorten vermehrt vorkommen und beide regulatorischen Einfluss auf das Immunsystem haben, sollte in dieser Dissertation die Kontrolle erfolgen, ob extrazelluläre Vesikel einen zytoprotektiven Effekt gegen extrazelluläre Histone aufweisen, deren Quelle z.B. sogenannte *neutrophil extracellular traps (NETs)* sein können.

5.3 PolySia im Zusammenhang mit Zytotoxizität von Histonen

NET stellt ein System dar, mit dem ein Organismus schnell, aber relativ ungerichtet, gegen eindringende Mikroorganismen vorgehen kann. Die dafür verantwortlichen neutrophilen Granulozyten sind die häufigsten weißen Blutzellen und bilden damit ein großes Reservoir an zur Abwehr bereiten Zellen. Bei der sogenannten NETosis setzen

sie ihr Chromatin zusammen mit den Histonen und immunaktiven Granula frei, die zur Bindung und Zersetzung von Eindringlingen führen, sodass man allgemein vom „*beneficial suicide*“ der Zelle spricht, der neben seiner grundlegend sichernden Eigenschaft aber auch mit zahlreichen Erkrankungen in Verbindung gebracht wird, darunter Erkrankungen, die direkt im Kontext des Blutsystems stehen, wie Sepsis (Clark et al., 2007) und transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI) (Thomas et al., 2012).

Die NET-Aktivierung oder NETosis wird jedoch nicht nur durch Mikroorganismen ausgelöst, sondern steht auch im Zusammenhang mit inflammatorischen Reizen und aktivierten Komponenten der Hämostase (Zawrotniak & Rapala-Kozik, 2013). Passend dazu konnte ein Einfluss NETs auf die Schwere von Atherosklerose, Myokardinfarkten und Thrombosen bewiesen werden (Borissoff et al., 2013).

Vornehmlich über die Interaktion aus aktivierten Plättchen, von-Willebrand-Faktor und NET, konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass eine „Immunothrombose“ entstehen kann (Brill et al., 2012; Fuchs et al., 2010; Kimball, Obi, Diaz, & Henke, 2016; von Bruhl et al., 2012). Dabei werden sowohl der extrinsische und intrinsische Weg der Koagulation, über die Bindung und Aktivierung der Faktoren III und XII, durch NET angestoßen und die Aktivität der Einzelkomponenten synergistisch verstärkt (Butenas et al., 2008; Peters et al., 1999; von Bruhl et al., 2012; Wildhagen et al., 2015). Damit beflügelt dieses System die Hyperkoagulabilitätskomponente der Virchow-Trias, die eine zusätzliche Steigerung erfährt, da das NET-Netz auch als Grundgerüst für die Anlagerung aller weiterer Gerinnungskomponenten dient. Diese Säule der Virchow-Trias wird damit durch die NET-Formation verstärkt. Die zweite Säule, die der Endothelschädigung, zeigt ebenfalls eine NET-Beeinflussung. Die Freisetzung der zellschädigenden Substanzen aus den neutrophilen Granulozyten induziert bzw. steigert einen Endothelschaden, der wiederum zu einer verstärkten Gerinnung führt (Gould et al., 2014). Okrent und Saffarzadeh konnten diese Schädigung auf die zytotoxische Wirkung von β -Defensinen und Histonen zurückführen (Okrent, Lichtenstein, & Ganz, 1990; Saffarzadeh et al., 2012). Diese beiden stark positiv geladenen Teilchen stellen einen möglichen Angriffspunkt für Moleküle gegensätzlicher Ladung dar, wie zum Beispiel Heparin, Albumin (Lam et al., 2013; Wildhagen et al., 2014) oder eben PolySia. In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass PolySia die Zytotoxizität von Histone herabsetzen kann (C. E. Galuska, J. A. Dambon, et al., 2017; S. P. Galuska et al., 2017; Kühnle et al., 2019; Saffarzadeh et al., 2012; C. Ulm et al., 2013; Zlatina et al., 2017; Zlatina et al., 2018) und damit potentiell *in vivo* einer Endothelschädigung entgegenwirken bzw. diese abmildern könnte.

Die Interaktion von PolySia mit Histonen und die Inaktivierung der zytotoxischen Eigenschaften von Histonen durch PolySia hängt stark von der Kettenlänge ab (C. E. Galuska, J. A. Dambon, et al., 2017; S. P. Galuska et al., 2017). Erst ab einer Kettenlänge von mehr als 20 Sialinsäurebausteinen kann man von einer effektiven Inaktivierung ausgehen. Aus diesem Grund wurde der Polysialylierungsgrad im Blut bestimmt. Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ergaben, dass im Plasma und Serum die nötigen Kettenlängen vorhanden sind, um Histone zu binden und zu inaktivieren (Abbildung 13 und 14) (Kühnle et al., 2019). Interessanterweise konnte innerhalb meiner Arbeit im Dot Blot gezeigt werden, dass bereits eine Assoziation zwischen PolySia und Histonen H1 besteht (Abbildung 15). Dies konnte in weiterführenden Studien innerhalb der Arbeitsgruppe Galuska per Western Blot bestätigt werden (Zlatina et al., 2018).

Auf Basis des Nachweises von PolySia-Ketten mit mehr als 30 Sialinsäureresten aus Blutserum- und Plasmaproben erfolgte die zytotoxische Untersuchung mit isolierten extrazellulären Vesikeln. Die Untersuchungen ergaben, dass aus dem Blut isolierte Exosomen die zytotoxische Wirkung von Histonen deutlich abmildern können (Abbildung 16). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit auf meinen Untersuchungen aufbauenden Versuchen. Hier wurde PolySia mittels AP aus humanem Plasma isoliert und auf deren anti-zytotoxischen Eigenschaften gegenüber Histonen getestet. Die Versuche ergaben, dass PolySia aus Plasma, Histone effektiv inaktiviert und eine spezifische Degradierung von PolySia durch EndoN diesen Effekt aufhebt (Zlatina et al., 2018).

Zudem sollte man an dieser Stelle erwähnen, dass nicht nur im menschlichen Blut und in FBS PolySia detektierbar ist (Abbildung 8-10). In unserem Paper *Polysialic Acid in Human Plasma Can Compensate the Cytotoxicity of Histones* (Zlatina et al., 2018) konnten wir zudem zeigen, dass in verschiedenen Wirbeltieren bis hin zu Fischen PolySia im Plasma nachweisbar ist (Abbildung 17) und somit einen physiologischen Plasma Bestandteil in Wirbeltieren darstellt.

Aus all diesen Ergebnissen ergeben sich für den Einsatz von PolySia allein bzw. für mit PolySia beladenen extrazellulären Vesikeln abermals vielfältige Forschungs- und Einsatzfelder. Daneben wäre an einen therapeutischen und diagnostischen Einsatz der PolySia-Träger im Zusammenhang mit Erkrankungen aus Unterpunkt 1.5 zu denken, die alle mit einer erhöhten NETosis-Aktivität einhergehen und bei denen eine Herabregulierung der Histonaktivität und konsekutiv eine verringerte Zellschädigung ein möglicher Heilungsansatz sein könnte.

PolySia stellt sich zusätzlich als möglicher „Gate keeper“ des angeborenen Immunsystems bzw. als Schnittstellenregulator zwischen angeborenem und erworbenem Im-

munsystem dar, welcher in der Lage ist, den Organismus vor möglicher Überaktivität seiner eigenen Immunreserven zu schützen.

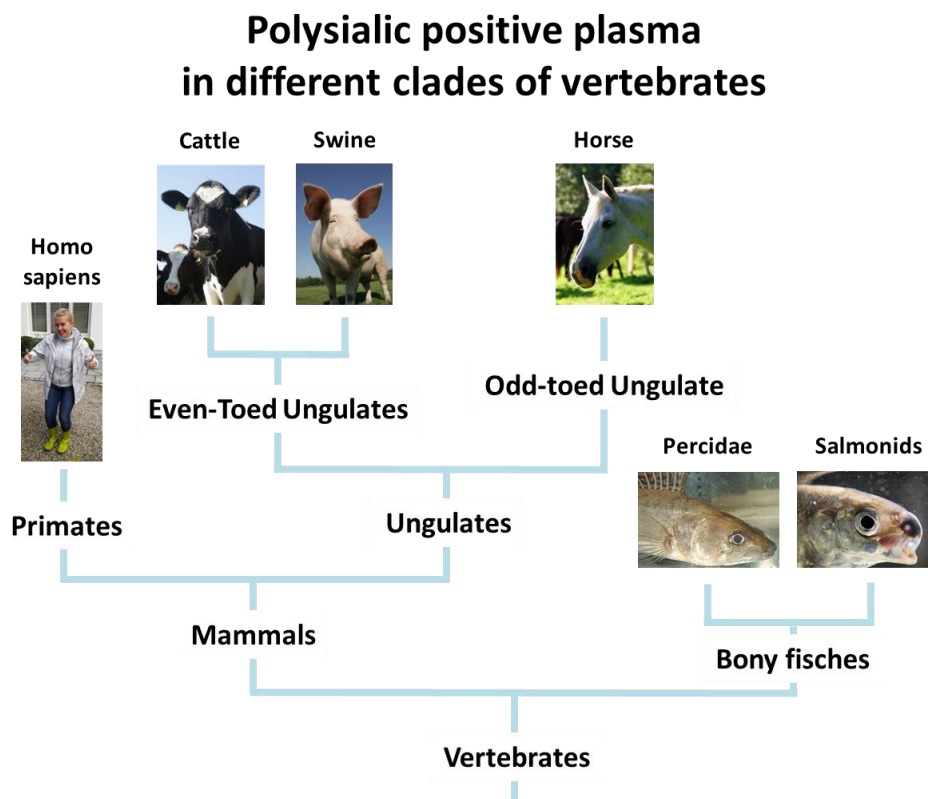


Abbildung 17: Darstellung von Wirbeltieren, die positiv auf PolySia im Plasma getestet wurden. CC-BY Grafik modifiziert nach (Zlatina et al., 2018)

Eine weitere Überlegung ist die Möglichkeit, dass PolySia, an *sialic acid binding Ig-like lectins* (Siglecs) bindet. Besonders Siglec-11, welches auf Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird (Macauley et al., 2014), könnte einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Forschung darstellen. Dieses Siglec-11 bindet $\alpha 2,8$ -verknüpfte PolySia (X. Wang et al., 2011) und konnte die Aktivität von Gewebsmakrophagen aus dem Hirn nach LPS-Stimulation abmildern (Y. Wang & Neumann, 2010), ein Effekt, den neuere Studie zur altersbedingten Makuladegeneration bestätigen konnte. Hier wurde bewiesen, dass PolySia sowohl das angeborene Immunsystem, die Gefäßpermeabilität und den Membranangriffskomplex des Komplementsystems hemmt (Hyvärinen, Meri, & Jokiranta, 2016; Karlstetter et al., 2017).

Daneben eröffnet diese Siglec-11 Assoziation die Chance, möglicherweise in das Gerinnungssystem einzugreifen, da ein „cross-talk“ zwischen Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Plättchen für die Initiation und Verstärkung der tiefen Beinvenenthrombose im Mausmodell verantwortlich gemacht wird (von Bruhl et al., 2012). Im

Formkreis der TVT wäre also eine mögliche Überlegung, ob PolySia an eben solche Makrophagen binden könnte und somit am Ort einer Thrombose angereichert werden kann, in diesem Setting dann die immuno-thrombotische Wirkung von NET abmildert und damit den sich selbst verstärkenden Thrombosekreislauf durchbricht. Ein erster Hinweis eines gegenseitigen Einflusses der PolySia und der Gerinnung könnten die Western Blot-Analysen in dieser Arbeit geben. Dabei konnte in den Plasmaproben durchgängig ein stärkeres PolySia spezifisches Signal nachgewiesen werden (Unterpunkt 4.2). Die Blots könnten möglicherweise einen Hinweis auf ein Zusammenspiel von PolySia und Gerinnungsfaktoren geben. Es handelt sich dabei um eine rein visuelle Feststellung, die im weiteren Verlauf quantitativ an einem großen Probenpool erfasst werden sollte.

Daneben könnte auch die Assoziation zu Histonen eine Rolle spielen, so konnte im Dot Blot (siehe Unterpunkt 4.5) sowohl im Serum als auch im Plasma nachgewiesen werden, dass PolySia und Histone interagieren. Auch hier war ein deutlich stärkeres Signal für PolySia und für Histone im Plasma zu sehen. Wie weiter oben dargestellt, gehen Koagulation und NETosis miteinander einher und bedingen sich in einem gewissen Umfang gegenseitig. Eine solche Assoziation könnte auch bei malignen Erkrankungen eine Therapiemöglichkeit darstellen, da ein NET-Einfluss auf das Zusammenspiel zwischen malignen Erkrankungen und Thrombosen gezeigt werden konnte (Demers et al., 2012), der wohl stark auf der Überaktivität von Plättchen und damit einer erhöhten NETosis zurückzuführen ist (Cedervall, Hamidi, & Olsson, 2018; van den Berg, Osanto, Reitsma, & Versteeg, 2012). Weitere maligne Geschehen in Zusammenhang mit NET sind die höhere Metastasierungsrate im Mausmodell (Cools-Lartigue et al., 2013) und eine erhöhte Rezidivrate nach onkochirurgischen Eingriffen (Berger-Achituv et al., 2013; Tohme et al., 2016), die sich über eine Einflussnahme auf die NET-Formation gegebenenfalls ebenfalls beeinflussen lassen.

In summa bietet sich aus dieser Ergebniskonstellation die Möglichkeit zu weiterer diagnostisch und therapeutisch orientierter Forschung, nicht nur im Wirkungsfeld der Thrombose, sondern zu jeder NET-assoziierten Erkrankung, bei der die lokale Anreicherung bestimmter Stoffe einen möglichen Heilungsansatz darstellen könnte. Zudem wurde über die Verknüpfung mit extrazellulären Vesikeln ein möglicher Stofftransporter für eben diese Stoffe präsentiert.

Basierend auf dieser Idee und den Ergebnissen dieser Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Galuska die Entwicklung von polysialylierten Nanopartikeln vorangetrieben, die sich den Vorteil des gerichteten Transports über PolySia zu Nutze machen konnten (C. E. Galuska, J. A. Dambon, et al., 2017). Dabei wurde auch ein weiteres Problem des Transports an Stellen erhöhter NETosis angegangen, nämlich die vor Ort erhöhte Kon-

zentration an Exosialidasen, die die PolySia abbauen können und damit den zellprotektiven Effekt stark einschränken. Dafür wurden die Polysialinsäuren am nicht reduzierten Ende oxidiert und anschließend mit diesem an die Nanopartikel gekoppelt, sodass sie dem Zugriff der Sialidasen entzogen wurden und die Polysialinkette somit nicht mehr abgebaut werden konnte. In Zellkultur- und Zytotoxizitätsversuchen konnte dann gezeigt werden, dass die beladenen Nanopartikel weiterhin den zytoprotektiven Effekt der PolySia behalten und sich zudem an NET-Fasern anreichern und damit einen gerichteten Transport ermöglichen könnten (C. E. Galuska, J. A. Dambon, et al., 2017). Somit konnte gezeigt werden, dass ein gerichteter Transport zu Orten erhöhter NETosis-Aktivität theoretisch möglich ist und möglicherweise ein weiterer Grundstein gelegt, zur Therapie und Heilung einer Vielzahl von NET-assoziierten Erkrankungen, die in Zukunft mit Hilfe eines gezielten Stofftransports behandelt werden könnten.

6 Kurzzusammenfassung

Sialinsäuren sind α -Ketosäuren, die ein Grundgerüst aus neun Kohlenstoffatomen besitzen und eine Carboxylgruppe in C1-Position sowie eine Ketogruppe in C2-Position trägt. Von den natürlich vorkommenden über 50 Neuraminsäure-Derivaten werden nur wenige für die Biosynthese von Oligo- bzw. Polysialinsäuren (PolySia) benutzt. Dabei spielt in Säugern für den Aufbau einer α 2,8-verknüpften Polysialinsäurekette, die durchaus mehr als 50 Einzelbausteine besitzen kann, die *N*-Acetylneuraminsäure die wichtigste Rolle. Durch den Grundaufbau ist dieser saure Zucker ein stark negativ geladenes Molekül, welches als posttranslationale Modifikation auf Proteinen vorkommen kann. Die häufigsten Forschungsergebnisse brachten PolySia mit der Regulation von Migrationsprozessen und Zell-Zell-Kontakten als Oberflächenbestandteil von Zellen des Nervensystems in Verbindung, eine Funktion die PolySia scheinbar auch in anderen Organsystemen während der Entwicklung übernimmt. Darüber hinaus konnten aber auch viele andere Funktionen von PolySia nachgewiesen werden, wie z.B. die Interaktion mit extrazellulären Histonen sowie die Inaktivierung derer zytotoxischen Eigenschaften.

In der vorliegenden Arbeit konnte PolySia sowohl in Kälberserum als auch im Blutserum sowie Blutplasma von Menschen detektiert werden. Interessanterweise waren sowohl im Serum als auch im Plasma die PolySia-Ketten mit mehr als 30 Sialinsäureresten potenzielle Bindungspartner für extrazelluläre Histone. Tatsächlich zeigten die Versuche, dass PolySia und Histon H1 in Plasma miteinander interagieren. Zudem war PolySia im Plasma auch in Proteinlysaten von isolierten extrazellulären Vesikeln nachweisbar. Basierend darauf wurden die Auswirkungen von extrazellulären Vesikeln auf die Zytotoxizität von Histonen überprüft. Dabei konnte festgestellt werden, dass ein Abfall der Zytotoxizität von Histonen durch extrazelluläre Vesikel erreicht werden kann. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass PolySia in Verbindung mit Histon H 1 und extrazellulären Vesikeln im Blut vorliegt und im Blutsystem einen positiven Einfluss auf die Zytotoxizität von extrazellulären Histonen haben könnte. Dieses Zusammenspiel zwischen Histonen, NET, extrazellulären Vesikeln und PolySia könnte diverse physiologische Mechanismen beeinflussen. Daraus könnten sich Möglichkeiten zur Diagnostik und Therapie verschiedener, mit NET assoziierter Veränderungen ergeben, die Teil weiterer Forschungsarbeiten sein werden.

7 Summary

Sialic acids are α -keto acids with a 9 carbon backbone possessing a carboxyl group in C1-position and a ketone in the C2-position. Although the family of sialic acids consists of 50 different members in nature, only a few of them are used in the biosynthesis of oligo- and polysialic acid (polySia). In mammals, polySia consists of α 2,8-linked *N*-acetylneuramic acid residues forming polymers which can reach chain lengths of more than 50 *N*-acetylneuramic acid residues. PolySia is a polyanionic molecule and can be present as a post translational modification of proteins. Most studies have described a primarily regulatory effect of polySia on the modulation of cell-cell-contacts and migration processes as a component of the cellular surface of neuronal cells, a function, which may also play a role during the development of organs other than the brain. Several additional functions of polySia have been described, such as the interaction of polySia and extracellular histones and the inactivation of the cytotoxic characteristics of histones.

In the present doctoral thesis polySia was observed in fetal calf serum in addition to human serum and plasma. Interestingly, the polySia chains can contain more than 30 sialic acid residues in serum and plasma and are thus long enough to bind extracellular histones and inactivate their cytotoxicity. Subsequently, experiments were performed demonstrating that polySia interacts with histone H1 in plasma. PolySia was also detectable in protein lysates of isolated extracellular vesicles of human plasma. Based on these findings, the capability of extracellular vesicles to inhibit the cytotoxicity of extracellular histones was tested. Experiments demonstrated a cytoprotective effect of extracellular vesicles against the cytotoxicity of extracellular histones.

In summary, this research has demonstrated that polySia is associated with histone H1 and extracellular vesicles in blood, which might represent a buffer system against extracellular histones in blood. The interplay between histones, neutrophil extracellular traps, extracellular vesicles and polySia may influence several physiological mechanisms. This paves the way for novel opportunities in diagnostics and therapeutics, targeting, for instance, NET-associated pathologies.

8 Abkürzungen

Ak	Antikörper
AP	Affinitätspräzipitation
BSA	Rinderserumalbumin
CAM	Cell adhesion molecule
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
DMB	1,2-Diamino-4,5-Methyendioxybenzol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Degree of Polymerization
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylene-glycol-bis(2aminoethylether)- N,N,N',N'tetraacetic acid
EndoN	Endoneuraminidase N
EV	extrazellulär Vesikel
FBS	fetales Kälberserum, fetal bovine Serum
FCS	fetales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
GNE	UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
HPSA	hydrophob modifizierte polysialylierte
HRP	horse radish peroxidase
Ig	Immunglobulin

IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
mAk	monoklonaler Antikörper
ManNAc	N-Acetyl-D-mannosamine
min	Minute
MPO	Myeloperoxidase
MS	Massenspektrometrie
MVB	multivesicular body
MVE	multivesicular endosome
NCAM	neurales Zelladhäsionsmolekül
NE	neutrophile Elastase
NET	Neutrophil Extracellular Traps
Neu5ac	N-Acetylneuraminsäure
NfκB	nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of B-cells
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OT	Objektträger
p.a.	practical grade
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PIPES	Piperazin-N,N`-bis(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNGaseF	N-Glycosidase F
PolySia	Polysialinsäure
PolySia-NCAM	polysialyliertes NCAM
PST-Domäne	Polysialyltransferasen-Domäne
RT	Raumtemperatur
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SiaM	Sialylierungsmotiv

Siglec	sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin
TAPI	TNF- α Protease Inhibitor
TD-Exosomes	tumor derived Exosomes
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	Tissue Factor, Thrombosplastin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF- β	transforming growth factor-beta
TGN 38	Trans-Golgi Netzwerkprotein 38
TIR	Toll/IL-1R
TLR	toll-like receptor
TM	Transmembrandomäne
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TVT	tiefe Venenthrombose
Tween	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
VS	very small
vWF	von-Willebrand Faktor
z.B.	zum Beispiel

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1	Darstellung eines α 2,8-verknüpften (rot dargestellt) Neu5Ac-Polymers.	S. 2
Abbildung 2	Schematische N-Glykan Darstellung nach Polysialylierung.	S. 4
Abbildung 3	Darstellung von NCAM mit unterschiedlichem Polysialylierungsgrad.	S. 4
Abbildung 4	Schematische und 3D-Darstellung von NCAM.	S. 7
Abbildung 5	Exosomen-Entstehungsweg und RNA-Transport über Exosomen.	S. 12
Abbildung 6	Schematische Darstellung der NETosis.	S. 16
Abbildung 7	Model der PolySia-Interaktion mit Histonen.	S. 18
Abbildung 8	Western Blot-Analyse polysialylierter Proteine in FBS.	S. 40
Abbildung 9	Western Blot-Analyse polysialylierter Proteine in humanem Plasma und Serum.	S. 41
Abbildung 10	Western Blot-Analyse polysialylierter Proteine in humanem Plasma nach Affinitätspräzipitation.	S. 42
Abbildung 11	Western Blot-Analyse zur Detektion von PolySia auf Exosomen.	S. 43
Abbildung 12	Western Blot-Analyse zur Detektion von PolySia auf Exosomen nach AP.	S. 44
Abbildung 13	HPLC von Blutplasma nach AP.	S. 45
Abbildung 14	HPLC und Serum-Probe.	S. 46
Abbildung 15	Dot Blot-Analyse zum Nachweis von Histonen und PolySia aus Plasma/Serum-Proben nach AP.	S. 47
Abbildung 16	Zytotoxizitätstest in Abhängigkeit von Histonen und extrazellulären Vesikeln (EVs).	S. 48
Abbildung 17	Darstellung von Wirbeltieren, die positiv auf PolySia im Plasma getestet wurden. Reproduziert aus (Zlatina et al., 2018).	S. 55
 Tabelle 1	 Primär und Sekundärantikörper	 S. 24

10 Referenz

- Abels, E. R., & Breakefield, X. O. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol*, 36(3), 301-312.
- Adkins, J. N., Varnum, S. M., Auberry, K. J., Moore, R. J., Angell, N. H., Smith, R. D., . . . Pounds, J. G. (2002). Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 1(12), 947-955.
- Admyre, C., Johansson, S. M., Qazi, K. R., Filén, J. J., Lahesmaa, R., Norman, M., . . . Gabrielsson, S. (2007). Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol*, 179(3), 1969-1978.
- Alghamdi, A. S., & Foster, D. N. (2005). Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. *Biol Reprod*, 73(6), 1174-1181.
- Andre, F., Scharzt, N. E., Movassagh, M., Flament, C., Pautier, P., Morice, P., . . . Zitvogel, L. (2002). Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet*, 360(9329), 295-305.
- Angata, K., Suzuki, M., & Fukuda, M. (2002). ST8Sia II and ST8Sia IV polysialyltransferases exhibit marked differences in utilizing various acceptors containing oligosialic acid and short polysialic acid. The basis for cooperative polysialylation by two enzymes. *J Biol Chem*, 277(39), 36808-36817.
- Angata, T., & Varki, A. (2002). Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev*, 102(2), 439-469.
- Asea, A., Jean-Pierre, C., Kaur, P., Rao, P., Linhares, I. M., Skupski, D., & Witkin, S. S. (2008). Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *J Reprod Immunol*, 79(1), 12-17.
- Batista, B. S., Eng, W. S., Pilobello, K. T., Hendricks-Muñoz, K. D., & Mahal, L. K. (2011). Identification of a conserved glycan signature for microvesicles. *J Proteome Res*, 10(10), 4624-4633.
- Bax, M., van Vliet, S. J., Litjens, M., Garcia-Vallejo, J. J., & van Kooyk, Y. (2009). Interaction of polysialic acid with CCL21 regulates the migratory capacity of human dendritic cells. *PLoS One*, 4(9), e6987.
- Behrends, J. C., Bischofberger, J., & Deutzmann, R. (2017). Physiologie. (3., vollständig überarbeitete Auflage ed., pp. 1 Online-Ressource (831 Seiten) 710 Illustrationen.). Stuttgart: Thieme,.
- Bellingham, S. A., Coleman, B. M., & Hill, A. F. (2012). Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res*, 40(21), 10937-10949.
- Berg, J. M. (2015). *Biochemistry*. (8. ed.). New York, NY: Freeman.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2013). *Stryer Biochemie*. (7. Auflage ed., pp. XLII, 1198 S. 2022 Abb.). Berlin, Heidelberg: Imprint: Springer Spektrum,.
- Berger-Achituv, S., Brinkmann, V., Abed, U. A., Kuhn, L. I., Ben-Ezra, J., Elhasid, R., & Zychlinsky, A. (2013). A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Front Immunol*, 4, 48.
- Bhatnagar, S., & Schorey, J. S. (2007). Exosomes released from infected macrophages contain *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids and are proinflammatory. *J Biol Chem*, 282(35), 25779-25789.
- Bhatnagar, S., Shinagawa, K., Castellino, F. J., & Schorey, J. S. (2007). Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood*, 110(9), 3234-3244.
- Bhide, G. P., & Colley, K. J. (2016). Sialylation of N-glycans: mechanism, cellular compartmentalization and function. *Histochem Cell Biol*.
- Bhide, G. P., Fernandes, N. R., & Colley, K. J. (2016). Sequence Requirements for Neuropilin-2 Recognition by ST8SiaIV and Polysialylation of Its O-Glycans. *J Biol Chem*, 291(18), 9444-9457.
- Bock, E., Edvardsen, K., Gibson, A., Linnemann, D., Lyles, J. M., & Nybroe, O. (1987). Characterization of soluble forms of NCAM. *FEBS Lett*, 225(1-2), 33-36.
- Boe, D. M., Curtis, B. J., Chen, M. M., Ippolito, J. A., & Kovacs, E. J. (2015). Extracellular traps and macrophages: new roles for the versatile phagocyte. *J Leukoc Biol*, 97(6), 1023-1035.
- Borissoff, J. I., Joosen, I. A., Versteylen, M. O., Brill, A., Fuchs, T. A., Savchenko, A. S., . . . Kietselaer, B. L. (2013). Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with

- severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33(8), 2032-2040.
- Brenneman, L. H., & Maness, P. F. (2010). NCAM in neuropsychiatric and neurodegenerative disorders. *Adv Exp Med Biol*, 663, 299-317.
- Brill, A., Fuchs, T. A., Savchenko, A. S., Thomas, G. M., Martinod, K., De Meyer, S. F., . . . Wagner, D. D. (2012). Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost*, 10(1), 136-144.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., . . . Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), 1532-1535.
- Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2007). Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*, 5(8), 577-582.
- Bryant, R. J., Pawlowski, T., Catto, J. W., Marsden, G., Vessella, R. L., Rhees, B., . . . Hamdy, F. C. (2012). Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br J Cancer*, 106(4), 768-774.
- Butenas, S., Orfeo, T., & Mann, K. G. (2008). Tissue factor activity and function in blood coagulation. *Thromb Res*, 122 Suppl 1, S42-46.
- Caby, M. P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G., & Bonnerot, C. (2005). Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*, 17(7), 879-887.
- Carceller, H., Rovira-Esteban, L., Nacher, J., Castrén, E., & Guirado, R. (2016). Neurochemical Phenotype of Reelin Immunoreactive Cells in the Piriform Cortex Layer II. *Front Cell Neurosci*, 10, 65.
- Caudrillier, A., Kessenbrock, K., Gilliss, B. M., Nguyen, J. X., Marques, M. B., Monestier, M., . . . Looney, M. R. (2012). Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest*, 122(7), 2661-2671.
- Cedervall, J., Hamidi, A., & Olsson, A. K. (2018). Platelets, NETs and cancer. *Thromb Res*, 164 Suppl 1, S148-S152.
- Chaput, N., & Théry, C. (2011). Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol*, 33(5), 419-440.
- Chen, V. Y., Posada, M. M., Blazer, L. L., Zhao, T., & Rosania, G. R. (2006). The role of the VPS4A-exosome pathway in the intrinsic egress route of a DNA-binding anticancer drug. *Pharm Res*, 23(8), 1687-1695.
- Clark, S. R., Ma, A. C., Tavener, S. A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M. M., . . . Kubes, P. (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*, 13(4), 463-469.
- Cocucci, E., Racchetti, G., & Meldolesi, J. (2009). Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*, 19(2), 43-51.
- Colley, K. J. (2010). Structural basis for the polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *Adv Exp Med Biol*, 663, 111-126.
- Colley, K. J., Kitajima, K., & Sato, C. (2014). Polysialic acid: biosynthesis, novel functions and applications. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 49(6), 498-532.
- Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., . . . Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci*, 126(Pt 24), 5553-5565.
- Conde-Vancells, J., Rodriguez-Suarez, E., Embade, N., Gil, D., Matthiesen, R., Valle, M., . . . Falcon-Perez, J. M. (2008). Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J Proteome Res*, 7(12), 5157-5166.
- Cools-Lartigue, J., Spicer, J., McDonald, B., Gowing, S., Chow, S., Giannias, B., . . . Ferri, L. (2013). Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest*.
- Corfield, A. P., Wember, M., Schauer, R., & Rott, R. (1982). The specificity of viral sialidases. The use of oligosaccharide substrates to probe enzymic characteristics and strain-specific differences. *Eur J Biochem*, 124(3), 521-525.
- Cunningham, B. A., Hemperly, J. J., Murray, B. A., Prediger, E. A., Brackenbury, R., & Edelman, G. M. (1987). Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science*, 236(4803), 799-806.
- Curreli, S., Arany, Z., Gerardy-Schahn, R., Mann, D., & Stamatou, N. M. (2007). Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions. *J Biol Chem*, 282(42), 30346-30356.

- Decoursey, T. E., & Ligeti, E. (2005). Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life Sci*, 62(19-20), 2173-2193.
- Demers, M., Krause, D. S., Schatzberg, D., Martinod, K., Voorhees, J. R., Fuchs, T. A., . . . Wagner, D. D. (2012). Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(32), 13076-13081.
- Dityatev, A., Bukalo, O., & Schachner, M. (2008). Modulation of synaptic transmission and plasticity by cell adhesion and repulsion molecules. *Neuron Glia Biol*, 4(3), 197-209.
- Dityatev, A., Dityateva, G., & Schachner, M. (2000). Synaptic strength as a function of post- versus presynaptic expression of the neural cell adhesion molecule NCAM. *Neuron*, 26(1), 207-217.
- Drake, P. M., Nathan, J. K., Stock, C. M., Chang, P. V., Muench, M. O., Nakata, D., . . . Bertozzi, C. R. (2008). Polysialic acid, a glycan with highly restricted expression, is found on human and murine leukocytes and modulates immune responses. *J Immunol*, 181(10), 6850-6858.
- Drake, P. M., Stock, C. M., Nathan, J. K., Gip, P., Golden, K. P., Weinhold, B., . . . Bertozzi, C. R. (2009). Polysialic acid governs T-cell development by regulating progenitor access to the thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(29), 11995-12000.
- Dworski, R., Simon, H. U., Hoskins, A., & Yousefi, S. (2011). Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol*, 127(5), 1260-1266.
- Döring, Y., Manthey, H. D., Drechsler, M., Lievens, D., Megens, R. T., Soehnlein, O., . . . Zerneck, A. (2012). Auto-antigenic protein-DNA complexes stimulate plasmacytoid dendritic cells to promote atherosclerosis. *Circulation*, 125(13), 1673-1683.
- Falconer, R. A., Errington, R. J., Shnyder, S. D., Smith, P. J., & Patterson, L. H. (2012). Polysialyltransferase: a new target in metastatic cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 12(8), 925-939.
- Finne, J. (1982). Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain. *J Biol Chem*, 257(20), 11966-11970.
- Finne, J., Finne, U., Deagostini-Bazin, H., & Goridis, C. (1983). Occurrence of alpha 2-8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule. *Biochem Biophys Res Commun*, 112(2), 482-487.
- Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., . . . Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, 176(2), 231-241.
- Fuchs, T. A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, D. D., . . . Wagner, D. D. (2010). Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(36), 15880-15885.
- Fuchs, T. A., Brill, A., & Wagner, D. D. (2012). Neutrophil Extracellular Trap (NET) Impact on Deep Vein Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32(8), 1777-1783.
- Galuska, C. E., Dambon, J. A., Kuhnle, A., Bornhofft, K. F., Prem, G., Zlatina, K., . . . Galuska, S. P. (2017). Artificial Polysialic Acid Chains as Sialidase-Resistant Molecular-Anchors to Accumulate Particles on Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol*, 8, 1229.
- Galuska, C. E., Lutteke, T., & Galuska, S. P. (2017). Is Polysialylated NCAM Not Only a Regulator during Brain Development But also during the Formation of Other Organs? *Biology (Basel)*, 6(2).
- Galuska, S. P., Galuska, C. E., Tharmalingam, T., Zlatina, K., Prem, G., Husejnov, F. C. O., . . . Carrington, S. D. (2017). In vitro generation of polysialylated cervical mucins by bacterial polysialyltransferases to counteract cytotoxicity of extracellular histones. *FEBS J*, 284(11), 1688-1699.
- Galuska, S. P., Geyer, R., Gerardy-Schahn, R., Mühlenhoff, M., & Geyer, H. (2008). Enzyme-dependent Variations in the Polysialylation of the Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) in Vivo. *J Biol Chem*, 283(1), 17-28.
- Galuska, S. P., Oltmann-Norden, I., Geyer, H., Weinhold, B., Kuchelmeister, K., Hildebrandt, H., . . . Mühlenhoff, M. (2006). Polysialic acid profiles of mice expressing variant allelic combinations of the polysialyltransferases ST8SialI and ST8SialIV. *J Biol Chem*, 281(42), 31605-31615.
- Galuska, S. P., Rollenhagen, M., Kaup, M., Eggers, K., Oltmann-Norden, I., Schiff, M., . . . Geyer, H. (2010). Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(22), 10250-10255.
- Gardiner, C., Di Vizio, D., Sahoo, S., Théry, C., Witwer, K. W., Wauben, M., & Hill, A. F. (2016). Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *J Extracell Vesicles*, 5, 32945.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., & Parks, W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, 51(5), 1417-1423.

- Gilabert-Juan, J., Castillo-Gomez, E., Pérez-Rando, M., Moltó, M. D., & Nacher, J. (2011). Chronic stress induces changes in the structure of interneurons and in the expression of molecules related to neuronal structural plasticity and inhibitory neurotransmission in the amygdala of adult mice. *Exp Neurol*, 232(1), 33-40.
- Gluer, S., Schelp, C., Madry, N., von Schweinitz, D., Eckhardt, M., & Gerardy-Schahn, R. (1998). Serum polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood neuroblastoma. *Br J Cancer*, 78(1), 106-110.
- Gluer, S., Wunder, M. A., Schelp, C., Radtke, E., & Gerardy-Schahn, R. (1998). Polysialylated neural cell adhesion molecule serum levels in normal children. *Pediatr Res*, 44(6), 915-919.
- Gould, T. J., Vu, T. T., Swystun, L. L., Dwivedi, D. J., Mai, S. H., Weitz, J. I., & Liaw, P. C. (2014). Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34(9), 1977-1984.
- Guenat, D., Hermetet, F., Pretet, J. L., & Mougín, C. (2017). Exosomes and Other Extracellular Vesicles in HPV Transmission and Carcinogenesis. *Viruses*, 9(8).
- Gupta, A., Hasler, P., Gebhardt, S., Holzgreve, W., & Hahn, S. (2006). Occurrence of neutrophil extracellular DNA traps (NETs) in pre-eclampsia: a link with elevated levels of cell-free DNA? *Ann N Y Acad Sci*, 1075, 118-122.
- Gómez-Climent, M., Guirado, R., Castillo-Gómez, E., Varea, E., Gutierrez-Mecinas, M., Gilabert-Juan, J., . . . Nacher, J. (2011). The polysialylated form of the neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) is expressed in a subpopulation of mature cortical interneurons characterized by reduced structural features and connectivity. *Cereb Cortex*, 21(5), 1028-1041.
- Hakim, A., Fuchs, T. A., Martinez, N. E., Hess, S., Prinz, H., Zychlinsky, A., & Waldmann, H. (2011). Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol*, 7(2), 75-77.
- Hammond, M. S., Sims, C., Parameshwaran, K., Suppiramaniam, V., Schachner, M., & Dityatev, A. (2006). Neural cell adhesion molecule-associated polysialic acid inhibits NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors and prevents glutamate-induced cell death. *J Biol Chem*, 281(46), 34859-34869.
- Hannafon, B. N., Trigoso, Y. D., Calloway, C. L., Zhao, Y. D., Lum, D. H., Welm, A. L., . . . Ding, W. Q. (2016). Plasma exosome microRNAs are indicative of breast cancer. *Breast Cancer Res*, 18(1), 90.
- Harding, C., Heuser, J., & Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol*, 97(2), 329-339.
- Harding, C., Heuser, J., & Stahl, P. (1984). Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur J Cell Biol*, 35(2), 256-263.
- Herold, G. (2017). Innere Medizin . eine vorlesungsorientierte Darstellung : 2017 : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. (p. 997 Seiten.). Köln: Gerd Herold.
- Hinsby, A. M., Berezin, V., & Bock, E. (2004). Molecular mechanisms of NCAM function. *Front Biosci*, 9, 2227-2244.
- Holm, M. M., Kaiser, J., & Schwab, M. E. (2018). Extracellular Vesicles: Multimodal Envoys in Neural Maintenance and Repair. *Trends Neurosci*.
- Hong, B. S., Cho, J. H., Kim, H., Choi, E. J., Rho, S., Kim, J., . . . Gho, Y. S. (2009). Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC Genomics*, 10, 556.
- Hood, J. L., San, R. S., & Wickline, S. A. (2011). Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res*, 71(11), 3792-3801.
- Husmann, M., Pietsch, T., Fleischer, B., Weisgerber, C., & Bitter-Suermann, D. (1989). Embryonic neural cell adhesion molecules on human natural killer cells. *Eur J Immunol*, 19(9), 1761-1763.
- Hyvärinen, S., Meri, S., & Jokiranta, T. S. (2016). Disturbed sialic acid recognition on endothelial cells and platelets in complement attack causes atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*, 127(22), 2701-2710.
- Inoue, S., & Inoue, Y. (2001). Developmental profile of neural cell adhesion molecule glycoforms with a varying degree of polymerization of polysialic acid chains. *J Biol Chem*, 276(34), 31863-31870.
- Inoue, S., Lin, S. L., Lee, Y. C., & Inoue, Y. (2001). An ultrasensitive chemical method for polysialic acid analysis. *Glycobiology*, 11(9), 759-767.

- James, W. M., & Agnew, W. S. (1987). Multiple oligosaccharide chains in the voltage-sensitive Na channel from *Electrophorus electricus*: evidence for α -2,8-linked polysialic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, 148(2), 817-826.
- Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., & Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*, 262(19), 9412-9420.
- Jorgensen, O. S., & Bock, E. (1974). Brain specific synaptosomal membrane proteins demonstrated by crossed immunoelectrophoresis. *J Neurochem*, 23(4), 879-880.
- Jung, B., Shim, M. K., Park, M. J., Jang, E. H., Yoon, H. Y., Kim, K., & Kim, J. H. (2017). Hydrophobically modified polysaccharide-based on polysialic acid nanoparticles as carriers for anticancer drugs. *Int J Pharm*, 520(1-2), 111-118.
- Kahlert, C., Melo, S. A., Protopopov, A., Tang, J., Seth, S., Koch, M., . . . Kalluri, R. (2014). Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J Biol Chem*, 289(7), 3869-3875.
- Kambas, K., Mitroulis, I., & Ritis, K. (2012). The emerging role of neutrophils in thrombosis-the journey of TF through NETs. *Front Immunol*, 3, 385.
- Karlstetter, M., Kopatz, J., Aslanidis, A., Shahraz, A., Caramoy, A., Linnartz-Gerlach, B., . . . Neumann, H. (2017). Polysialic acid blocks mononuclear phagocyte reactivity, inhibits complement activation, and protects from vascular damage in the retina. *EMBO Mol Med*, 9(2), 154-166.
- Keerthikumar, S., Gangoda, L., Liem, M., Fonseka, P., Atukorala, I., Ozcitti, C., . . . Mathivanan, S. (2015). Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes. *Oncotarget*, 6(17), 15375-15396.
- Kelm, S., & Schauer, R. (1997). Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int Rev Cytol*, 175, 137-240.
- Khan, S., Bennit, H. F., Turay, D., Perez, M., Mirshahidi, S., Yuan, Y., & Wall, N. R. (2014). Early diagnostic value of survivin and its alternative splice variants in breast cancer. *BMC Cancer*, 14, 176.
- Khan, S., Jutzy, J. M., Valenzuela, M. M., Turay, D., Aspe, J. R., Ashok, A., . . . Wall, N. R. (2012). Plasma-derived exosomal survivin, a plausible biomarker for early detection of prostate cancer. *PLoS One*, 7(10), e46737.
- Kibbelaar, R. E., Moolenaar, C. E., Michalides, R. J., Bitter-Suermann, D., Addis, B. J., & Mooi, W. J. (1989). Expression of the embryonal neural cell adhesion molecule N-CAM in lung carcinoma. Diagnostic usefulness of monoclonal antibody 735 for the distinction between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer. *J Pathol*, 159(1), 23-28.
- Kiermaier, E., Moussion, C., Veldkamp, C. T., Gerardy-Schahn, R., de Vries, I., Williams, L. G., . . . Sixt, M. (2016). Polysialylation controls dendritic cell trafficking by regulating chemokine recognition. *Science*, 351(6269), 186-190.
- Kimball, A. S., Obi, A. T., Diaz, J. A., & Henke, P. K. (2016). The Emerging Role of NETs in Venous Thrombosis and Immunothrombosis. *Front Immunol*, 7, 236.
- Kiss, J. Z., & Rougon, G. (1997). Cell biology of polysialic acid. *Curr Opin Neurobiol*, 7(5), 640-646.
- Kochlamazashvili, G., Senkov, O., Grebenyuk, S., Robinson, C., Xiao, M. F., Stummeyer, K., . . . Dityatev, A. (2010). Neural cell adhesion molecule-associated polysialic acid regulates synaptic plasticity and learning by restraining the signaling through GluN2B-containing NMDA receptors. *J Neurosci*, 30(11), 4171-4183.
- Kolaczowska, E., Jenne, C. N., Surewaard, B. G., Thanabalasuriar, A., Lee, W. Y., Sanz, M. J., . . . Kubes, P. (2015). Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nat Commun*, 6, 6673.
- Kolaczowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13(3), 159-175.
- Kornfeld, S., Kornfeld, R., Neufeld, E. F., & O'Brien, P. J. (1964). The Feedback Control of Sugar Nucleotide Biosynthesis in Liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 52, 371-379.
- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal-Bengtson, B., . . . Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(8), E968-977.
- Kühnle, A., Veelken, R., Galuska, C. E., Saftenerberger, M., Verleih, M., Schuppe, H. C., . . . Galuska, S. P. (2019). Polysialic acid interacts with lactoferrin and supports its activity to inhibit the release of neutrophil extracellular traps. *Carbohydr Polym*, 208, 32-41.

- Lackie, P. M., Zuber, C., & Roth, J. (1990). Polysialic acid and N-CAM localisation in embryonic rat kidney: mesenchymal and epithelial elements show different patterns of expression. *Development*, 110(3), 933-947.
- Lackie, P. M., Zuber, C., & Roth, J. (1991). Expression of polysialylated N-CAM during rat heart development. *Differentiation*, 47(2), 85-98.
- Lackie, P. M., Zuber, C., & Roth, J. (1994). Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is widely expressed during organogenesis in mesodermal and endodermal derivatives. *Differentiation*, 57(2), 119-131.
- Lam, F. W., Cruz, M. A., Leung, H. C., Parikh, K. S., Smith, C. W., & Rumbaut, R. E. (2013). Histone induced platelet aggregation is inhibited by normal albumin. *Thromb Res*, 132(1), 69-76.
- Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., . . . Gilliet, M. (2011). Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med*, 3(73), 73ra19.
- Leffler, J., Ciacma, K., Gullstrand, B., Bengtsson, A. A., Martin, M., & Blom, A. M. (2015). A subset of patients with systemic lupus erythematosus fails to degrade DNA from multiple clinically relevant sources. *Arthritis Res Ther*, 17, 205.
- Li, M., Zeringer, E., Barta, T., Schageman, J., Cheng, A., & Vlassov, A. V. (2014). Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1652).
- Liao, G., Zhou, Z., Suryawanshi, S., Mondal, M. A., & Guo, Z. (2016). Fully Synthetic Self-Adjuvanting α -2,9-Oligosialic Acid Based Conjugate Vaccines against Group C Meningitis. *ACS Cent Sci*, 2(4), 210-218.
- Liedtke, S., Geyer, H., Wuhrer, M., Geyer, R., Frank, G., Gerardy-Schahn, R., . . . Schachner, M. (2001). Characterization of N-glycans from mouse brain neural cell adhesion molecule. *Glycobiology*, 11(5), 373-384.
- Lin, A. M., Rubin, C. J., Khandpur, R., Wang, J. Y., Riblett, M., Yalavarthi, S., . . . Bruce, A. T. (2011). Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol*, 187(1), 490-500.
- Little, E. B., Crossin, K. L., Krushel, L. A., Edelman, G. M., & Cunningham, B. A. (2001). A short segment within the cytoplasmic domain of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is essential for N-CAM-induced NF-kappa B activity in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(5), 2238-2243.
- Liu, C., Eng, C., Shen, J., Lu, Y., Takata, Y., Mehdizadeh, A., . . . Li, D. (2016). Serum exosomal miR-4772-3p is a predictor of tumor recurrence in stage II and III colon cancer. *Oncotarget*, 7(46), 76250-76260.
- Läubli, H., & Borsig, L. (2010). Selectins promote tumor metastasis. *Semin Cancer Biol*, 20(3), 169-177.
- Macauley, M. S., Crocker, P. R., & Paulson, J. C. (2014). Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat Rev Immunol*, 14(10), 653-666.
- Maness, P. F., & Schachner, M. (2007). Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci*, 10(1), 19-26.
- Manterola, L., Guruceaga, E., Gállego Pérez-Larraya, J., González-Huarriz, M., Jauregui, P., Tejada, S., . . . Alonso, M. M. (2014). A small noncoding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool. *Neuro Oncol*, 16(4), 520-527.
- Manzenreiter, R., Kienberger, F., Marcos, V., Schilcher, K., Krautgartner, W. D., Obermayer, A., . . . Hartl, D. (2012). Ultrastructural characterization of cystic fibrosis sputum using atomic force and scanning electron microscopy. *J Cyst Fibros*, 11(2), 84-92.
- Marengo, S. R. (2008). Maturing the sperm: unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. *Anim Reprod Sci*, 105(1-2), 52-63.
- Markram, K., Gerardy-Schahn, R., & Sandi, C. (2007). Selective learning and memory impairments in mice deficient for polysialylated NCAM in adulthood. *Neuroscience*, 144(3), 788-796.
- Massberg, S., Grahl, L., von Bruehl, M. L., Manukyan, D., Pfeiler, S., Goosmann, C., . . . Engelmann, B. (2010). Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med*, 16(8), 887-896.
- Masyuk, A. I., Huang, B. Q., Ward, C. J., Gradilone, S. A., Banales, J. M., Masyuk, T. V., . . . LaRusso, N. F. (2010). Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 299(4), G990-999.

- Matrosovich, M., Herrler, G., & Klenk, H. D. (2015). Sialic Acid Receptors of Viruses. *Top Curr Chem*, 367, 1-28.
- McEver, R. P. (2015). Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc Res*, 107(3), 331-339.
- Melo, S. A., Luecke, L. B., Kahlert, C., Fernandez, A. F., Gammon, S. T., Kaye, J., . . . Kalluri, R. (2015). Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*, 523(7559), 177-182.
- Metzler, K. D., Fuchs, T. A., Nauseef, W. M., Reumaux, D., Roesler, J., Schulze, I., . . . Zychlinsky, A. (2011). Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood*, 117(3), 953-959.
- Minciacci, V. R., Spinelli, C., Reis-Sobreiro, M., Cavallini, L., You, S., Zandian, M., . . . Di Vizio, D. (2017). MYC Mediates Large Oncosome-Induced Fibroblast Reprogramming in Prostate Cancer. *Cancer Res*, 77(9), 2306-2317.
- Miyagi, T., & Yamaguchi, K. (2012). Mammalian sialidases: physiological and pathological roles in cellular functions. *Glycobiology*, 22(7), 880-896.
- Moebius, J. M., Wiedera, D., Schmitz, J., Kaltschmidt, C., & Piechaczek, C. (2007). Impact of polysialylated CD56 on natural killer cell cytotoxicity. *BMC Immunol*, 8, 13.
- Moon, P. G., Lee, J. E., Cho, Y. E., Lee, S. J., Chae, Y. S., Jung, J. H., . . . Baek, M. C. (2016). Fibronectin on circulating extracellular vesicles as a liquid biopsy to detect breast cancer. *Oncotarget*, 7(26), 40189-40199.
- Murray, B. A., Hoffman, S., & Cunningham, B. A. (1987). Molecular features of cell-cell adhesion molecules. *Prog Brain Res*, 71, 35-45.
- Möbius, W., Ohno-Iwashita, Y., van Donselaar, E. G., Oorschot, V. M., Shimada, Y., Fujimoto, T., . . . Slot, J. W. (2002). Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O. *J Histochem Cytochem*, 50(1), 43-55.
- Möllerherm, H., von Köckritz-Blickwede, M., & Branitzki-Heinemann, K. (2016). Antimicrobial Activity of Mast Cells: Role and Relevance of Extracellular DNA Traps. *Front Immunol*, 7, 265.
- Mühlenhoff, M., Eckhardt, M., Bethe, A., Frosch, M., & Gerardy-Schahn, R. (1996). Autocatalytic polysialylation of polysialyltransferase-1. *EMBO J*, 15(24), 6943-6950.
- Mühlenhoff, M., Eckhardt, M., & Gerardy-Schahn, R. (1998). Polysialic acid: three-dimensional structure, biosynthesis and function. *Curr Opin Struct Biol*, 8(5), 558-564.
- Nacher, J., Blasco-Ibáñez, J. M., & McEwen, B. S. (2002). Non-granule PSA-NCAM immunoreactive neurons in the rat hippocampus. *Brain Res*, 930(1-2), 1-11.
- Nacher, J., Lanuza, E., & McEwen, B. S. (2002). Distribution of PSA-NCAM expression in the amygdala of the adult rat. *Neuroscience*, 113(3), 479-484.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*, 6(3), 173-182.
- Nguyen, C., Mattei, M. G., Mattei, J. F., Santoni, M. J., Goridis, C., & Jordan, B. R. (1986). Localization of the human NCAM gene to band q23 of chromosome 11: the third gene coding for a cell interaction molecule mapped to the distal portion of the long arm of chromosome 11. *J Cell Biol*, 102(3), 711-715.
- Niethammer, P., Dellling, M., Sytnyk, V., Dityatev, A., Fukami, K., & Schachner, M. (2002). Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis. *J Cell Biol*, 157(3), 521-532.
- Nilsson, J., Skog, J., Nordstrand, A., Baranov, V., Mincheva-Nilsson, L., Breakefield, X. O., & Widmark, A. (2009). Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *Br J Cancer*, 100(10), 1603-1607.
- Nolte-'t Hoen, E. N., Buermans, H. P., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M. H., & 't Hoen, P. A. (2012). Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res*, 40(18), 9272-9285.
- Ogata-Kawata, H., Izumiya, M., Kurioka, D., Honma, Y., Yamada, Y., Furuta, K., . . . Tsuchiya, N. (2014). Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PLoS One*, 9(4), e92921.
- Ogawa, Y., Miura, Y., Harazono, A., Kanai-Azuma, M., Akimoto, Y., Kawakami, H., . . . Yanoshita, R. (2011). Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva. *Biol Pharm Bull*, 34(1), 13-23.

- Okrent, D. G., Lichtenstein, A. K., & Ganz, T. (1990). Direct cytotoxicity of polymorphonuclear leukocyte granule proteins to human lung-derived cells and endothelial cells. *Am Rev Respir Dis*, 141(1), 179-185.
- Olsen, M., Krog, L., Edvardsen, K., Skovgaard, L. T., & Bock, E. (1993). Intact transmembrane isoforms of the neural cell adhesion molecule are released from the plasma membrane. *Biochem J*, 295 (Pt 3), 833-840.
- Pandya, I. J., & Cohen, J. (1985). The leukocytic reaction of the human uterine cervix to spermatozoa. *Fertil Steril*, 43(3), 417-421.
- Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A., & Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, 191(3), 677-691.
- Park, J. E., Tan, H. S., Datta, A., Lai, R. C., Zhang, H., Meng, W., . . . Sze, S. K. (2010). Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Mol Cell Proteomics*, 9(6), 1085-1099.
- Paulson, J. C., Macauley, M. S., & Kawasaki, N. (2012). Siglecs as sensors of self in innate and adaptive immune responses. *Ann N Y Acad Sci*, 1253, 37-48.
- Pearce, O. M., & Läubli, H. (2016). Sialic acids in cancer biology and immunity. *Glycobiology*, 26(2), 111-128.
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., . . . Lyden, D. (2016). Corrigendum: Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*, 22(12), 1502.
- Peters, M. J., Dixon, G., Kotowicz, K. T., Hatch, D. J., Heyderman, R. S., & Klein, N. J. (1999). Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing. *Br J Haematol*, 106(2), 391-399.
- Piras, F., Schiff, M., Chiapponi, C., Bossu, P., Muhlenhoff, M., Caltagirone, C., . . . Spalletta, G. (2015). Brain structure, cognition and negative symptoms in schizophrenia are associated with serum levels of polysialic acid-modified NCAM. *Transl Psychiatry*, 5, e658.
- Pisitkun, T., Shen, R. F., & Knepper, M. A. (2004). Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(36), 13368-13373.
- Pultz, B. D., da Luz, F. A., Faria, S. S., de Souza, L. P., Brígido Tavares, P. C., Goulart, V. A., . . . Silva, M. J. (2017). The multifaceted role of extracellular vesicles in metastasis: Priming the soil for seeding. *Int J Cancer*.
- Qu, Y., Ramachandra, L., Mohr, S., Franchi, L., Harding, C. V., Nunez, G., & Dubyak, G. R. (2009). P2X7 receptor-stimulated secretion of MHC class II-containing exosomes requires the ASC/NLRP3 inflammasome but is independent of caspase-1. *J Immunol*, 182(8), 5052-5062.
- Que, R., Ding, G., Chen, J., & Cao, L. (2013). Analysis of serum exosomal microRNAs and clinicopathologic features of patients with pancreatic adenocarcinoma. *World J Surg Oncol*, 11, 219.
- Raimondo, F., Morosi, L., Chinello, C., Magni, F., & Pitto, M. (2011). Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. *Proteomics*, 11(4), 709-720.
- Rak, J. (2010). Microparticles in cancer. *Semin Thromb Hemost*, 36(8), 888-906.
- Ramachandra, L., Qu, Y., Wang, Y., Lewis, C. J., Cobb, B. A., Takatsu, K., . . . Harding, C. V. (2010). Mycobacterium tuberculosis synergizes with ATP to induce release of microvesicles and exosomes containing major histocompatibility complex class II molecules capable of antigen presentation. *Infect Immun*, 78(12), 5116-5125.
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 200(4), 373-383.
- Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., & Ratajczak, M. Z. (2006). Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*, 20(9), 1487-1495.
- Rey-Gallardo, A., Delgado-Martin, C., Gerardy-Schahn, R., Rodriguez-Fernandez, J. L., & Vega, M. A. (2011). Polysialic acid is required for neuropilin-2a/b-mediated control of CCL21-driven chemotaxis of mature dendritic cells and for their migration in vivo. *Glycobiology*, 21(5), 655-662.
- Rey-Gallardo, A., Escribano, C., Delgado-Martin, C., Rodriguez-Fernandez, J. L., Gerardy-Schahn, R., Rutishauser, U., . . . Vega, M. A. (2010). Polysialylated neuropilin-2 enhances human dendritic cell migration through the basic C-terminal region of CCL21. *Glycobiology*, 20(9), 1139-1146.

- Ronquist, G., & Brody, I. (1985). The prostasome: its secretion and function in man. *Biochim Biophys Acta*, 822(2), 203-218.
- Roth, J., Zuber, C., Wagner, P., Blaha, I., Bitter-Suermann, D., & Heitz, P. U. (1988). Presence of the long chain form of polysialic acid of the neural cell adhesion molecule in Wilms' tumor. Identification of a cell adhesion molecule as an oncodevelopmental antigen and implications for tumor histogenesis. *Am J Pathol*, 133(2), 227-240.
- Rothbard, J. B., Brackenbury, R., Cunningham, B. A., & Edelman, G. M. (1982). Differences in the carbohydrate structures of neural cell-adhesion molecules from adult and embryonic chicken brains. *J Biol Chem*, 257(18), 11064-11069.
- Rupp, A. K., Rupp, C., Keller, S., Brase, J. C., Ehehalt, R., Fogel, M., . . . Altevogt, P. (2011). Loss of EpCAM expression in breast cancer derived serum exosomes: role of proteolytic cleavage. *Gynecol Oncol*, 122(2), 437-446.
- Saffarzadeh, M., Juenemann, C., Queisser, M. A., Lochnit, G., Barreto, G., Galuska, S. P., . . . Preissner, K. T. (2012). Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One*, 7(2), e32366.
- Samraj, A. N., Pearce, O. M., Laubli, H., Crittenden, A. N., Bergfeld, A. K., Banda, K., . . . Varki, A. (2015). A red meat-derived glycan promotes inflammation and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(2), 542-547.
- Sato, C., Fukuoka, H., Ohta, K., Matsuda, T., Koshino, R., Kobayashi, K., . . . Kitajima, K. (2000). Frequent occurrence of pre-existing alpha 2-->8-linked disialic and oligosialic acids with chain lengths up to 7 Sia residues in mammalian brain glycoproteins. Prevalence revealed by highly sensitive chemical methods and anti-di-, oligo-, and poly-Sia antibodies specific for defined chain lengths. *J Biol Chem*, 275(20), 15422-15431.
- Schauer, R. (2004). Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology (Jena)*, 107(1), 49-64.
- Schwarzer, D., Stummeyer, K., Haselhorst, T., Freiburger, F., Rode, B., Grove, M., . . . Gerardy-Schahn, R. (2009). Proteolytic release of the intramolecular chaperone domain confers processivity to endosialidase F. *J Biol Chem*, 284(14), 9465-9474.
- Secher, T. (2010). Soluble NCAM. *Adv Exp Med Biol*, 663, 227-242.
- Shahraz, A., Kopatz, J., Mathy, R., Kappler, J., Winter, D., Kapoor, S., . . . Neumann, H. (2015). Anti-inflammatory activity of low molecular weight polysialic acid on human macrophages. *Sci Rep*, 5, 16800.
- Shedden, K., Xie, X. T., Chandaroy, P., Chang, Y. T., & Rosania, G. R. (2003). Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res*, 63(15), 4331-4337.
- Silbernagl, S., & Despopoulos, A. (2012). Taschenatlas Physiologie. (8., überarb. und erw. Aufl. ed., pp. XII, 455 S.). Stuttgart { u.a.: Thieme.
- Silbernagl, S., & Lang, F. (2013). Taschenatlas Pathophysiologie. (4., aktualisierte und erw. Aufl. ed., pp. X, 428 S. zahlr. Ill., graph. Darst.). Stuttgart { u.a.: Thieme.
- Silverman, J. M., Clos, J., Horakova, E., Wang, A. Y., Wiesgigl, M., Kelly, I., . . . Reiner, N. E. (2010). Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *J Immunol*, 185(9), 5011-5022.
- Simon, P., Bäumner, S., Busch, O., Röhrich, R., Kaese, M., Richterich, P., . . . Galuska, S. P. (2013). Polysialic Acid Is Present in Mammalian Semen as a Post-translational Modification of the Neural Cell Adhesion Molecule NCAM and the Polysialyltransferase ST8Siall. *J Biol Chem*, 288(26), 18825-18833.
- Simons, M., & Raposo, G. (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*, 21(4), 575-581.
- Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., . . . Breakefield, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*, 10(12), 1470-1476.
- Sorkin, B. C., Hoffman, S., Edelman, G. M., & Cunningham, B. A. (1984). Sulfation and phosphorylation of the neural cell adhesion molecule, N-CAM. *Science*, 225(4669), 1476-1478.
- Stork, O., Welzl, H., Wolfer, D., Schuster, T., Mantei, N., Stork, S., . . . Schachner, M. (2000). Recovery of emotional behaviour in neural cell adhesion molecule (NCAM) null mutant mice through transgenic expression of NCAM180. *Eur J Neurosci*, 12(9), 3291-3306.

- Stummeyer, K., Dickmanns, A., Mühlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R., & Ficner, R. (2005). Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F. *Nat Struct Mol Biol*, 12(1), 90-96.
- Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., . . . Record, M. (2010). Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res*, 51(8), 2105-2120.
- Sytnyk, V., Leshchyns'ka, I., Delling, M., Dityateva, G., Dityatev, A., & Schachner, M. (2002). Neural cell adhesion molecule promotes accumulation of TGN organelles at sites of neuron-to-neuron contacts. *J Cell Biol*, 159(4), 649-661.
- Szajnik, M., Derbis, M., Lach, M., Patalas, P., Michalak, M., Drzewiecka, H., . . . Whiteside, T. L. (2013). Exosomes in Plasma of Patients with Ovarian Carcinoma: Potential Biomarkers of Tumor Progression and Response to Therapy. *Gynecol Obstet (Sunnyvale)*, Suppl 4, 3.
- Tanaka, Y., Kamohara, H., Kinoshita, K., Kurashige, J., Ishimoto, T., Iwatsuki, M., . . . Baba, H. (2013). Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*, 119(6), 1159-1167.
- Tauro, B. J., Greening, D. W., Mathias, R. A., Mathivanan, S., Ji, H., & Simpson, R. J. (2013). Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon carcinoma cell-derived organoids. *Mol Cell Proteomics*, 12(3), 587-598.
- Taylor, D. D., & Gercel-Taylor, C. (2008). MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 110(1), 13-21.
- Thimon, V., Frenette, G., Saez, F., Thabet, M., & Sullivan, R. (2008). Protein composition of human epididymosomes collected during surgical vasectomy reversal: a proteomic and genomic approach. *Hum Reprod*, 23(8), 1698-1707.
- Thomas, G. M., Carbo, C., Curtis, B. R., Martinod, K., Mazo, I. B., Schatzberg, D., . . . Wagner, D. D. (2012). Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. *Blood*, 119(26), 6335-6343.
- Thompson, L. A., Barratt, C. L., Bolton, A. E., & Cooke, I. D. (1992). The leukocytic reaction of the human uterine cervix. *Am J Reprod Immunol*, 28(2), 85-89.
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 3, Unit 3.22.
- Tohme, S., Yazdani, H. O., Al-Khafaji, A. B., Chidi, A. P., Loughran, P., Mowen, K., . . . Tsung, A. (2016). Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. *Cancer Res*, 76(6), 1367-1380.
- Trams, E. G., Lauter, C. J., Salem, N., & Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 645(1), 63-70.
- Ulm, C. (2012). *Identifizierung und Charakterisierung der biologischen Funktion von PolySia-NCAM in humanem Lungengewebe*. (1. Aufl. ed.). Giessen: Lauferweiler.
- Ulm, C., Saffarzadeh, M., Mahavadi, P., Müller, S., Prem, G., Saboor, F., . . . Galuska, S. P. (2013). Soluble polysialylated NCAM: a novel player of the innate immune system in the lung. *Cell Mol Life Sci*, 70(19), 3695-3708.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9(6), 654-659.
- van den Berg, Y. W., Osanto, S., Reitsma, P. H., & Versteeg, H. H. (2012). The relationship between tissue factor and cancer progression: insights from bench and bedside. *Blood*, 119(4), 924-932.
- van der Pol, E., Böing, A. N., Harrison, P., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2012). Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev*, 64(3), 676-705.
- van der Poll, T., & Herwald, H. (2014). The coagulation system and its function in early immune defense. *Thromb Haemost*, 112(4), 640-648.
- Van Deun, J., Mestdagh, P., Agostinis, P., Akay, Ö., Anand, S., Anckaert, J., . . . Consortium, E.-T. (2017). EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nat Methods*, 14(3), 228-232.
- Varbanov, H., & Dityatev, A. (2016). Regulation of extrasynaptic signaling by polysialylated NCAM: Impact for synaptic plasticity and cognitive functions. *Mol Cell Neurosci*.
- Vella, L. J., Sharples, R. A., Lawson, V. A., Masters, C. L., Cappai, R., & Hill, A. F. (2007). Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol*, 211(5), 582-590.

- Vitkov, L., Klappacher, M., Hannig, M., & Krautgartner, W. D. (2009). Extracellular neutrophil traps in periodontitis. *J Periodontol Res*, 44(5), 664-672.
- Vlassov, A. V., Magdaleno, S., Setterquist, R., & Conrad, R. (2012). Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*, 1820(7), 940-948.
- von Bruhl, M. L., Stark, K., Steinhart, A., Chandraratne, S., Konrad, I., Lorenz, M., . . . Massberg, S. (2012). Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*, 209(4), 819-835.
- von Der Ohe, M., Wheeler, S. F., Wuhrer, M., Harvey, D. J., Liedtke, S., Muhlenhoff, M., . . . Schachner, M. (2002). Localization and characterization of polysialic acid-containing N-linked glycans from bovine NCAM. *Glycobiology*, 12(1), 47-63.
- Wang, X., Chow, R., Deng, L., Anderson, D., Weidner, N., Godwin, A. K., . . . Varki, N. (2011). Expression of Siglec-11 by human and chimpanzee ovarian stromal cells, with uniquely human ligands: implications for human ovarian physiology and pathology. *Glycobiology*, 21(8), 1038-1048.
- Wang, X., Li, X., Zeng, Y. N., He, F., Yang, X. M., & Guan, F. (2016). Enhanced expression of polysialic acid correlates with malignant phenotype in breast cancer cell lines and clinical tissue samples. *Int J Mol Med*, 37(1), 197-206.
- Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., . . . Coonrod, S. A. (2009). Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*, 184(2), 205-213.
- Wang, Y., & Neumann, H. (2010). Alleviation of neurotoxicity by microglial human Siglec-11. *J Neurosci*, 30(9), 3482-3488.
- Werneburg, S., Buettner, F. F., Erben, L., Mathews, M., Neumann, H., Muhlenhoff, M., & Hildebrandt, H. (2016). Polysialylation and lipopolysaccharide-induced shedding of E-selectin ligand-1 and neuropilin-2 by microglia and THP-1 macrophages. *Glia*, 64(8), 1314-1330.
- Wildhagen, K. C., García de Frutos, P., Reutelingsperger, C. P., Schrijver, R., Aresté, C., Ortega-Gómez, A., . . . Nicolaes, G. A. (2014). Nonanticoagulant heparin prevents histone-mediated cytotoxicity in vitro and improves survival in sepsis. *Blood*, 123(7), 1098-1101.
- Wildhagen, K. C., Wiewel, M. A., Schultz, M. J., Horn, J., Schrijver, R., Reutelingsperger, C. P., . . . Nicolaes, G. A. (2015). Extracellular histone H3 levels are inversely correlated with antithrombin levels and platelet counts and are associated with mortality in sepsis patients. *Thromb Res*, 136(3), 542-547.
- Yabe, U., Sato, C., Matsuda, T., & Kitajima, K. (2003). Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. *J Biol Chem*, 278(16), 13875-13880.
- Yamada, T., Inoshima, Y., Matsuda, T., & Ishiguro, N. (2012). Comparison of methods for isolating exosomes from bovine milk. *J Vet Med Sci*, 74(11), 1523-1525.
- Yoshioka, Y., Kosaka, N., Konishi, Y., Ohta, H., Okamoto, H., Sonoda, H., . . . Ochiya, T. (2014). Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat Commun*, 5, 3591.
- Yousefi, S., Gold, J. A., Andina, N., Lee, J. J., Kelly, A. M., Kozlowski, E., . . . Simon, H. U. (2008). Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med*, 14(9), 949-953.
- Zawrotniak, M., & Rapala-Kozik, M. (2013). Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta Biochim Pol*, 60(3), 277-284.
- Zerwas, M., Trouche, S., Richetin, K., Escudé, T., Halley, H., Gerardy-Schahn, R., . . . Rampon, C. (2016). Environmental enrichment rescues memory in mice deficient for the polysialyltransferase ST8SialV. *Brain Struct Funct*, 221(3), 1591-1605.
- Zhang, H. G., & Grizzle, W. E. (2011). Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression. *Clin Cancer Res*, 17(5), 959-964.
- Zhang, H. G., & Grizzle, W. E. (2014). Exosomes: a novel pathway of local and distant intercellular communication that facilitates the growth and metastasis of neoplastic lesions. *Am J Pathol*, 184(1), 28-41.
- Zhang, T., Zhou, S., Hu, L., Peng, B., Liu, Y., Luo, X., . . . Deng, Y. (2016). Polysialic acid-modifying liposomes for efficient delivery of epirubicin, in-vitro characterization and in-vivo evaluation. *Int J Pharm*, 515(1-2), 449-459.

- Zhao, Z., Yang, Y., Zeng, Y., & He, M. (2016). A microfluidic ExoSearch chip for multiplexed exosome detection towards blood-based ovarian cancer diagnosis. *Lab Chip*, 16(3), 489-496.
- Zheng, X., Chen, F., Zhang, J., Zhang, Q., & Lin, J. (2014). Exosome analysis: a promising biomarker system with special attention to saliva. *J Membr Biol*, 247(11), 1129-1136.
- Zlatina, K., Lutteke, T., & Galuska, S. P. (2017). Individual Impact of Distinct Polysialic Acid Chain Lengths on the Cytotoxicity of Histone H1, H2A, H2B, H3 and H4. *Polymers*, 9(12), 720.
- Zlatina, K., Saftenberger, M., Kuhnle, A., Galuska, C. E., Gartner, U., Rebl, A., . . . Galuska, S. P. (2018). Polysialic Acid in Human Plasma Can Compensate the Cytotoxicity of Histones. *Int J Mol Sci*, 19(6).
- Zuber, C., Lackie, P. M., Catterall, W. A., & Roth, J. (1992). Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. *J Biol Chem*, 267(14), 9965-9971.

11 Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit

Zlatina, K., Saftenberger, M., Kuhnle, A., Galuska, C. E., Gartner, U., Rebl, A., Galuska, S. P. (2018). Polysialic Acid in Human Plasma Can Compensate the Cytotoxicity of Histones. *Int J Mol Sci*, 19(6).

Kühnle, A., Veelken, R., Galuska, C. E., Saftenberger, M., Verleih, M., Schuppe, H. C., Galuska, S. P. (2019). Polysialic acid interacts with lactoferrin and supports its activity to inhibit the release of neutrophil extracellular traps. *Carbohydr Polym*, 208, 32-41.

12 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Im Laufe einer Dissertation kommt man unweigerlich an Punkte, an denen ohne das Wissen und die Unterstützung anderer und ohne ein verständnisvolles, konstruktives Mentoring sowie ein hilfsbereites und motiviertes Team ein Ende der Arbeit nicht zu erreichen ist.

Deshalb bin ich umso glücklicher, dass ich genau diese Voraussetzungen bei meinem Doktorvater PD Dr. Sebastian Galuska und seiner Frau Dr. Christina Galuska gefunden habe. Durch eure positive und gewinnende Art habe ich mich an mein Promotionsvorhaben gewagt und bin dank eurer Unterstützung und durch das großartige Motivationsvermögen von Sebastian immer gerne in den Keller des biochemischen Institutes gekommen, um weiter an diesem zu arbeiten.

Besonderen Dank an Christina Galuska die mich bei der technischen Hürde der HPLC hervorragend unterstützt hat und somit meine Dissertation um eine spannende Facette erweitert und abgerundet hat.

Miriam, Werner, Sigg und Christina Ulm möchte ich für die gute Einarbeitung und Geduld bei den ersten Schritten im Labor danken und ohne deren Arbeitseinsatz und Organisationstalent ein Labornovize wie ich im Chaos untergegangen wäre.

Sebastian, David und Rhea möchte ich für die herausfordernde, arbeitsintensive aber immer auch spannende, lustige und vor allem abwechslungsreiche Zeit danken, die aus Laborpartnern auch gute Freunde hat werden lassen, die ich auf keinen Fall missen möchte.

Ein großer Dank geht an Rebecca, die nicht nur den Feinschliff dieser Arbeit überwacht und korrigiert hat, sondern auch die täglichen Herausforderungen des Lebens mit mir angeht und meistert.

Außerdem gebührt tiefster Dank meinen beiden Eltern. Ich hätte keine der obigen Zeilen zu Papier bringen können, ohne die grenzenlose, liebevolle Unterstützung durch euch. Vielen Dank, dass ich in euch Vorbilder gefunden habe, die mich zu Leistungen und Zielen motiviert hat, die ich allein nicht in mir gefunden hätte. Ich verdanke euch alles.

