

„Entwicklung von chemisch polysialylierten Makromolekülen zum potenziellen Einsatz
gegen zytotoxische extrazelluläre Histone und Nukleosomen.“

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von:

Dambon, Jan Andreas
aus Oppeln (PL)

Gießen, 2020

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

und

aus der Abteilung für Reproduktionsbiologie
des Leibniz Institut für Nutztierbiologie
in Dummerstorf

Gutachter: PD Dr. Sebastian P. Galuska
Gutachter: Prof. Dr. Ralph Schermuly

Tag der Disputation: 09.03.2021

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Sialinsäuren	1
1.1.1 Natürliches Vorkommen und Funktion.....	1
1.1.2 Struktur der Sialinsäuren.....	3
1.1.3 Polysialinsäuren - PolySia.....	5
1.2 (Poly-)Sialylierung	8
1.3 Neutrophile Granulozyten	12
1.3.1 Abwehrmechanismen von Neutrophilen Granulozyten	12
1.3.2 Neutrophile extrazelluläre Fallen	14
1.3.3 NET-assoziierte Pathologien.....	18
2 Zielsetzung.....	20
3 Material	21
3.1 Chemikalien.....	21
3.2 Antikörper.....	22
3.3 Zelllinie.....	22
3.4 Geräte & Software	23
3.5 Verbrauchsmaterialien.....	24
4 Methoden	25
4.1 Sialinsäureanalytik und Glycoengineering.....	25
4.1.1 Quantifizierung von Sialinsäuren mittels HPLC.....	25
4.1.2 C7/C9-Methode nach Sato	27
4.1.3 Reduktive Aminierung von Sialinsäuren mit Proteinen bzw. Nanopartikeln	29
4.2 Proteinanalytik.....	30

4.2.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	30
4.2.2	SDS-PAGE.....	31
4.2.3	Western Blot.....	32
4.2.4	Immunfärbung und Entwicklung der Western Blots.....	32
4.3	Zytotoxizitätsassays.....	33
4.4	Statistische Auswertung	34
5	Ergebnisse	35
5.1	Nachweis der Oxidation mittels C7/C9-Methode nach Sato.....	35
5.2	Nachweis polysialylierter Proteine im Western Blot	37
5.3	Sialyierungsgehalt der Proteine	38
5.4	Reduktion der Zytotoxizität durch PolySia	40
5.5	Polysialylierung von Nanopartikel	43
6	Diskussion.....	47
6.1	Ergebnisbezogene Diskussion	47
6.2	Limitationen und methodische Einschränkungen.....	51
6.3	Ausblick.....	54
7	Zusammenfassung.....	55
8	Abstract	56
9	Anhang.....	57
9.1	Abbildungsverzeichnis	57
9.2	Tabellenverzeichnis	58
9.3	Literaturverzeichnis	58
10	Publikation in Zusammenhang mit dieser Arbeit.....	71
11	Danksagung.....	72
12	Erklärung zur Dissertation	73

Abkürzungsverzeichnis

ANCAs	antineutrophil cytoplasmatic antibodies
CD	cluster of differentiation
COVID-19	Coronavirus-Krankheit-2019
DP	degree of polymerization
E.coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPO	Erythropoetin
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Horseradish peroxidase
KDN	Ketodesoxynonosäure
LPS	Lipopolysaccharid
Ly _{Sia} [%]	prozentualer Anteil potenziell sialylierter Lysinreste
MPO	Myeloperoxidase
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
NCAM	neural cell adhesion molecule
NE	Neutrophile Elastase
NET	neutrophile extrazelluläre Fallen
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	N-Glycolylneuraminsäure
PEG	Polyethylenglykol
pK _s	Säurekonstante
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PolySia	Polysialinsäure
PR3	Proteinkinase 3
PVDF	Polyvinylidendifluorid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
sia ^o	Sialylierungsgrad in [mol Sia] / [mol Transferrin]

SynCAM-1	synaptic cell adhesion molecule
TLR	Toll-like Rezeptor
β-HCG	humanes Choriongonadotropin

1 Einleitung

1.1 Sialinsäuren

1.1.1 Natürliches Vorkommen und Funktion

Das natürliche Vorkommen von Sialinsäuren umfasst eine umfangreiche Spanne an Lebewesen, beginnend bei Einzellern wie Bakterien bis hin zu höher entwickelten Wirbeltieren. Diese vielfältige Zuckerfamilie spielt eine wesentliche Rolle bei interzellulären Kommunikations- und Erkennungsprozesse, Zellentwicklung, Kontrolle der Lebensspanne von Glykokonjugaten, Steuerung bakterieller und viraler Infektion, in der Immunologie, bei Ausbildung des Mikrobioms sowie bei Tumorentwicklung und Metastasierung gleichwohl wie in der Neuro- und Reproduktionsbiologie (Schauer und Kamerling 2018).

Die namensgebende Erstbeschreibung der Sialinsäuren gelang bei Untersuchungen bestimmter Glykoproteinen des Speichels Ende der 1930er Jahre, den sog. Mucinen (von griech. *Sialos* - Speichel) (Lundblad 2015). Darüber hinaus können mittlerweile zahlreiche weitere Hormone und Enzyme den Sialoproteinen zugeordnet werden. Hierzu zählen beispielsweise das Erythropoetin (EPO) (Werner et al. 2012), das Follikel-stimulierende Hormon (FSH) (Ulloa-Aguirre et al. 1999) oder auch das humane Choriongonadotropin (β -HCG) (Ulloa-Aguirre et al. 2001).

In der Natur nehmen Sialinsäuren fast ausschließlich das terminale Ende glykosylierter Proteine und Lipide ein. Neben dem humoralen Vorkommen stellt die Glykokalyx an der Oberfläche von Zellmembranen die größte Verbreitung von sialylierten Proteinen dar (Varki 2011). Hier nehmen die Sialinsäuren durch ihre exponierte Lokalisation mitunter maßgeblich bei interzellulären Erkennungsprozessen teil (Varki 2017a).

Die Funktionen der Sialinsäure lassen sich somit grundlegend durch zwei Charakteristika erklären: ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften sowie ihrer Lokalisation.

Durch die negative Ladung der anionischen Moleküle besteht unter den Sialinsäuren eine natürliche Abstoßungstendenz. In der Hauptfraktion der Glykoproteine des Mucus

(Mucine) hat dies zur Folge, dass eine Agglutination verhindert und ihre gestreckte Form beibehalten werden kann. Die resultierende Viskosität ist unabdingbar für die Funktion als Schutzstoff, Feuchtigkeitsträger und Gleitmittel der Glykoprotein-Lösung (Sandberg et al. 2009; Zalewska et al. 2000). Ebenso dient die negative Ladung der Bindung und dem Transport kationischer Substanzen.

Durch die Lokalisation am terminalen Ende sialylierter Glykoproteine/-lipide der Glykokalyx resultiert eine wichtige Funktion der Sialinsäuren bei interzellulären und humoralen Erkennungsprozessen (Schauer 2004; Varki und Varki 2007). Bei Säugetieren sind verschiedene Biomoleküle dazu in der Lage, immunologische Mechanismen zu modulieren. Da alle Zellen von einer Schicht aus Glykoproteinen und -lipiden umgeben sind – der Glykokalyx –, spielen Glykan-vermittelte Mechanismen eine entscheidende Rolle bei Prozessen der angeborenen und adaptiven Immunantwort (Varki 2017a; Varki et al. 2017b) (s. Abbildung 1).

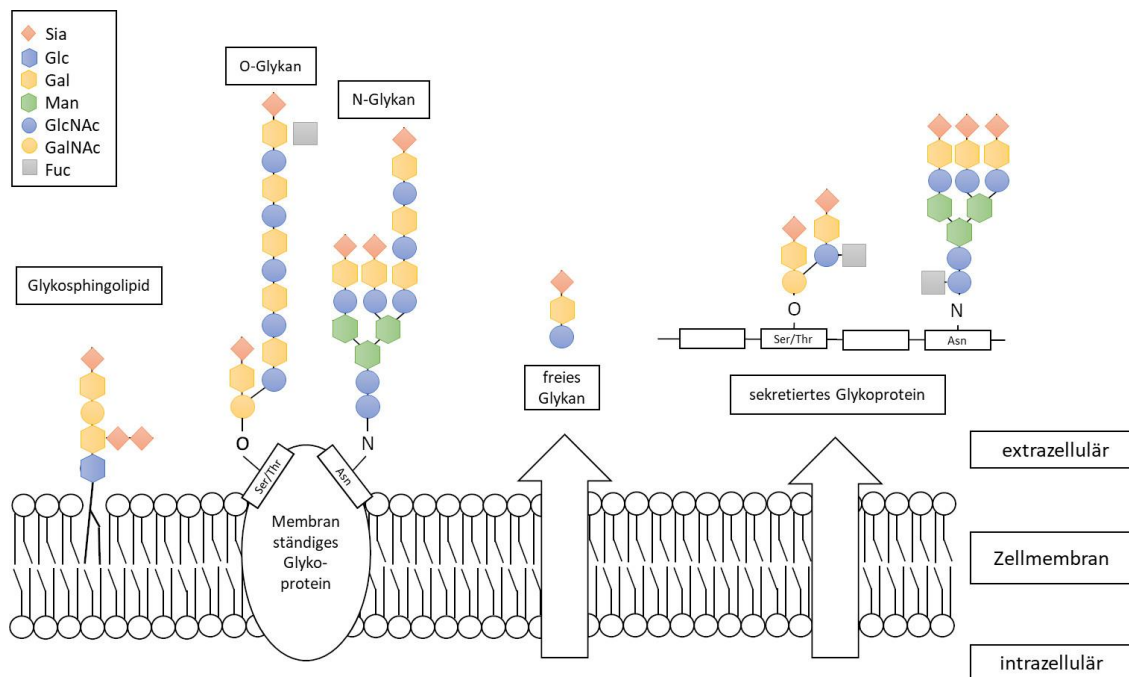


Abbildung 1: terminale Sialinsäure-Monomere in der Glykokalyx.

Das natürliche Vorkommen terminaler Sialinsäuren (rote Rauten) in der Glykokalyx umfasst Glykosphingolipide, membranständige oder sekretierte Glykoproteine über O-glykosidische Verbindungen mit Serin oder Threonin (Ser/Thr) bzw. N-glykosidische Verbindungen mit Asparagin (Asn) sowie freie Glykane.

1.1.2 Struktur der Sialinsäuren

Sialinsäuren gehören zu einer großen Familie saurer Monosaccharide, deren Mitglieder alle N- bzw. O-Derivate der Neuraminsäure sind. Bei der Neuraminsäure (5-Amino-3,5-Dideoxy-D-Glycero-D-Galacto-non-2-ulosonsäure) handelt es sich um einen Aminozucker, welcher sich strukturell als α -Ketosäure mit einem C₉-Grundgerüst charakterisieren lässt (Varki et al. 2017b; Sato et al. 1993).

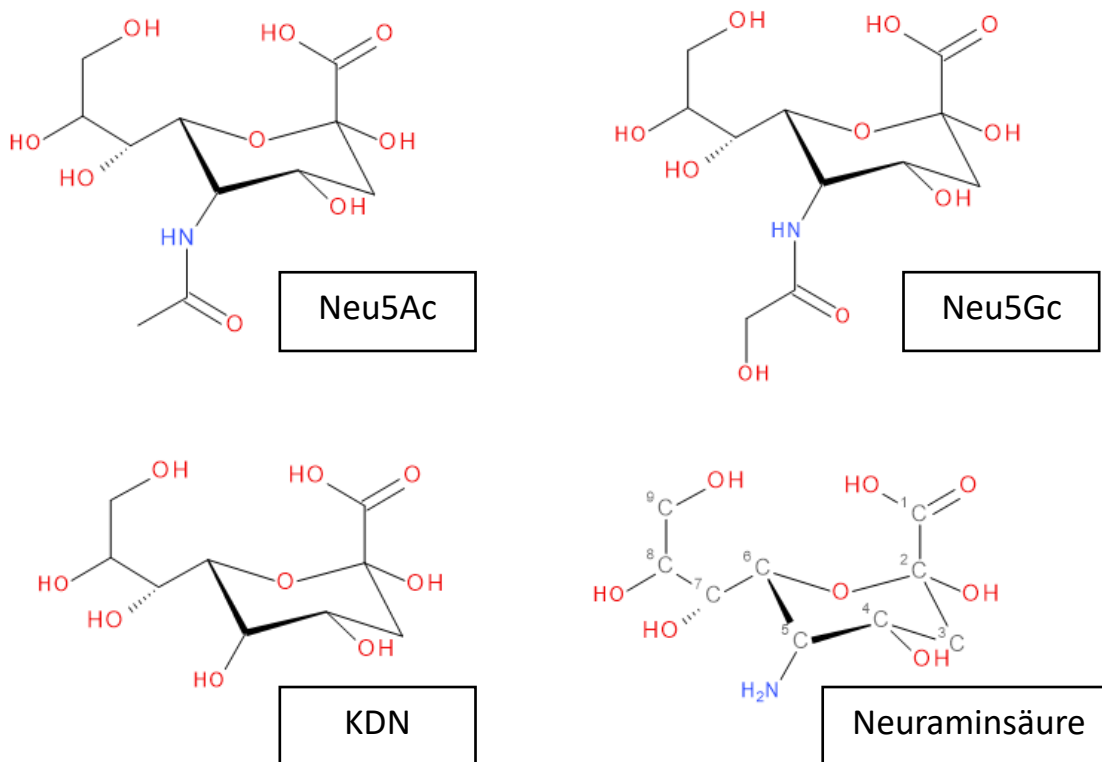


Abbildung 2: Sialinsäure-Monomere

Die beim Menschen am häufigsten vorkommenden Sialinsäure-Monomere sind N-Acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac), N-Glycolyl-Neuraminsäure (Neu5Gc) sowie Ketodesoxyxynulosonsäure (KDN). Sie leiten sich chemisch von der Sialinsäure Neuraminsäure ab.

Die Sialinsäuren kommen natürlich nur als N-Acyl-Derivat oder als O-Glykosid der Neuraminsäure vor. Durch die Ausbildung von zyklischen Halbacetalen liegen N-acylierte Neuraminsäuren gewöhnlich in Pyranoseform vor.

In wässriger Lösung nehmen Sialinsäuren eine C5-Sesselkonformation ein. Diese Konformation wird durch die zahlreichen intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den C7- und C8-Hydroxylgruppen stabilisiert.

Die C1-Carboxylgruppe liegt den sauren Moleküleigenschaften zugrunde ($pK_s = 2,6$ für N-Acetyl-Neuraminsäure). Unter physiologischen Bedingungen liegen die Sialinsäuren deprotoniert als Carboxylat-Anion vor. Hieraus resultiert die negative Gesamtladung der Monomere. Die häufigsten vorkommenden Sialinsäuren beim Menschen sind N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) sowie Ketodesoxyonulosonsäure (KDN) (Varki et al. 2017b) (s. Abbildung 2).

Das beschriebene Grundgerüst stellt gleichwohl die Voraussetzung für posttranslationale Modifikationen dar. Insbesondere die Hydroxylgruppen der Glycerinseitenkette (C7-C9) weisen in der Regel zusätzliche Substituenten auf; hierunter sind O-Acetyl-, O-Methyl-, O-Lactyl- und O-Sulfat-Gruppen (Varki et al. 2017b). Die häufigste Modifikation ist die Bildung von O-Acetyl-Estern an C4 oder den Hydroxylgruppen der Glycerinseitenkette (C7, C8, C9) (Schauer und Kamerling 2018). Diese Modifikationen an den funktionellen Gruppen ergeben eine beachtliche Vielfalt dieser Moleküle.

Eine weitere Möglichkeit der Modifikation stellt die Verknüpfung mit weiteren Sialinsäuren zu Oligo- und Polymeren dar. Bei einer Kettenlänge (DP, von engl. *degree of polymerization*) von zwei Sialinsäure-Monomeren spricht man von Dimeren, wohingegen es sich bei einer $DP = 3 - 7$ um Oligomere und ab einer $DP \geq 8$ um Polymere handelt (Sato und Kitajima 2013). Die posttranslationale Modifikation der funktionellen Gruppen potenziert sich mit aufsteigender Kettenlänge. Hierdurch entsteht eine natürliche Diversität durch die unterschiedlichen Bindungsmöglichkeiten (Varki et al. 2017b).

Der enzymatische Abbau der Sialinsäure-Polymere wird durch das Enzym Neuraminidase (Sialidase) hydrolysiert. Dabei handelt es sich um eine α -Exo-Sialidase, welche am nicht-reduzierenden Ende eines Polysaccharids die Sialinsäuren abspaltet (s. Abbildung 5) (Varki et al. 2017b; Bonten et al. 1996).

Die Funktionen der Sialinsäuren sind nicht abschließend geklärt. Ein Vertreter dieser Zuckerfamilie besticht jedoch durch ein außergewöhnliches Potential - die Polysialinsäure (PolySia).

1.1.3 Polysialinsäuren - PolySia

Eine besondere Subpopulation der Sialinsäuren stellen deren Polymere dar. Es handelt sich bei Säugern um Homo-Polymere ($DP \geq 8$) aus α -2,8-verknüpften Neu5Ac-Resten (s. Abbildung 3).

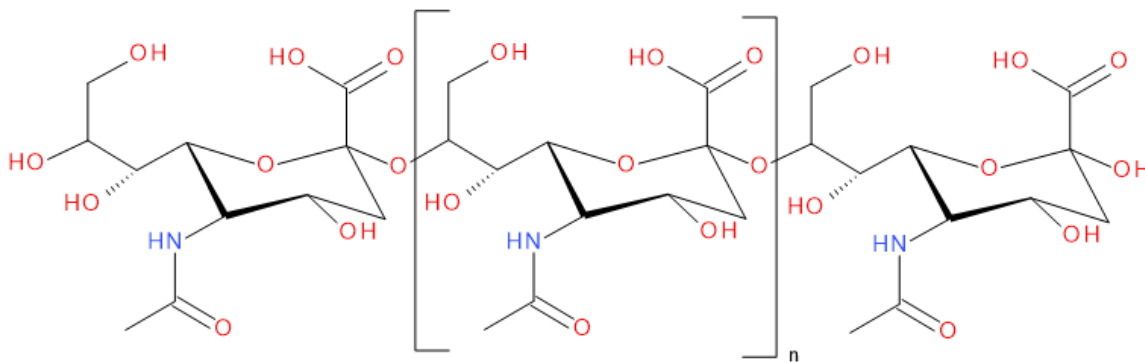


Abbildung 3: chemische Struktur von PolySia

Dargestellt ist die chemische Struktur von PolySia am Beispiel von α -2,8-verknüpften Neu5Ac, die Kettenlänge entspricht $DP = n+2$.

Die Erstbeschreibung von PolySia gelang 1957 Barry et al. bei der Betrachtung der neuroinvasiven *E.coli*-Isolate K-1 und K-235. Hierbei wurde das kapselständige Polysaccharid mit einer $DP > 200$ Sialinsäure-Monomeren identifiziert und in Anlehnung an das Bakterium Colominsäuren benannt (Barry und Goebel 1957).

Darauffolgend wurden in den Kapseln diverser Prokaryonten wie *Neisseria meningitidis* oder *Legionella pneumophili* gleichfalls PolySia gefunden. Mittlerweile ist bekannt, dass viele Bakterien Zellwand-adhärenente PolySia nutzen, um einer Detektion des Immunsystems zu entgehen. Bakterielle PolySia zeigen sich für eine Markierung durch niedrig-affine Antikörper reaktionsträge. Diese Eigenschaft prädisponiert sie ebenso zur therapeutischen

Nutzung wie bspw. zur Glykosylierung von Proteinen zur Verbesserung ihrer pharmakologischen Eigenschaften (s. (Poly-)Sialylierung) (Mazmanian et al. 2005).

Neben interzellulären Interaktionen werden dem kapselständigen Molekül auch Abwehrfunktionen zugeschrieben. Es überrascht nicht, dass eine Vielzahl an Pathogenen Mechanismen entwickelt hat, die auf eine Schädigung dieser Moleküle abzielen.

Beispielsweise bilden Bakteriophagen, welche PolySia-exprimierende Bakterien angreifen speziell hierfür Endoneuraminidasen, welche bei PolySia zu internen Kettenbrüchen führen (Kwiatkowski et al. 1982; Gerardy-Schahn et al. 1995).

Mittlerweile sind auch bei Säugetieren disjunkte Vorkommen polysialylierter Moleküle bekannt, deren Funktion noch nicht abschließend geklärt ist:

- NCAM im zentralen Nervensystem sowie Spermien von Säugetieren (Simon et al. 2013; Simon et al. 2015; Ulm et al. 2013; Galuska et al. 2017b)
- ein Natriumkanal im Gehirn von Ratten (Zuber et al. 1992)
- CD36 in muriner und humaner Milch (Yabe et al. 2003)
- Neuropillin-2 auf dendritischen Zellen, Makrophagen und Mikroglia (Ulm et al. 2013; Curreli et al. 2007; Werneburg et al. 2015; Stamatou et al. 2014)
- C-C Chemokinrezeptor 7 (CCR7) auf dendritischen Zellen (Kiermaier et al. 2016)
- SynCAM-1 auf Polydendrozyten NG2 in postnatalen Mäusegehirn (Werneburg et al. 2015; Galuska et al. 2010b; Rollenhagen et al. 2012)
- E-selectin Ligand-1 auf Mikroglia und Makrophagen (Werneburg et al. 2016)

Bei allen o.g. PolySia lässt sich eine α -2,8-glykosidische Bindung nachweisen (Suzuki et al. 2003). Diese flexible Bindung wird abseits der Kettenlänge für die Diversität der Bindungspartner für PolySia verantwortlich gemacht. Die Generierung von PolySia an Trägermolekülen erfolgt als posttranslationale Modifikation mittels zweier Polysialyltransferasen (ST8SiaII & ST8SiaIV) (Li und Chen 2012; Mühlhoff et al. 1998). Äquivalent zu den Sialinsäure-Monomeren handelt es sich bei PolySia um stark polyanionische Zuckermoleküle. Die negative Gesamtvalenz dieser Polymere führt zu einer intermolekularen elektrostatischen Abstoßung (Brusés und Rutishauser 2001). Diese anti-

adhäsiven Eigenschaften werden hinsichtlich der Organogenese und Immunmodulation mit unterschiedlichen Migrations- bzw. Differenzierungsprozessen in Verbindung gebracht (Hromatka et al. 2013; Drake et al. 2008; Drake et al. 2009). Es wurden bereits Zusammenhänge für die Entwicklung von Herz, Leber und Gehirn aufgezeigt (Galuska et al. 2017b; Reyes et al. 1991). Eines der bestuntersuchten polysialylierten Molekül stellt das *neural cell adhesion molecule* dar – kurz NCAM (s. Abbildung 4).

Hierbei dient die Polysialylierung der Ausbildung und -reifung der Plastizität des zentralen Nervensystems durch unterschiedliche Modulation von Zell-Zell-Interaktionen (Schnaar et al. 2014). Die natürliche Adhärenz von NCAM wird hierbei durch PolySia in eine Abstoßungstendenz konvertiert (Varki et al. 2017b). Die Tragweite dieser posttranslationalen Modifikation wird im Knock-Out-Modell deutlich. Bei genetischer Deletion der Sialotransferasen mit konsekutivem Ausbleiben einer Polysialylierung von NCAM resultieren schwerwiegende neurale Entwicklungsdefizite mit frühzeitigem Tod bei Mäusen (Weinhold et al. 2005).

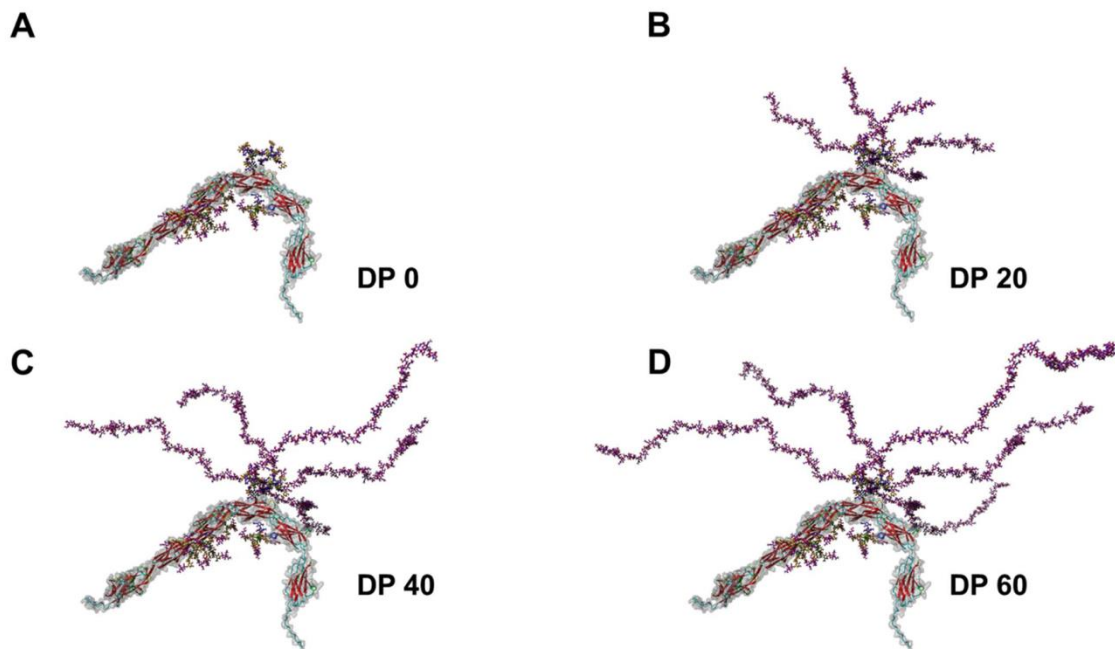


Abbildung 4: polysialyliertes NCAM

Model des polysialylierten NCAM (grau) mit unterschiedlich langen PolySia-Ketten, DP = 0 / 20 / 40 / 60 Neu5Ac-Einheiten (lila), Abbildung aus (Galuska et al. 2017b), CC BY.

Neben den Zell-adhärenenten Vorkommen ist die Funktion der humoralen PolySia-Vorkommen in Blut, Milch & Ejakulat nicht abschließend geklärt (Galuska et al. 2017b). Bezüglich des Vorkommens in Blut und Ejakulat wurde bereits eine zytoprotektive Funktion gegenüber extrazellulären Histonen diskutiert.

1.2 (Poly-)Sialylierung

Die natürliche oder artifizielle Bindung von (Poly-)Sialinsäuren an Trägermoleküle wird als (Poly-)Sialylierung bezeichnet.

Die artifizielle Sialylierung von Proteinen wird – angelehnt an die PEGylierung¹ – pharmakologisch zur Verbesserung ihrer Stabilität und pharmakokinetischen Eigenschaften durchgeführt (Constantinou et al. 2009; Gregoriadis et al. 2000; Fernandes und Gregoriadis 1997, 1996; Jain et al. 2003). Insbesondere das geringe Akkumulationspotential und die geringe Immunogenität sind ausschlaggebend für die pharmakologische Nutzung der Sialylierung (Gregoriadis et al. 1993; Mandrell und Zollinger 1982). So konnten bereits für eine Vielzahl von Proteinen erfolgreiche Sialylierungen *in vitro* durchgeführt und *in vivo* getestet werden (Bork et al. 2009).

Methodisch ergeben sich einige Herausforderungen bei der kovalenten Kopplung der Sialinsäuren an Trägermoleküle. Vorrangig ist hier der enzymatische Abbau zu nennen. Analog zu den Sialinsäure-Monomeren erfolgt dieser am nicht-reduzierenden Ende einer endständigen Sialinsäure der Polymerkette durch die Neuraminidase (Smutova et al. 2014; Bonten et al. 1996).

Um eine langfristige kovalente Bindung von PolySia an Trägermoleküle gewährleisten zu können, ist es notwendig, diese vor dem natürlichen Enzymabbau zu schützen. Die Sialidasen besitzen eine hohe Substratspezifität für das nicht-reduzierende Ende der terminalen Sialinsäure-Monomere (Bonten et al. 1996; Monti et al. 2010).

¹ Konjugation von Therapeutika mit Polyethylenglykol (PEG) zur sterischen Hinderung des Abbaus durch Blutbestandteile

Eine effektive Methode, um diesem Umstand zu begegnen, ist die Maskierung des nicht-reduzierenden Endes durch Konjugation der Sialinsäuren an Selbigem. Dies gelingt durch Oxidation und anschließende reduktive Aminierung (s. Reduktive Aminierung von Sialinsäuren mit Proteinen bzw. Nanopartikeln). Das somit exponierte reduzierende Ende bietet kein Ziel für den enzymatischen Abbau der Sialidasen (s. Abbildung 5) (Galuska et al. 2017c). Darüber hinaus ist bei diesem Verfahren von großen Vorteil, dass die molekulare Struktur des restlichen Sialinsäurepolymers weitgehend unangetastet bleibt.

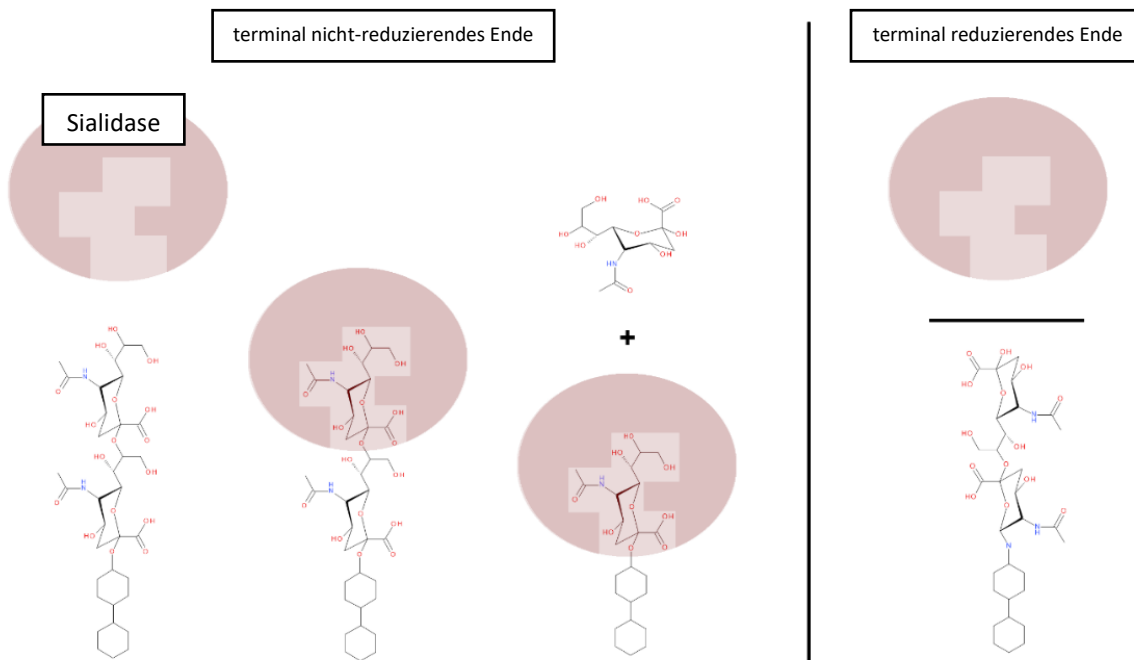


Abbildung 5: Enzymabbau terminaler Sialinsäuren durch Sialidasen

Substratspezifische enzymatische Spaltung der terminalen Sialinsäure-Monomere einer Polysaccharidkette durch die Sialidase (rosa); (links) uneingeschränkt bei terminal nicht-reduzierendem Ende; (rechts) eingeschränkt bei terminal reduzierendem Ende der Sialinsäure.

Neben der beschriebenen Glykokonjugation zur Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften sind PolySia darüber hinaus dazu in der Lage, in bestimmten Fällen zytoprotektiv zu wirken.

Die richtungsweisende Entdeckung dieses zytoprotektiven Potentials gelang bei der Untersuchung von Histon-vermittelter Zytotoxizität (Saffarzadeh et al. 2012). Extrazelluläre Histone werden als Mediatoren für den Zelltod in der Sepsis sowie vielen Autoimmunerkrankungen verantwortlich gemacht (Xu et al. 2009). Eine Reduktion eben dieser Histon-abhängigen Zytotoxizität durch PolySia eröffnete einen neuen Spielraum für die therapeutische Nutzung der Sialylierung (Zlatina et al. 2018).

In den folgenden Untersuchungen konnten bedeutende Rückschlüsse auf die zytoprotektiven Eigenschaften gezogen werden. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der Histon-vermittelten Zytotoxizität durch PolySia sowie darüber hinaus eine Abhängigkeit von der Kettenlänge der Polymere (Galuska et al. 2017c).

Diese Erkenntnisse legten die Vermutung nahe, dass sich durch Akkumulation von Polysialinsäuren an Trägermolekülen der zytoprotektive Effekt potenzieren ließe. Mittels gezielter Elongation natürlich vorkommender Sialinsäuren am Beispiel der Mucine konnte diese Vermutung bestätigt werden (s. Abbildung 6) (Galuska et al. 2017c; Bornhöfft et al. 2019). Solche polysialylierten Glykokonjugate könnten auch ihren Einsatz zur Inaktivierung von Histonen aus neutrophilen extrazellulären Fallen finden. Diese werden ausführlich in den folgenden Abschnitten thematisiert (s. Neutrophile extrazelluläre Fallen).

Der Interaktion von PolySia mit Histonen wurde des Weiteren besondere Beachtung geschenkt. Wichtige Hinweise bezüglich der Histon-vermittelten Zytotoxizität konnten durch Untersuchung der einzelnen Histon-Fraktionen (H1, H2A, H2B, H3, H4) erlangt werden (Zlatina et al. 2017; Zlatina und Galuska 2019; Zlatina et al. 2018). Hierbei wurde aufgrund der Zytotoxizitätskompensation durch PolySia eine therapeutische Anwendung zur Akkumulation an Histonen diskutiert (Zlatina et al. 2017).

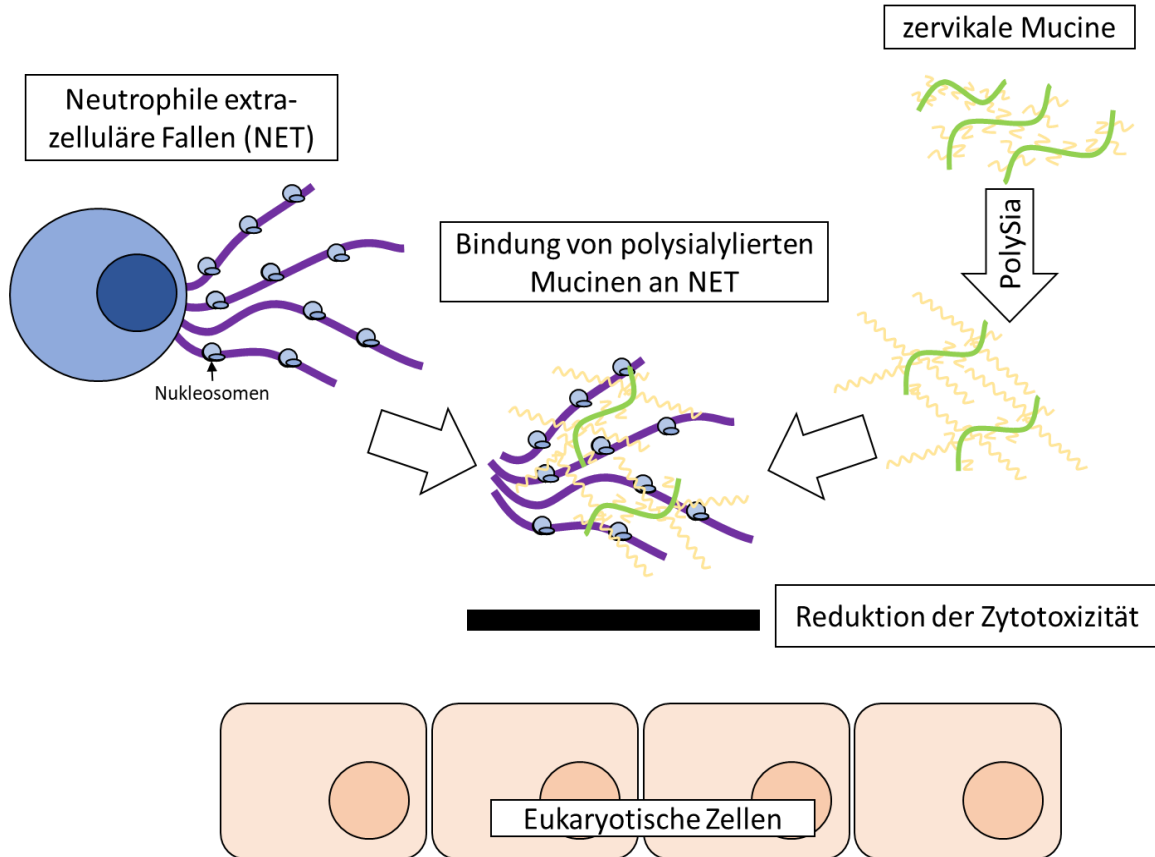


Abbildung 6: Zytotoxizitätsreduktion durch Polysialylierung zervikaler Mucine

Dargestellt ist die Ausbildung neutrophiler extrazellulärer Fallen (NET, lila) durch Neutrophile Granulozyten. Die dabei ausgeschütteten Nukleosomen (hellblau) wirken auf eukaryotische Zellen zytotoxisch. Durch die Polysialylierung (PolySia, gelb) von zervikalen Mucinen (grün) und deren Bindung an die NET-Formation wird die Zytotoxizität reduziert. Mod. nach (Galuska et al. 2017c)

Hierbei ist für die folgenden Betrachtungen hervorzuheben, dass die zytoprotektiven Eigenschaften von PolySia durch Oxidation des nicht-reduzierenden Endes nicht beeinträchtigt werden und somit theoretisch für eine effiziente chemische Kopplung genutzt werden können (Galuska et al. 2017a).

1.3 Neutrophile Granulozyten

1.3.1 Abwehrmechanismen von Neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten (kurz *Neutrophile*), bilden mit rund 60% die größte Leukozytenfraktion der Säugetiere und stellen so den Hauptteil der angeborenen Immunantwort dar. Sie sind mit die ersten Zellen am Ort des Entzündungsgeschehens und spielen eine maßgebliche Rolle in der unmittelbaren Elimination von Pathogenen sowie in der Justierung der adaptiven Immunantwort bei persistierender Infektion (Segal 2005). Umgekehrt ist die laborchemische Messung der neutrophilen Granulozyten sowie die Neutrophilie² in der Medizin wichtiger Biomarker für akute und chronische Entzündungsgeschehen (Kumar et al. 2007).

Nach Bildung und Ausreifung im Knochenmark zirkulieren die segmentkernigen Neutrophilen mit einer Halbwertszeit von ca. 6 - 8 Stunden im Blut, bevor sie für ca. 2 - 3 Tage in das umliegende Gewebe transendothelial migrieren (Bainton et al. 1971; Athens et al. 1961; Nel et al. 2016). Dort angekommen widmen sie sich in ihrer relativ kurzen Lebensspanne hauptsächlich der Überwachung und Immunabwehr infiltrierender Pathogene (Segal 2005).

Für diese Funktion steht den Neutrophilen ein umfassendes Arsenal an bakteriziden und bakteriostatischen Mechanismen zur Verfügung (s. Abbildung 7). Die wichtigsten Mechanismen, welche Neutrophile in der Immunantwort nutzen sind:

- Phagozytose
 - Degranulation mit Ausschüttung von:
 - o Antimikrobiellen Peptiden & Proteasen
 - o Zyto- & Chemokinen
 - o Reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS)
 - Neutrophile extrazelluläre Fallen
-

² Anstieg der neutrophilen Granulozyten in Blut

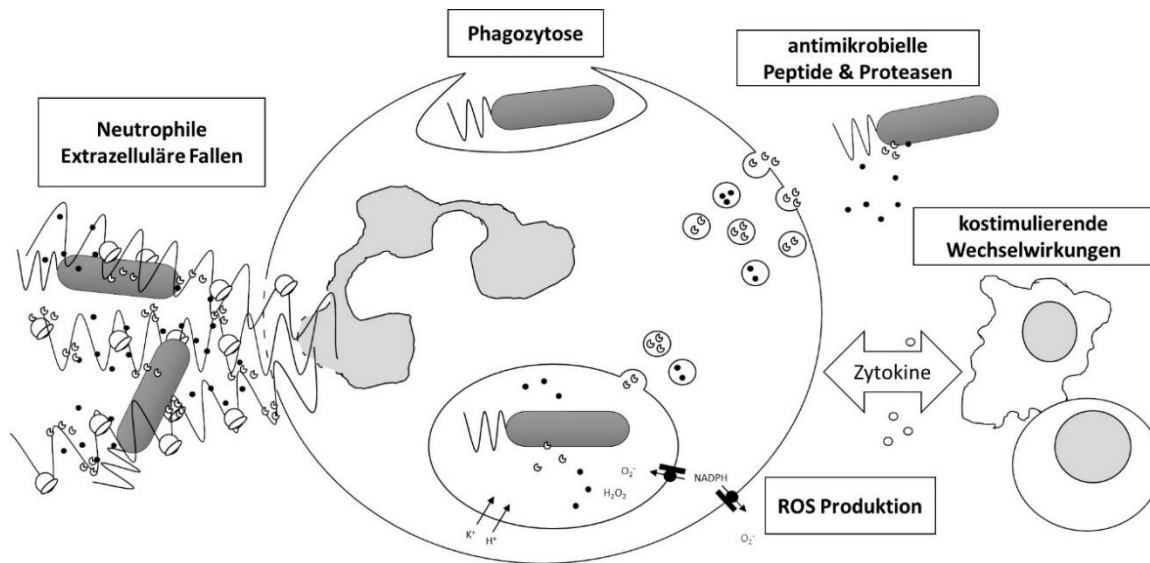


Abbildung 7: Abwehrmechanismen neutrophiler Granulozyten

Bei den Erstgenannten handelt es sich um klassische Abwehrmechanismen, mithilfe derer Bakterien vulnerabel gemacht und abgetötet werden. Die Phagozytose dient der Abtötung von Keimen und konsekutiven Antigen-Präsentation für die adaptive Immunantwort. Mittels Degranulation werden Zyto- und Chemokine zwecks Mediation des Entzündungsgeschehens sowie bakterizide Substanzen in den Extrazellularraum ausgeschüttet. Zyto- und Chemokine stellen die Weichen der Inflammation durch kostimulierende Wechselwirkung mit den Zellen der adaptiven Immunantwort. Die antimikrobiellen Peptide und Proteasen sowie die ROS-Produktion zielen allesamt auf die Ausschüttung bakterizider Substanzen in den Extrazellularraum ab (Abbas et al. 2014; Segal 2005). Eine gewisse Sonderrolle spielen die im nächsten Abschnitt ausführlich thematisierten neutrophilen extrazellulären Fallen.

1.3.2 Neutrophile extrazelluläre Fallen

Neutrophile extrazelluläre Fallen (engl. *neutrophil extracellular traps*, kurz NETs) stellen einen Abwehrmechanismus von Neutrophilen Granulozyten zur Immobilisierung und Abtötung von Mikroorganismen dar, der seit ca. 16 Jahren bekannt ist (Brinkmann et al. 2004). Dabei handelt es sich um netzartig dekondensierte Chromatinfilamente mit adhärennten Histonen, Proteasen sowie granulären und zytosolischen Proteinen, welche in den Extrazellularraum ausgeschüttet werden (Brinkmann und Zychlinsky 2007; Fuchs et al. 2007). Darunter sind über 30 verschiedene Substanzen primärer und sekundärer Granula zu finden wie Neutrophile Elastase, Myeloperoxidase, Cathepsin G, Lactoferrin, Pentraxin 3, Gelatinase, Proteinkinase 3, LL-37 Cathelicidin sowie weitere Vertreter bakterizid wirkender Substanzen (Pires et al. 2016) (s. Tabelle 1).

Die ursprüngliche Entdeckung des Mechanismus gelang bei Untersuchungen zur Aktivierung und zum Zelltod Neutrophiler Granulozyten mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) (Takei et al. 1996). Die resultierenden morphologischen Unterschiede beim Untergang der Zellen ließen damals bereits einen unkonventionellen Zelltodmechanismus erahnen. Die namensgebende Erstbeschreibung erfolgte durch Brinkmann et al. Das Akronym NETose entstand in der ursprünglichen Annahme, dass es sich – angelehnt an Apoptose und Nekrose – um einen obligaten Zelltodmechanismus handelt (Brinkmann et al. 2004). Mittlerweile ist bekannt, dass alle granulozytären Subpopulationen (Eosinophile & Basophile Granulozyten) die Fähigkeit besitzen, extrazelluläre Fallen zu generieren (Mukherjee et al. 2018; Yousefi et al. 2015).

Tabelle 1: NET-Bestandteile, mod. nach (Nel et al. 2016) CC BY.

Ursprung	NET-Bestandteil	Funktion
Zellkern	DNA	Breitspektrum-Aktivität
	Histone	
Primäre Granula	Myeloperoxidase (MPO)	Breitspektrum-Aktivität in Kombination mit Hydrogenperoxid
	Neutrophile Elastase (NE)	Serinproteasen mit Breitspektrum-Aktivität
	Proteinase 3 (PR3)	
	Cathepsin G	
	α -Defensine	Breitspektrum-Aktivität antimikrobielles Polypeptid
	Azurocidin	
	Bactericidal permeability-increasing protein	selektive Aktivität gegen gram-negative bakterielle Pathogene
Sekundäre Granula	LL-37 Cathelicidin	Breitspektrum-Aktivität
	Lactoferrin	
Primäre/Sekundäre/Tertiäre Granula	Lysozyme	selektive Aktivität gegen gram-positive bakterielle Pathogene
Zytosol	Calprotectin	selektive Aktivität gegen <i>Candida albicans</i> und <i>Aspergillus</i> -Spezies

Darüber hinaus resultieren unterschiedliche Formen der NET-Bildung in Abhängigkeit vom pathogenen Stimulus. Indessen sind drei unterschiedliche NET-Mechanismen bekannt:

- (1) Die suizidale oder auch lytische NET-Formation, wie sie von Brinkman et al. zuerst beschrieben wurde, ist die zwischenzeitlich am besten untersuchte Form. Dieser Prozess kann in vier Stufen grob unterteilt werden (Brinkmann und Zychlinsky 2007) (s. Abbildung 8):

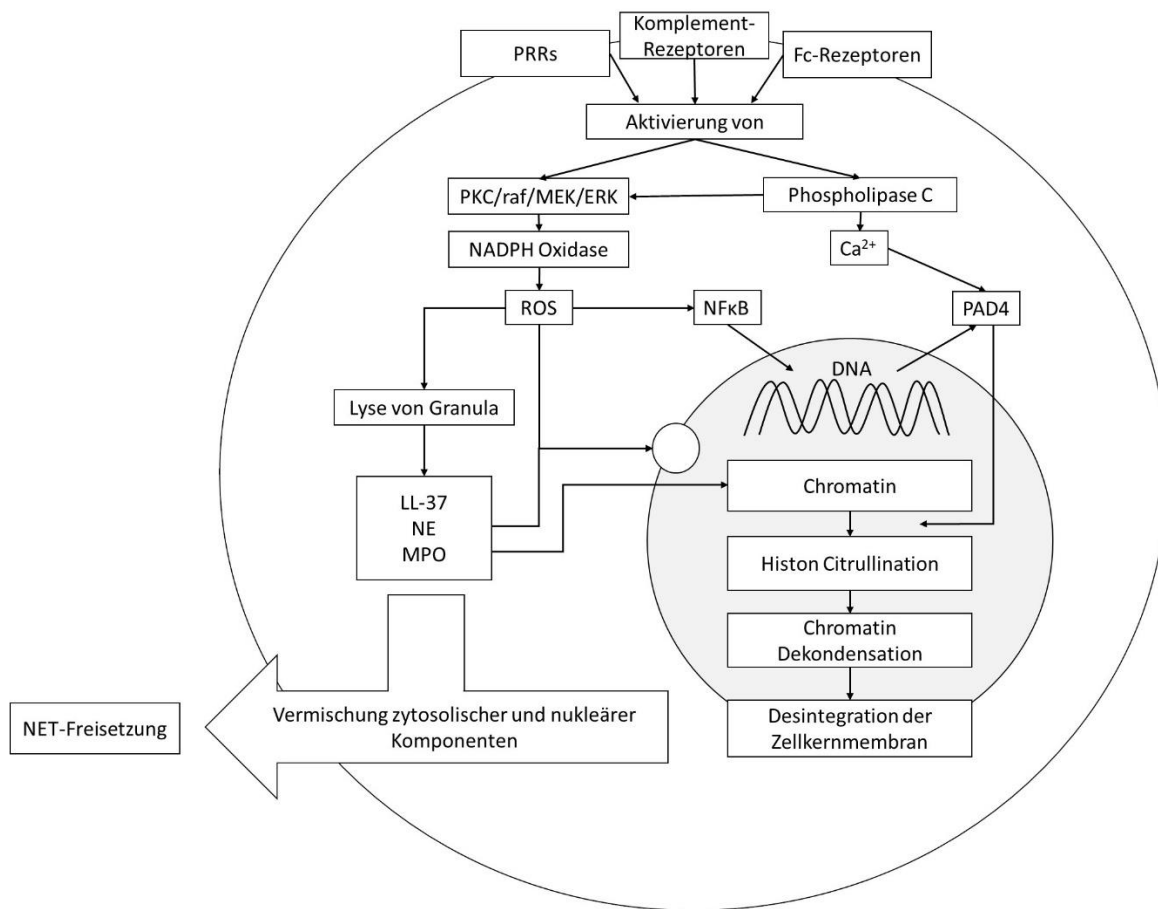


Abbildung 8: intrazellulärer Signalweg bei lytischer NET-Formation, Mod. nach (Nel et al. 2016) CC BY.

- a. Die Aktivierung der Signalkaskade (PKC/raf/MEK/ERK) via Zellmembran-gebundener Rezeptoren (pattern recognition receptors, Komplement- und Fc-

Faktoren) resultiert in einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) durch die NADPH-Oxidase.

- b. Diese bewirken einen Verlust der Membranintegrität des Nukleus sowie der zytosolischen Granula. Darüber hinaus initiieren ROS die Aktivierung des zytosolischen Transkriptionsfaktors nuclear factor kappa B (NFκB), welcher in den Nukleus transloziert wird und u.a. das Gen zur Kodierung des Ca²⁺-abhängigen, pro-NETotischen Enzyms Peptidyl-Deiminase 4 (PAD4) reguliert. Dieses bewirkt eine Citrullination der nukleären Histone gefolgt von der Chromatin-Dekondensation.
 - c. Als Folge davon kommt es zu einer Vermischung der zytosolischen Granula (LL-37, NE, MPO) mit den nukleären Komponenten (dekondensiertes Chromatin).
 - d. Nach der kompletten Vermengung der Zellbestandteile kommt es zu einer Abrundung und Kontraktion der Zelle mit Ausschüttung der neutrophilen extrazellulären Fallen.
- (2) Die vitale NET-Formation verläuft wesentlich schneller und ist ROS-unabhängig. Dieser Mechanismus wird durch Stimulierung von Toll-like Rezeptoren (TLRs) und den Komplementrezeptor für das Protein C3 aktiviert. Gegensätzlich zur suizidalen NET-Formation sind die Neutrophilen nach Aktivierung immer noch in der Lage zur Phagozytose. Auch ihre Lebensspanne bleibt von dem unvermeidlichen DNA-Verlust durch die NET-Formation unberührt (Yipp und Kubes 2013; Yousefi et al. 2019).
- (3) Die neueste Form der NET-Formation, welche jüngst von Yousefi et al. beschrieben wurde, ist ebenfalls vital, jedoch ROS-abhängig (Yousefi et al. 2019). Hierbei kommt es innerhalb von 15 min nach Stimulation der Neutrophilen mit Lipopolysacchariden (LPS) oder Komplementfaktor C5a zur Ausbildung von NETs, welche aus
-

mitochondrialer DNA besteht (Liu et al. 2016; Pilszczek et al. 2010; Yousefi et al. 2019).

Der NET-generierende Stimulus spielt eine ausschlaggebende Rolle für die Induktion der unterschiedlichen NET-Mechanismen. Der Begriff NETose ist lediglich dem Ausdruck einer NET-Formation als ROS-abhängiger regulierter Zelltodmechanismus hämatopoetischer Zellen vorbehalten (Galluzzi et al. 2018).

Die NET-Formation zieht demnach eine Ausschüttung von unterschiedlicher intrazellulären Substanzen in den Extrazellularraum mit sich. Sind die ausgeschütteten Substanzen einerseits nützlich für die antimikrobielle Immunantwort (Yipp et al. 2012), wurde jedoch mittlerweile eine Vielzahl an Autoimmunerkrankungen mit einer dysregulierten NET-Formation in Verbindung gebracht.

1.3.3 NET-assoziierte Pathologien

Die Produktion von NET ist ein Prozess, welcher unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich der Abtötung von Mikroorganismen dient. Neueren Erkenntnissen zufolge häufen sich allerdings Hinweise für die Dysregulierung der NET-Formationen in vielfältigen Erkrankungen; allen voran bei nicht-infektiösen, sterilen Entzündungsprozessen wie sie bei Autoimmunerkrankungen vorkommen (Arazna et al. 2013; Galuska et al. 2017a).

Beispielhaft sind hier u.a. systemischer Lupus erythematodes, rheumatoide Arthritis, Atherosklerose, Vaskulitiden (Gardiner und Andrews 2012; Galuska et al. 2017a; Berthelot et al. 2017; Galuska et al. 2017a)), chronische Darmerkrankungen sowie Thrombosen (Fuchs et al. 2012; Galuska et al. 2017a) und Tumoren (Cools-Lartigue et al. 2014; Galuska et al. 2017a) zu nennen. Die NET-Bildung geht hier mit einer erhöhten Gewebeschädigung, Ausbildung und Unterhalt von Autoimmunprozessen sowie anderen dysfunktionalen Prozessen wie Thrombosen bzw. Koagulopathien einher.

Saffarzadeh et al. konnte kürzlich zeigen, dass die extrazellulären Histone maßgeblich für die autoaggressive Zytotoxizität der NET-Formationen verantwortlich sind (Saffarzadeh et al. 2012).

Interessanterweise konnten aber auch unterschiedliche Autoantigene in Assoziation mit der NETose identifiziert werden, welche bereits als nahezu pathognomonische Autoantikörper im rheumatologischen Formenkreis entdeckt und für diagnostische Zwecke operationalisiert wurden.

Beispielhaft sind Antineutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA) somit unabdingbar für die rheumatologische Autoimmundiagnostik geworden. Im Speziellen werden cANCA (ANCA mit zytoplasmatischem Fluoreszenzmuster) mit dem primären Zielantigen der Proteinase 3 regelhaft mit der Granulomatose mit Polyangiitis in Verbindung gebracht (Lange et al. 2017), während pANCA (ANCA mit perinukleärem Fluoreszenzmuster) mit dem primären Zielantigen der Myeloperoxidase mit dem Churg-Strauss-Syndrom assoziiert sind.

Diese Neutrophilen-spezifischen Zielantigene legen die Vermutung nahe, dass eine dysregulierte NET-Bildung an der Ausbildung von Autoimmunität beteiligt ist (Barnado et al. 2016; Knight et al. 2012; Jorch und Kubes 2017; Lange et al. 2017).

Die Inhibierung der NET-Formation im Falle einer Übersteuerung stellt somit eine Möglichkeit dar, diese Erkrankungen zielgerichtet therapieren zu können.

2 Zielsetzung

Die Mechanismen von Neutrophilen Granulozyten stellen eine der ersten Immunantworten während des Entzündungsgeschehens dar. Neben den konventionellen Abwehrmechanismen formen diese Neutrophilen Granulozyten Netzwerke aus DNA und Histonen mit adhärenen antimikrobiellen Substanzen. Diese NETs dienen der Immobilisation und Abtötung von Pathogenen. Die hierbei konsekutiv ausgeschütteten Histone wirken jedoch zytotoxisch, sodass dysregulierte NET-Formationen zunehmend mit zahlreichen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden.

PolySia kann die Histon-vermittelte Zytotoxizität reduzieren. Aufgrund der protektiven Eigenschaften, die PolySia hinsichtlich der Reduktion der Histon-vermittelten Zytotoxizität zugesprochen wird, eröffnet sich ein neues therapeutisches Potential.

Die ursprünglichen Versuche zur Zytotoxizitätsreduktion von Histonen wurden hauptsächlich mit freien Sialinsäureketten durchgeführt. Unklar war es bislang, ob es möglich ist, oxidierte PolySia-Ketten chemisch an Trägermoleküle zu koppeln, ohne ihre Bindungseigenschaften und Inaktivierungskapazität gegenüber Histonen zu verlieren. Dies würde nämlich eine Anreicherung an neutrophilen extrazellulären Fallen ermöglichen.

Unter diesen Gesichtspunkten widmet sich diese Arbeit folgenden Schwerpunkten:

1. Synthese von chemisch polysialylierten Konjugaten.
2. Charakterisierung der biologischen Aktivität von polysialylierten Makromoleküle gegenüber Histonen.

3 Material

3.1 Chemikalien

Produktname	Firma	Sitz	Land
1,2-Diamino-4,5-Methylenedioxybenzol (DMB)	Dojindo Laboratories	Kumamoto	Japan
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Acetonitril (ACN)	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Acrylamid Rotiphorese	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Ammoniumacetat	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Ammoniumbicarbonat	Fluka Analytical Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Bovines Serum-Albumin	Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Bovines Serum-Fetuin	Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Colominsäure	Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl-Roth	Karlsruhe	Deutschland
Isopropanol	Fluka Analytical Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Kalium-dihydrogenphosphat	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Methanol	Merck	Darmstadt	Deutschland
Monosaccharidstandards: Neu5Ac, Neu5Gc, KDN	Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Natriumacetat	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Natrium-Borhydrid	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland

Material	Zelllinie		
Natriumcarbonat	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck	Darmstadt	Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad	Hercules, CA	USA
Natrium-Metaperiodat	Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Salzsäure	Merck	Darmstadt	Deutschland
N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin (Temed)	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
(apo)-Transferrin human	Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Trifluoressigsäure (TFA)	LGC Promochem	Wesel	Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Carl Roth	Darmstadt	Deutschland
Triton X-100	Serva	Heidelberg	Deutschland

3.2 Antikörper

Primärantikörper:

Anti-PolySia (735) mAK für α -2,8-verknüpfte Sialinsäuren mit einer DP \geq 8, aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Hannover zur Verfügung gestellt.

Sekundärantikörper:

Polyklonale Ziegen Anti-Maus-Ig Immunglobuline/HRP-konjugiert, Agilent Dako, USA

3.3 Zelllinie

Für die Zytotoxizitätsassays wurden 5B8-Zellen in RPMI-Medium mit 10% fetalem Kalbsserum bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellzählung erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer.

3.4 Geräte & Software

Produkt	Firma	Sitz	Land
Analysewaage	Mettler Toledo	Columbus, OH	USA
HPLC-Anlage	Knauer, Merck Hitachi	Berlin	Deutschland
Kühlschrank	Bosch	Gerlingen	Deutschland
Magnetrührer	Hartenstein	Würzburg	Deutschland
pH-Meter	Knick	Berlin	Deutschland
Reinstwasseranlage Milli-Q	Millipore	Burlington, MA	USA
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex	Mörfelden-Walldorf	Deutschland
Speed-Vac JuoanSA RC 1010	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA	USA
Vortexer	Ika	Staufen	Deutschland
Thermo-Wasserbad	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf	Deutschland
Wärmeschrank	Memmert	Schwabach	Deutschland
Chemische Strukturformeln	ACD/ChemSketch (Freeware) 2018.1.1	Toronto	Kanada
Tabellen & Figuren	Microsoft Office, Version 18	Albuquerque, NM	USA
Statistische Auswertung	IBM SPSS, Version 26	Endicott, NY	USA
HPLC-Analyse	EuroChrome 2000, Knauer	Berlin	Deutschland

3.5 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma	Sitz	Land
Filme	Kodak Biomax XAR Film	Rochester, NY	USA
Pipettenspitzen	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf	Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf	Deutschland
Mikrotiterplatte	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
MWCO-Zentrifugier-Filter	Millipore	Burlingham, MA	USA
BCA-Assay-Kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA	USA
LDH-Zytotoxizitätsassay-Kit	BioVision	Milpitas, CA	USA

4 Methoden

4.1 Sialinsäureanalytik und Glycoengineering

4.1.1 Quantifizierung von Sialinsäuren mittels HPLC

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography* - HPLC) ist ein Verfahren der analytischen Chemie und Biochemie, welches der Identifikation und Quantifizierung von flüssigen Substanzen dient. Es handelt sich um ein Trennverfahren, bei welchem die gesuchte Substanz in einer mobilen Phase in einer Trennsäule an einer stationären Phase vorbeigepresst wird. Unterschiedliche Interaktionen beider Phasen resultieren in unterschiedlichen Retentionszeiten der zu untersuchenden Substanz. Für die Quantifizierung von Sialinsäuren werden diese zunächst hydrolytisch gespalten und die resultierenden Monomere anschließend mit 1, 2-Diamino-4, 5-Methyleneoxybenzen (DMB) fluoreszenzmarkiert (Hara et al. 1987). Diese Derivatisierung mit DMB erfolgt spezifisch am reduzierenden Ende der α -Ketosäuren (s. Abbildung 9)(Nakamura et al. 1987).

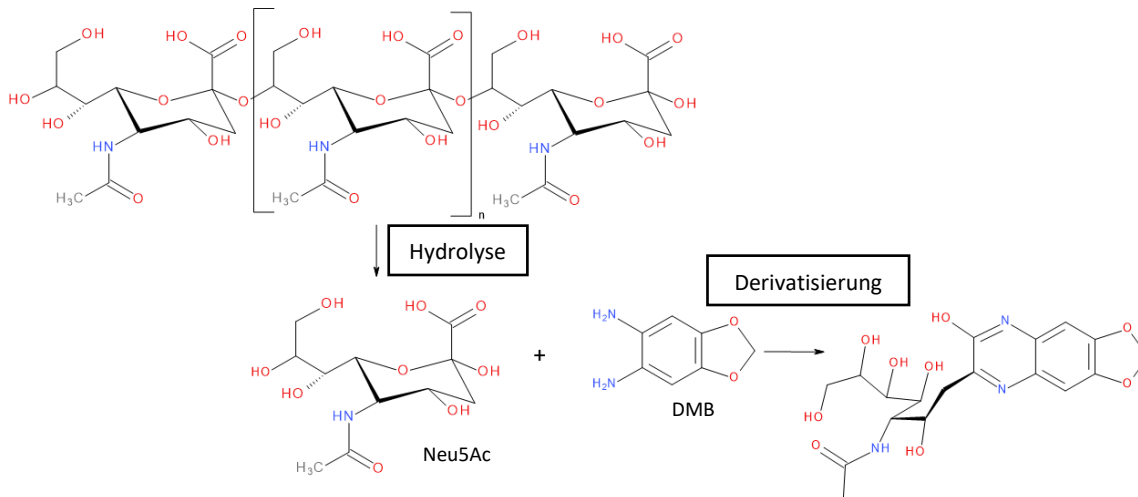


Abbildung 9: DMB-Markierung von PolySia

Nach hydrolytischer Spaltung von PolySia erfolgt die DMB-Markierung der Monomere zwecks anschließender chromatographischer Messung (HPLC).

Zur Identifikation der Proben werden Standards eines Sialinsäure-Gemisches bestehend aus Neu5Ac, Neu5Gc und KDN (s. Struktur der Sialinsäuren) parallel zu den Proben gemessen. Durch Vergleich der Retentionszeiten können die Proben der jeweiligen Sialinsäure eindeutig zugeordnet werden.

Zur Quantifizierung des Neu5Ac-Gehalts werden von den Standardproben definierte Konzentrationen gemessen. Die Fläche unter den Signalausschlägen steigt proportional zur Konzentration. Somit können mittels linearer Regression Rückschlüsse über die Konzentration der Proben getroffen werden (Galuska et al. 2010a).

Zur hydrolytischen Spaltung der Probe wird diese in 200 μ l 0,2 N TFA gelöst und vier Stunden bei 80°C inkubiert. Anschließend wird sie wieder in der SpeedVac getrocknet.

Zur anschließenden Derivatisierung wird ein DMB-Puffer, bestehend aus 18 mM Natriumhydrosulfit, 1 M Mercaptoethanol sowie 40 mM TFA, angesetzt. 1,22 mg DMB werden folglich in 1 ml DMB-Puffer gelöst und die entstandene Lösung 1:1 mit Aqua bidest verdünnt. Die trockenen Proben werden mit jeweils 80 μ l des hergestellten Reagenzes für zwei Stunden bei 55°C inkubiert. Zuletzt wird die Derivatisierung mit 20 μ l 0,2 M NaOH gestoppt und umgehend der HPLC-Analyse zugeführt.

Zur Auftrennung der DMB-markierten Derivate wird eine LiChroCart 250-2 SuperSpher 100 RP C-18 von Merck verwendet. Die Betriebstemperatur liegt bei 40°C. Die Detektion am Fluoreszenzdetektor erfolgt bei einer Anregungswellenlänge von 372 nm und einer Emissionswellenlänge von 456 nm. Die beiden verwendeten Laufmittel setzen sich wie folgt zusammen:

Laufmittel A: 4% Acetonitril : 4% Methanol : 92% H₂O und 0,1% (v/v) TFA

Laufmittel B: 45% Acetonitril : 45% Methanol : 10% H₂O und 0,1% (v/v) TFA

Die Flussgeschwindigkeit wurde auf 0,25 ml/min festgelegt. Die Daten wurden mit EuroChrom® (Knauer) prozessiert und analysiert.

4.1.2 C7/C9-Methode nach Sato

Die Detektion von α -2,8-verknüpften Oligo- & PolySia wird durch die C7/C9-Methode nach Sato ermöglicht. Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass der endständige Sialinsäurerest eines Polymers nach Oxidation am nicht-reduzierenden Ende ein C7-Grundgerüst aufweist, wohingegen die internen Sialinsäure-Moleküle ihr C9-Grundgerüst behalten.

Diese Methode beinhaltet eine Oxidation mit Perjodat (Jennings und Lugowski 1981; Ray et al. 2014, 2016) und eine Reduktion mit Natrium-Borhydrid zwecks anschließender HPLC-Analyse. Diese erfolgt analog zur Sialinsäure-Quantifizierung nach Hydrolyse PolySia und Fluoreszenzmarkierung mit DMB am reduzierenden Ende (s. Quantifizierung von Sialinsäuren mittels HPLC). Hiermit können einerseits interne Sialinsäuren, andererseits auch die erfolgreiche Oxidation eines Sialinsäure-Polymers nachgewiesen werden (Sato et al. 1998) (s. Abbildung 10).

Zunächst wird die trockene Probe in 50 μ l 40 mM Natrium-Acetatpuffer (pH = 5,5) gelöst. Anschließend erfolgt die Oxidation durch Hinzugabe von 4 μ l frisch angesetzter 0,25 M Natrium-Metaperiodat-Lösung und 3-stündiger Inkubation der Proben bei 0°C. Die Reaktion wird mit 10 μ l 3%-iger Ethylenglykol-Lösung gestoppt.

Die folgende Reduktion wird durch Hinzugabe von 64 μ l 0,2 M Natriumborhydrid in 0,2 M Natrium-Boratpuffer (pH = 8) initiiert. Nach Inkubation der Proben über Nacht bei 0°C wird die Probe am Folgetag in der SpeedVac getrocknet.

Die Hydrolyse, Fluoreszenzmarkierung sowie HPLC Auftrennung erfolgt wie oben beschrieben (s. Quantifizierung von Sialinsäuren mittels HPLC). Um die Retentionszeiten der HPLC-Peaks eindeutig zuordnen zu können, werden native, nicht-oxidierte PolySia (reine C9-Körper) sowie Glykokonjugate mit bekannterweise terminalen Monosialinsäureresten wie z.B. Fetuin (reine C7-Körper nach Oxidation) als Kontrollgruppen mitgeführt.

In der HPLC-Analyse macht sich die erfolgreiche Oxidation anhand der Retentionszeit bemerkbar. Diese ist bei einem C7-Körper um wenige Minuten länger.

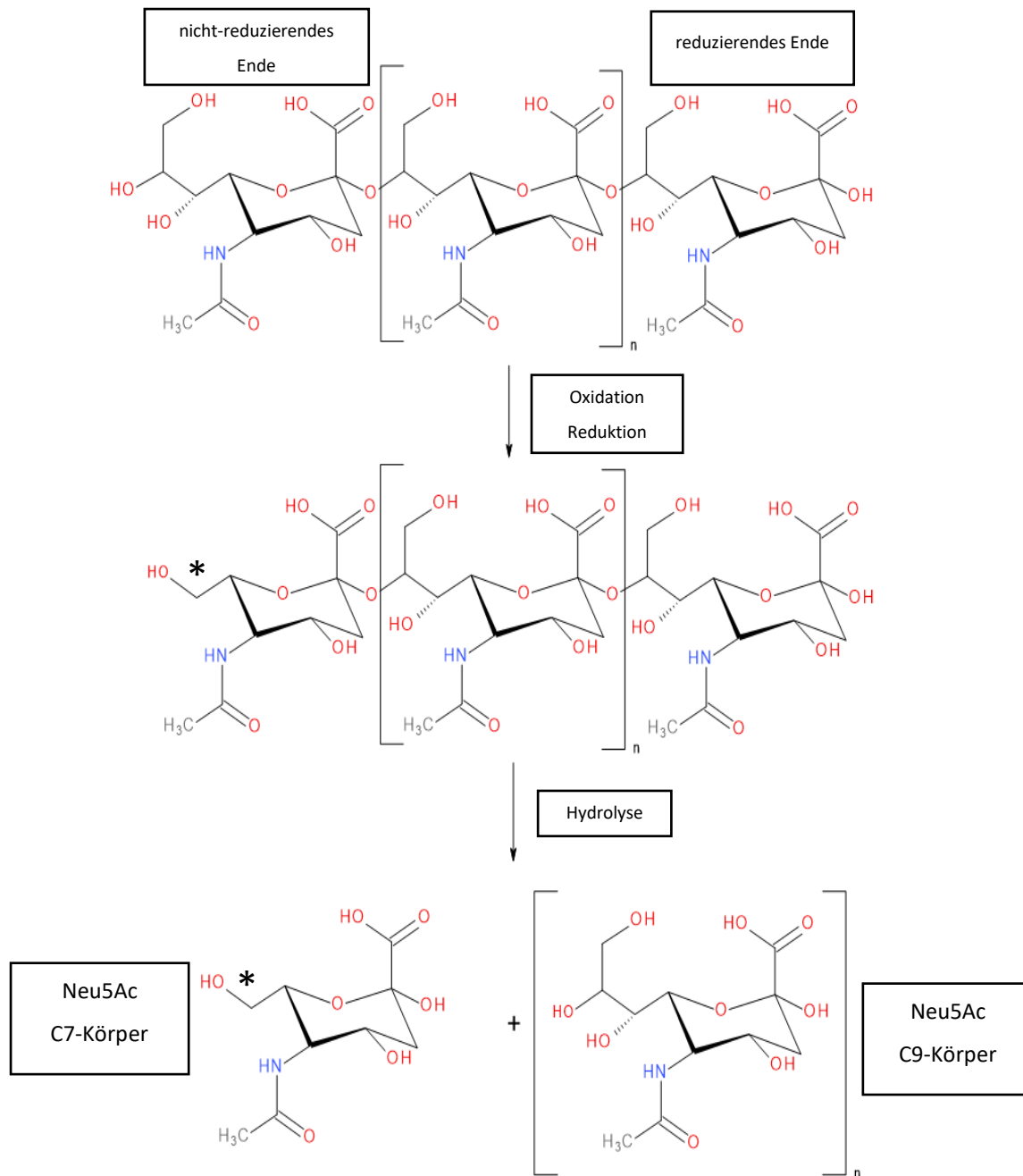


Abbildung 10: C7/C9-Methode nach Sato

In einem ersten Schritt erfolgt am nicht-reduzierenden Ende eine Oxidation sowie umgehende Reduktion unter Ausbildung eines C7-Grundgerüsts (*). Nach folgender hydrolytischer Spaltung entstehen nun C7- und C9-Körper, welche nach DMB-Markierung chromatographisch (HPLC) nachgewiesen werden können.

4.1.3 Reduktive Aminierung von Sialinsäuren mit Proteinen bzw. Nanopartikeln

Die reduktive Aminierung dient in diesem Fall der kovalenten Bindung eines Sialinsäurepolymers an ein Trägermolekül. Diese spezielle Form der Glykosylierung wird als chemische (Poly-)Sialylierung bezeichnet (s. Abbildung 11).

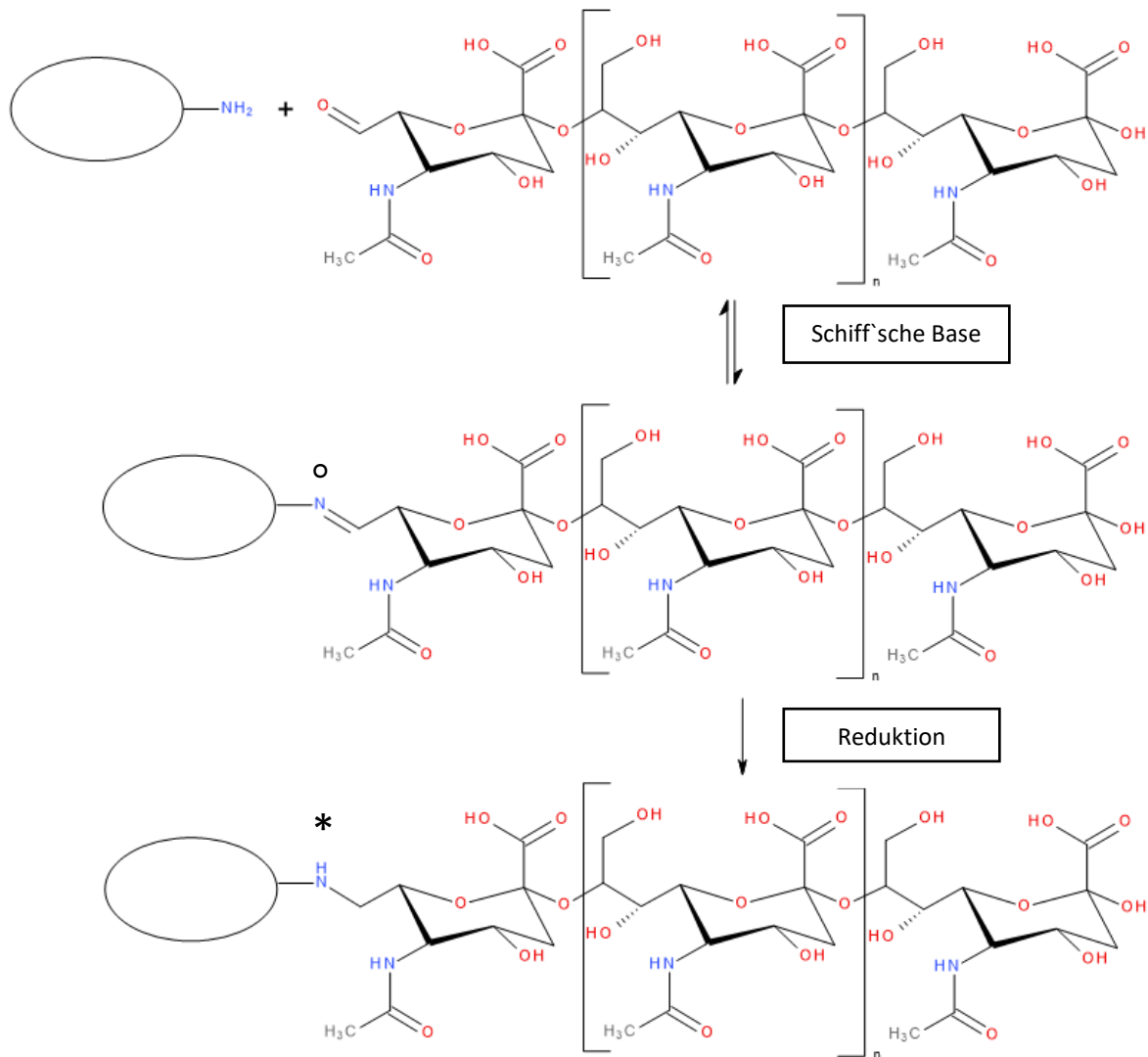


Abbildung 11: Kopplung von PolySia mittels reduktiver Aminierung

Die Reaktionsschritte der reduktiven Aminierung umfassen die nukleophile Addition unter Ausbildung einer Schiff'schen Base mit instabiler Imin-Bindung (°) und darauffolgender Reduktion dieser zu einem sekundären Amin (*).

Voraussetzung für diese Kopplung ist auf Seiten des Trägermoleküls ein primäres Amin sowie auf Seiten der Sialinsäure eine reaktive Aldehydgruppe. Letztere Voraussetzung wurde durch vorausgehende Oxidation der Sialinsäuren gewährleistet. Im Falle der Trägermoleküle sind die primären Amine auf Proteinen an Lysin-Resten zu finden. Hingegen handelt es sich bei den nachfolgend genutzten Nanopartikeln um polyaminierte Gerüste, welche eine Vielzahl an primären Aminen aufweisen.

Die reduktive Aminierung kann nun in zwei Schritte unterteilt werden. Zunächst erfolgt die nukleophile Addition der Aldehyd-Gruppe an das primäre Amin unter Bildung einer Schiff'schen Base. Die resultierende instabile Imin-Bindung wird im Folgenden mittels Natriumcyanoborhydrid zu einer kovalenten Bindung reduziert (Smirnov et al. 2015).

Die Trägermoleküle wurden zunächst in PBS resuspendiert. Die Nanopartikel wurden zusätzlich mittels Ultraschall-Homogenisator suspendiert. Die Proben wurden in unterschiedlichen molaren Verhältnissen mit den oxidierten PolySia-Ketten versetzt. Anschließend erfolgte die reduktive Aminierung durch Hinzugabe von in PBS gelöstem 50 mM Natrium-Cyano-Borhydrid (pH = 7,4). Die Proben wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Letztlich wurden die Proben wiederholt dialysiert und in RPMI-Medium für die weiteren Versuche resuspendiert.

4.2 Proteinanalytik

4.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen nutzt man die Reduktion von Kupferionen durch Proteine in alkalischen Medium. Die routinemäßige Bestimmung der Proteinkonzentration wird durch das BCA-Protein-Assay-Kit von Thermo Scientific Pierce vereinfacht.

In einem ersten Schritt bildet sich ein hellblauer Chelat-Komplex der Proteine mit den Kupferionen. Bei dieser sogenannten Biuret-Reaktion formen Peptide mit drei oder mehr Aminosäuren farbige Chelat-Komplexe mit Kupferionen in alkalischem Milieu unter Zusatz von Natriumkaliumtartrat.

Im zweiten Schritt der Farbreaktion reagiert die Bicinchoninsäure (BCA) mit dem reduzierten Kupferkation. Der intensive lilafarbene Farbumschlag ist Resultat des Reaktionsprodukts bei der Ausbildung eines Chelat-Komplexes zweier BCA-Moleküle mit einem Kupferion. Diese Reaktion potenziert den blauen Farbumschlag der ersten Reaktion. Die BCA/Kupfer-Komplexe besitzen eine starke lineare Absorption bei einer Wellenlänge von 562nm mit steigender Proteinkonzentration. Die Detektion erfolgt im ELISA-Reader.

4.2.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE ist ein elektrophoretisches Trennverfahren, welches der Analyse von Protein hinsichtlich ihres Molekulargewichts dient. Das hierfür benutzte anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet die meisten Proteine in einem konstanten Ladungs-Masse-Verhältnis (1,4 g SDS / g Protein in 1% SDS-Lösung). Durch 5-minütige Denaturierung der Proteine bei 95°C werden Protein-Protein-Interaktionen sowie Tertiärstrukturen unterbunden.

Die geladenen SDS-Protein-Komplexe werden anschließend in einem elektrischen Gleichstromfeld aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten aufgetrennt. Auf dem Weg zum Plus-Pol durchwandern die anionischen Komplexe hierbei eine poröse Polyacrylamid-Matrix, welche als Molekularsieb dient.

Die Auftrennung der Protein-Lösungen erfolgt in zwei Schritten. Zunächst werden sie in einem Sammelgel zusammengetragen und anschließend in einem Trenngel aufgetrennt. Das Polyacrylamid wurde für das Sammelgel in einer Konzentration von 3% und für das Trenngel in einer Konzentration von 10% verwendet.

Spezielle SDS-PAGE-Systemen dienen der Auspolymerisation der Gele zwischen zwei Glasplatten. Zunächst wird das entgaste Trenngel nach Hinzugabe von APS und Temed umgehend zwischen die Glasplatten pipettiert und mit Aqua bidest überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels kann das Aqua bidest abgeschüttet werden und das entgaste Sammelgel nach gleichem Prinzip auf das Trenngel gegossen werden. Hier erfolgt noch zuletzt das Einsetzen von Trennkämmen, welche nach Auspolymerisation des Sammelgels als Taschen für die Protein-Lösungen dienen.

Nach Beladung der Kammern beginnt die elektrophoretische Trennung.

4.2.3 Western Blot

Nach der SDS-PAGE werden die Gele auf eine adsorbierende Membran transferiert. Durch elektrophoretische Übertragung der Protein-Banden auf diese Membran, können die Proteine angefärbt bzw. mit Antikörpern markiert werden. Die Blot-Membran besteht aus hydrophoben Polyvinylidendifluorid (PVDF) und weisen eine hohe mechanische und chemische Stabilität auf. Insbesondere für die Immunfärbung sind diese Membranen gut geeignet.

Die Proteinbanden werden nun senkrecht zu ihrer Trennrichtung in der SDS-PAGE auf die Blot-Membran transferiert. Diese Überführung der Proteinbanden erfolgt ebenfalls elektrophoretisch durch Anlegen einer Spannung. Ergebnis des Western Blots sind exponierte Proteine, welche nun angefärbt werden können.

4.2.4 Immunfärbung und Entwicklung der Western Blots

Zwecks Immunfärbung müssen die restlichen Proteinbindungsstellen der Membran zunächst abgesättigt werden. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgen unter kontinuierlichem Schwenken der Membran in den genannten Lösungen. Hierfür werden die Membranen in Blockpuffer überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach anschließender wiederholter Waschung der Membranen mit Roti-Block für 10 min werden die geblotteten Proteine mit den in Blockpuffer verdünnten Primäantikörpern (Anti-PolySia 1:2000) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach werden die Membranen erneut wiederholt mit Blockpuffer gewaschen. Als Sekundäantikörper wird ein in Roti-Block verdünnter (1 : 5000), Peroxidase-gekoppelter Antikörper (Ziege) verwendet. Die Membran wird bei Raumtemperatur für eine weitere Stunde mit diesem inkubiert. Nach wiederholtem Waschen der Membran mit Roti-Block und PBS-T erfolgen die weiteren Arbeitsschritte unter Rotlicht im Fotolabor.

Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol und löst somit Chemolumineszenz aus. Diese Reaktion wird auf einem Chemolumineszenz-Detektions-Film festgehalten. Die

Chemilumineszenz-Lösung wird frisch hergestellt und auf die Membran gegeben. Nach kurzer Entwicklungszeit von wenigen Minuten und bei unterschiedlichen Belichtungsverhältnissen kann das Ergebnis auf dem Film betrachtet werden.

4.3 Zytotoxizitätsassays

Kommt es zum Untergang einer Zelle, werden durch Desintegration der Zellwand physiologisch intrazelluläre Substanzen in den Extrazellularraum bzw. das Kulturmedium ausgeschüttet - so auch die Laktat-Dehydrogenase. Dabei handelt es sich um ein ubiquitär vorkommendes Enzym, welches unter physiologischen Bedingungen im Zytosol der Zelle die Bildung von Laktat aus Pyruvat und dem Cofaktor NADH katalysiert. Das LDH-Zytotoxizitätsassay-Kit von BioVision macht sich dies zur routinemäßigen Untersuchung der Zytotoxizität zunutze.

Die kultivierten 5B8-Zellen wurden in einer 96-well Platte mit 30.000 Zellen / well ausplattiert. Anschließend wurden die Zellen 90 min mit Histonen allein sowie mit nativer PolySia bzw. mit polysialyliertem Transferrin inkubiert. Die Konzentration von PolySia wurde dem Sialylierungsgrad (*sia*[°]) der modifizierten Transferrin-Moleküle angepasst, um vergleichende Aussagen treffen zu können. Eine Negativ-Kontrolle mit unbehandeltem Transferrin und Histonen wurde ebenfalls berücksichtigt.

Unter diesen vier Bedingungen wurde die Zytotoxizität mithilfe des LDH-Zytotoxizitätsassay-Kits von BioVision nach Herstellerangaben quantifiziert. Es handelt sich dabei um eine photometrische Bestimmung der frei werdenden Laktat-Dehydrogenase. Folglich wird die Zytotoxizität nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{\text{gemessener Wert} - \text{unterer Kontrollwert}}{\text{oberer Kontrollwert} - \text{unterer Kontrollwert}} \times 100$$

Der obere Kontrollwert entspricht der Zytotoxizität nach Behandlung der Zellen mit 0,5% Triton X-100. Hierbei kommt es durch Permeabilisierung der Zellmembran zum Untergang aller Zellen. Der untere Kontrollwert entspricht der gemessenen Absorption nach spontaner Lyse der Zellen ohne weitere Zusätze.

Für die vergleichenden Betrachtungen zur Reduktion der Zytotoxizität wurden die errechneten Werte als prozentualer Anteil der Histon-vermittelten Zytotoxizität (bei einer Histon-Konzentration von 80 µg/ml) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{relative Zytotoxizität (\%)} = \frac{\text{errechnete Zytotoxizität}}{\text{Histon}_{80} - \text{ermittelte Zytotoxizität}} \times 100$$

4.4 Statistische Auswertung

Alle beschriebenen Versuche wurden mindestens drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt.

Die chromatographische Messung der Neu5Ac-Reste erfolgte nach linearer Regression aufsteigender Konzentrationen von Sialinsäure-Standards. Voraussetzung für die Berechnung und weitere Nutzung der Proben war ein Korrelationskoeffizient von $r \geq 0,95$ der Sialinsäure-Standards.

Die statistische Auswertung erfolgte mit IBM SPSS Statistics 26. Die Datensätze wurden mit ein- bzw. zweifaktorieller Varianzanalyse und post-hoc Tukey-Test für mehrfaktorielle Vergleiche analysiert. Unterschiede wurden bei $p < 0.05$ als statistisch signifikant angenommen, das Signifikanzniveau wird wie folgt angegeben: ns – nicht signifikant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

5 Ergebnisse

5.1 Nachweis der Oxidation mittels C7/C9-Methode nach Sato

Zur Vorbereitung von PolySia für eine effiziente kovalente Kopplung an Trägermoleküle muss eine erfolgreiche Oxidation der nicht-reduzierenden Enden gewährleistet sein. Dies wurde mithilfe der C7/C9-Methode nach Sato überprüft (Sato und Kitajima 2013). Hierfür wurden Aliquots von PolySia nach milder Hydrolyse als Kontrollen mitgeführt. Neu5Ac (C9-Körper) wurden mit Hilfe von Sialinsäure-Mix-Standards identifiziert (s. Abbildung 12).

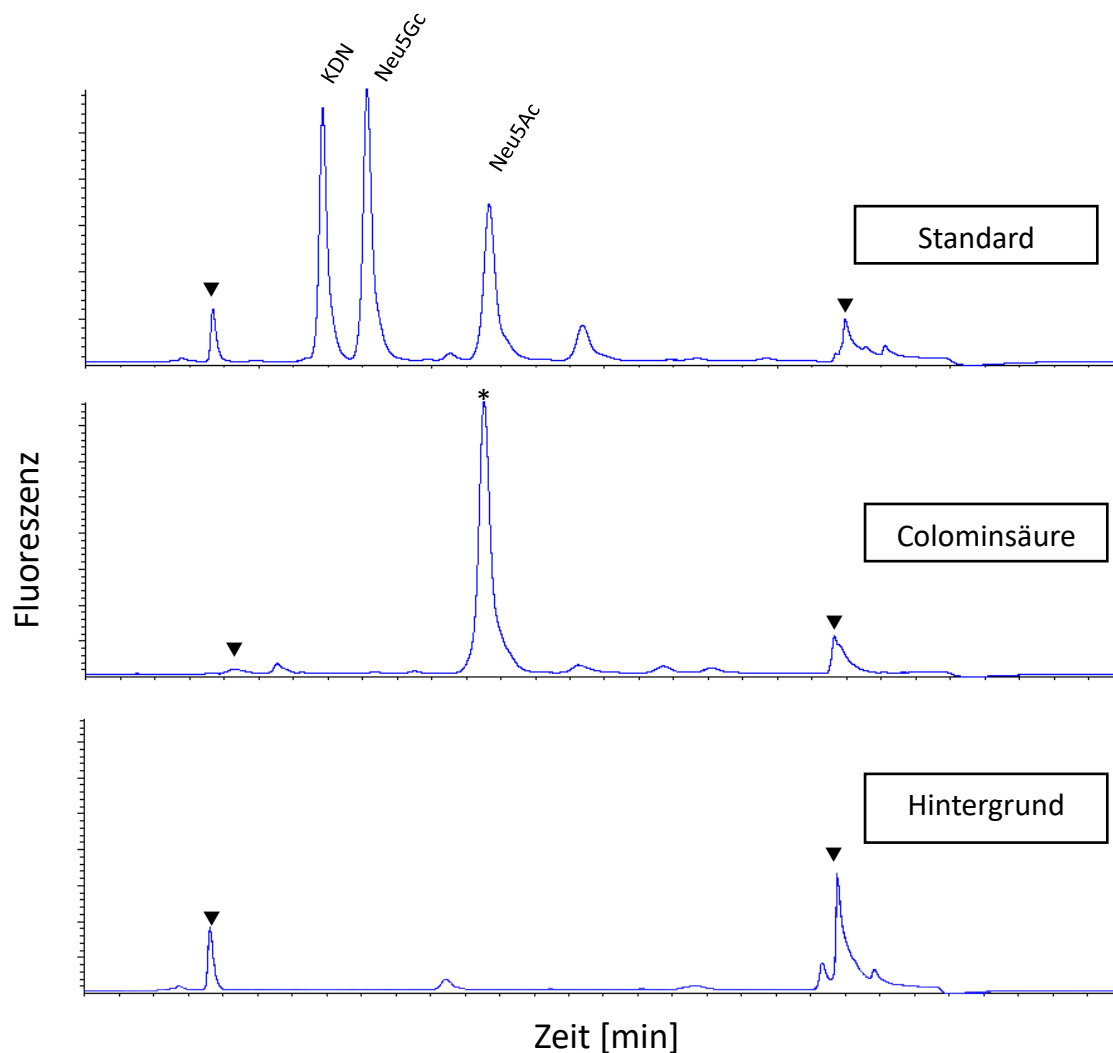


Abbildung 12: HPLC von nativer Colominsäure

Anhand des Sialinsäure-Standards können die folgenden Untersuchungen eindeutig zugeordnet werden. Nach Hydrolyse und DMB-Markierung lassen sich bei der Colominsäure lediglich Neu5Ac (*) nachweisen (C9-Körper). Signale, die auf das DMB-Reagenz zurückzuführen sind, wurden mit Pfeilen gekennzeichnet (▼).

Die Bildung von C7-Körpern durch die Oxidation wurde mit Fetuins überprüft. Dabei handelt es sich um ein Glykoprotein, dass bekannterweise nur terminale Monosialinsäuren aufweist. Nach Oxidation, Reduktion und hydrolytischer Abspaltung dieser sind demnach lediglich C7-Sialinsäuren zu erwarten (s. Abbildung 13).

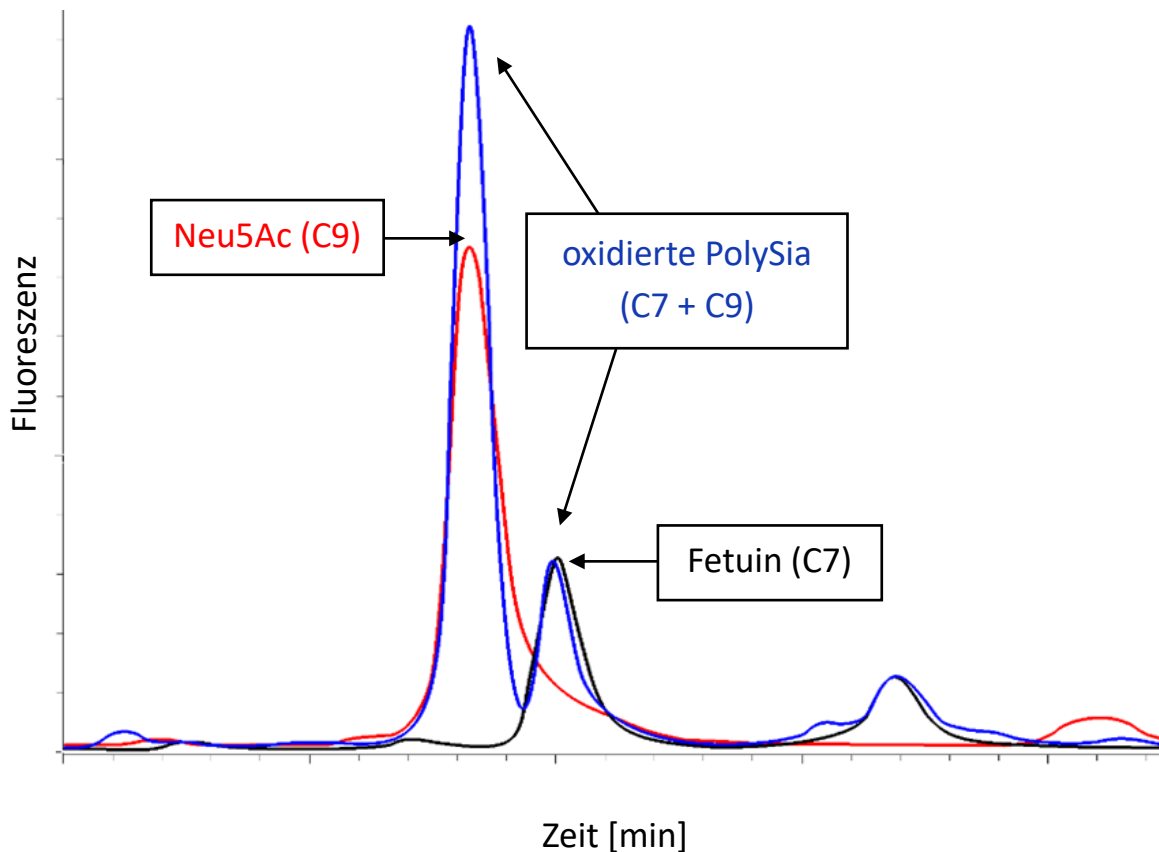


Abbildung 13: HPLC-Ergebnis der C7/C9-Methode nach Sato

HPLC-Ergebnisse nach hydrolytischer Spaltung und DMB-Markierung von (blau) oxidierten PolySia (C7 + C9-Körper); (rot) nativer PolySia (nur C9-Körper) und (schwarz) MonoSia von Fetuin (nur C7-Körper).

Der Vergleich der Retentionszeiten der unterschiedlichen Proben lässt folgende Erkenntnis zu. Mithilfe der Sialinsäure-Standards lässt sich der Ausschlag der C9-Körper zuordnen.

Die etwas längere Retentionszeit der Sialinsäurerest des oxidierten Fetuins ermöglicht die Zuordnung der C7-Körper.

Die oxidierten Sialinsäurepolymere weisen hingegen zwei Peaks auf, welche den Retentionszeiten der C9- respektive C7-Körper zugeordnet werden können. Die Oxidation war somit erfolgreich und die Proben können für die kovalente Kopplung an die Trägermoleküle mittels reduktiver Aminierung eingesetzt werden.

5.2 Nachweis polysialylierter Proteine im Western Blot

Nach der reduktiven Aminierung wurde der Kopplungserfolg zunächst qualitativ mittels Western Blot gegen PolySia nachgewiesen. Hintergrund hierfür ist, dass durch die Kopplung ein erhöhtes Molekulargewicht der polysialylierten Glykokonjugate resultiert und sich deren Valenz durch die polyanionischen Sialinsäure-Polymere verändert. Durch die unterschiedliche Kettenlänge der gekoppelten PolySia entsteht hierbei ein charakteristisches Ausschmieren der Proteinbanden nach erfolgreicher (Simon et al. 2013). Die Versuche wurden jeweils mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen (50 : 1, 100 : 1) der Reaktionspartner durchgeführt. Als Negativ-Kontrollen wurden die reduktive Aminierung sowohl ohne Reduktionsmittel als auch ohne oxidierte PolySia durchgeführt (s. Abbildung 14).

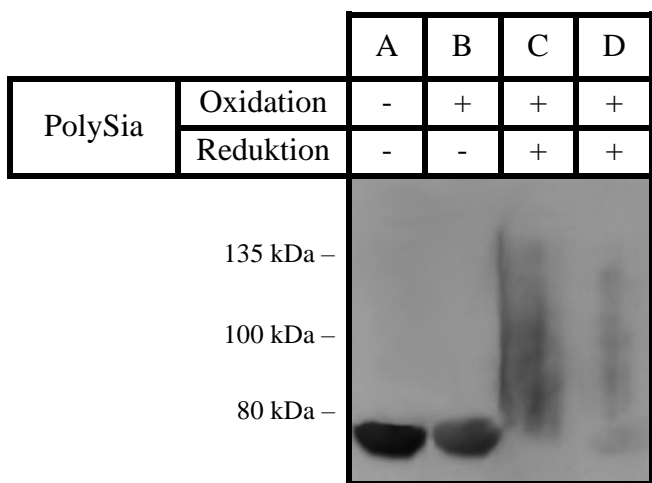


Abbildung 14: Western Blot polysialylierter Transferrin-Moleküle

Western Blot zur Untersuchung der Polysialylierung von Transferrin-Molekülen; (A) natives Transferrin; (B) nach Inkubation oxidiertes PolySia ohne Reduktionsmittel; (C) nach Inkubation von oxidiertem PolySia und Reduktionsmittel bei einem molaren Mischungsverhältnis von 100 : 1 und (D) 50 : 1.

Im Western Blot lassen sich vier Proteinbanden darstellen. In der ersten wurde natives Transferrin allein betrachtet. Daneben ist das Transferrin mit oxidierten Sialinsäuren ohne Reduktionsmittel in Kontakt gekommen. Zuletzt sind die zwei Banden mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen der Kopplungspartner zu sehen. Die Transferrin-Moleküle wurden in einem molaren Verhältnis von 100 : 1 sowie 50 : 1 mit oxidierten Sialinsäuren nach reduktiver Aminierung untersucht. Nach Oxidation und Reduktion nahm das Molekulargewicht zu, während ohne Reduktion Transferrin vergleichbar mit nativem Transferrin im SDS-Gel gewandert ist. Somit erfolgte eine quantitative Polysialylierung nur, wenn eine Reduktion durchgeführt wurde. Anzumerken ist hier, dass natives Transferrin visualisiert wurde, obwohl es keine PolySia-Ketten trägt.

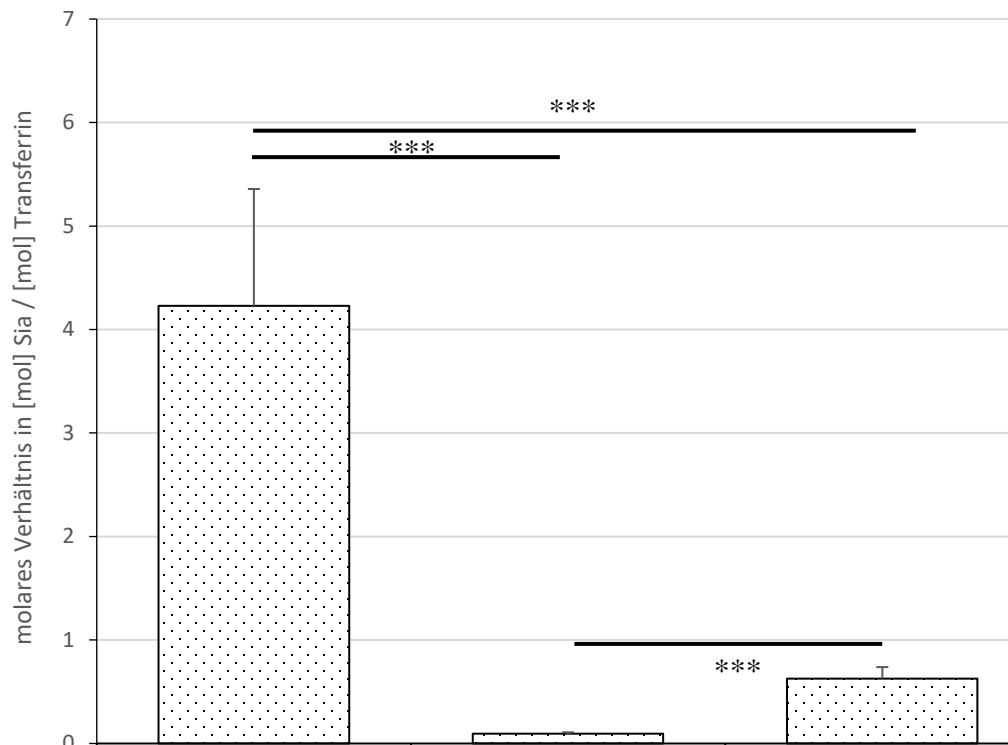
5.3 Sialyierungsgehalt der Proteine

Nach qualitativer Bestätigung der Kopplungsreaktion wurde der Kopplungserfolg quantifiziert. Der durchschnittliche Sialyierungsgehalt der Proteine wurde anhand der molaren Verhältnisse beider Substanzen nach Kopplung berechnet. Für diese Untersuchungen wurden die sialylierten Transferrin-Konjugate wieder in ihre ursprünglichen Bestandteile aufgespalten.

Zunächst wurden die gekoppelten Sialinsäuren hydrolytisch von den Proteinen gespalten und anschließend mittels 50 kDa MWCO Filter von den Transferrin-Molekülen ultrafiltriert. Ergebnis sind zwei Proben, deren ein Bestandteil die Proteine sowie der andere Teil die freigesetzten Sialinsäuren darstellen. Mittels Proteinkonzentrationsbestimmung sowie HPLC-Quantifizierung der Sialinsäuren wurden im Folgenden die Konzentrationen bestimmt und das molare Sialinsäure/Protein-Verhältnis berechnet. Als Prozesskontrollen wurden bei Inkubation mit nativem Transferrin nicht-oxidierte PolySia mit bzw. ohne Reduktionsmittel mitgeführt.

Die anschließende Quantifizierung des Sialyierungsgrads ($\text{sia}^\circ = [\text{mol}_{\text{Sia}}] / [\text{mol}_{\text{Transferrin}}]$) von polysialyliertem Transferrin ergibt ein durchschnittliches molares Verhältnis von $\text{sia}^\circ = 4,23 \pm 1,13$. Nicht-oxidierte PolySia-Ketten wiesen nach reduktiver Aminierung ein molares Verhältnis von $\text{sia}^\circ = 0,09 \pm 0,01$ zu den Transferrin-Molekülen auf; oxidierte PolySia lag nach Versuchsdurchführung ohne Reduktionsmittel bei $\text{sia}^\circ = 0,63 \pm 0,11$ (s.

Abbildung 15). Der Sialyierungsgrad lässt sich anhand des Prozentsatzes der konjugierbaren Lysinreste ($\hat{=} \text{Lys}_{\text{Sia}}$ [%]) der Proteine berechnen, da diese Aminosäure die notwendige primäre Aminogruppe für die Konjugation trägt. Die mittels Oxidation und Reduktion hergestellten polysialylierten Transferrin-Moleküle wurden für die folgenden Zytotoxizitätsassays weiter verwendet.



PolySia	Oxidation	+	-	+
	Reduktion	+	+	-
sia°		4.23 ± 1.13	0.09 ± 0.01	0.63 ± 0.11
Lys_{Sia} [%]		7.29	0.16	1.08

Abbildung 15: Sialyierungsgrad von polysialyliertem Transferrin

Messung des Sialyierungsgrads (sia°) unter verschiedenen Versuchsbedingungen sowie Berechnung der prozentualen Anteile sialylierter Lysin-Reste (Lys_{Sia}). (A) oxidierte PolySia und (B) native PolySia werden mit Reduktionsmittel für die reduktive Aminierung mit Transferrin inkubiert, (C) Inkubation von oxidiertem PolySia ohne Reduktionsmittel. Die dargestellten Werte sind Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse. ns, nicht signifikant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

5.4 Reduktion der Zytotoxizität durch PolySia

Zuletzt wurden die generierten polysialylierten Transferrinmoleküle auf ihre Fähigkeit zur Reduktion der Histon-vermittelten Zytotoxizität hin geprüft.

In einem ersten Schritt wurde zunächst die Histon-vermittelte Zytotoxizität auf die 5B8-Zellen observiert. Die 5B8-Zellen wurden hierfür mit Konzentrationen von 20 - 200 $\mu\text{g/ml}$ mit 30.000 Zellen / well inkubiert und anschließend dem LDH-Zytotoxizitäts-Assay unterzogen. Die Zytotoxizität wird nach oben genannter Formel (s. Zytotoxizitätsassays) als prozentualer Anteil der Kontrollproben berechnet.

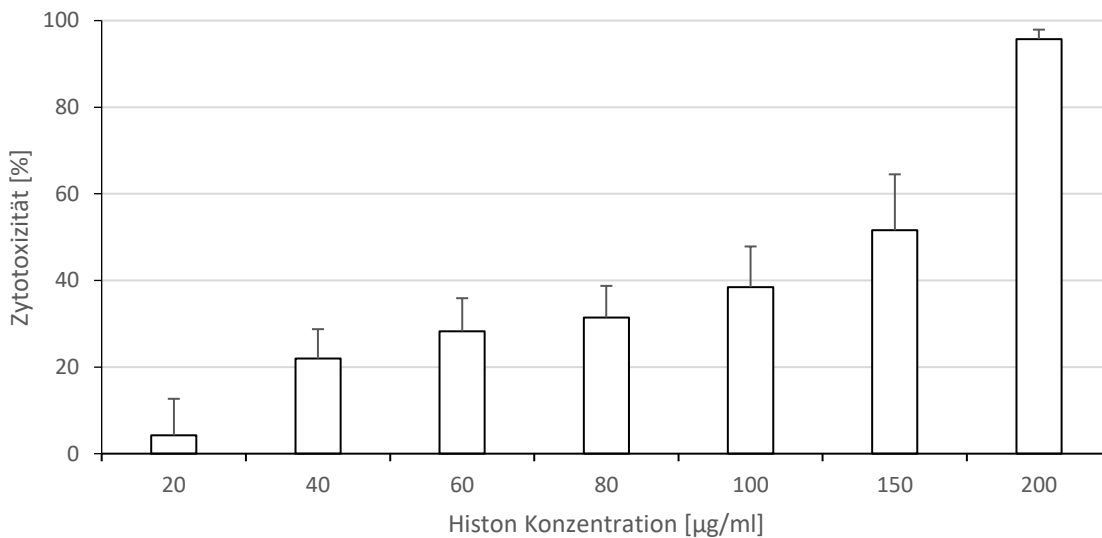


Abbildung 16: Histon-vermittelte Zytotoxizität auf 5B8-Zellen.

Zytotoxizitäts-Assay nach Inkubation der 5B8-Zellen mit Histonen. Es zeigt sich eine konzentrationsabhängige Zellsterblichkeit. Die dargestellten Werte sind Ergebnis von drei unabhängigen Messungen.

Mit einer Korrelationskoeffizienten von $r = 0,967$ ist zu erkennen, dass von den Histonen eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität ausgeht (s. Abbildung 16). Die Histon-vermittelte Zytotoxizität bei einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ nähert sich mit einem Wert von $95,7 \pm 2,2\%$ dem oberen Kontrollwert an.

Anschließend wurde kontrolliert, inwiefern native Transferrin-Moleküle selbst zur Reduktion der Histon-vermittelten Zytotoxizität beitragen können. Hierfür wurden diese

mit Konzentrationen bis zu 200 µg/ml ebenfalls mit den Histonen inkubiert und dem LDH-Assay zugeführt.

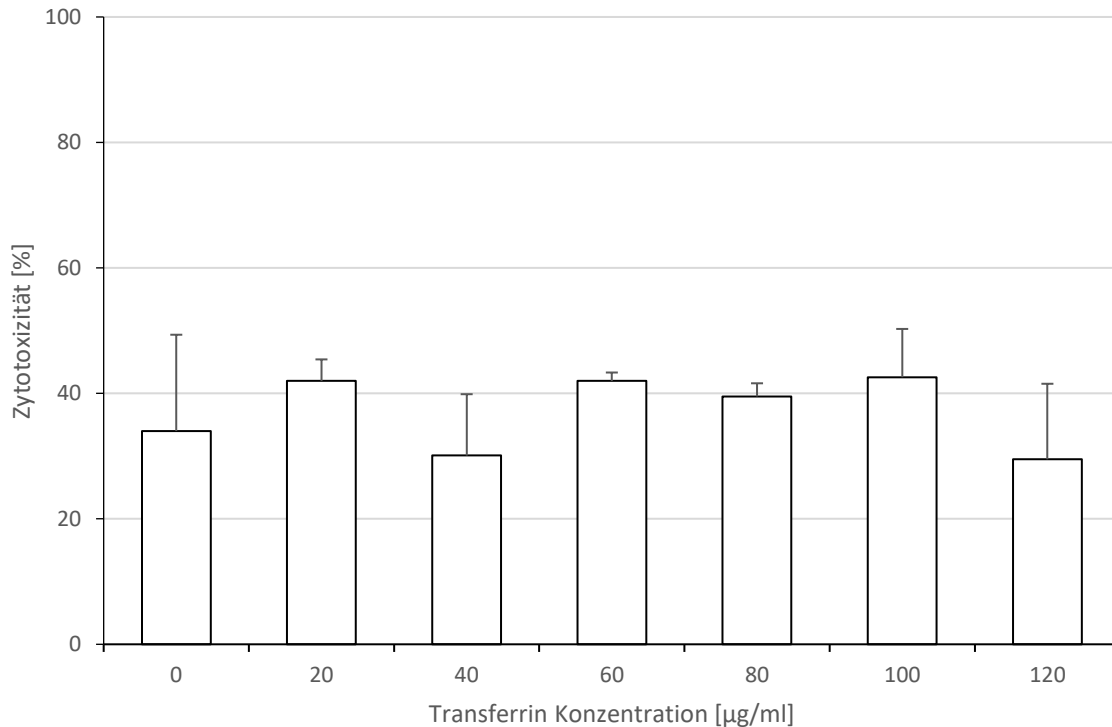


Abbildung 17: Histon-vermittelte Zytotoxizität bei Inkubation mit Transferrin

Dargestellt sind die Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Assay nach Inkubation der 5B8-Zellen mit 80 µg/ml Histonen sowie ansteigender Konzentration von Transferrin. Die Werte sind Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse. Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied bei Zugabe von Transferrin.

Bei Inkubation der 5B8-Zellen mit Histonen und nativem Transferrin zeigt sich eine Zytotoxizität von durchschnittlich $37.1 \pm 5.8\%$ im Vergleich zu $42.3 \pm 11.0\%$ bei der Inkubation nur mit Histonen.

Für die Reduktion der Histon-vermittelten Zytotoxizität nach Inkubation der 5B8-Zellen mit nativem Transferrin ergibt sich somit kein signifikanter Unterschied. Mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = -0.03$ liegt keine konzentrationsabhängige Zytotoxizitätsreduktion der Transferrin-Konzentration vor.

Für die folgenden Versuche ist somit anzunehmen, dass die Histon-vermittelte Zytotoxizität nicht durch das Transferrin reduziert wird.

In den weiteren Zytotoxizitäts-Assays wurde die Zellsterblichkeit bei konstanter Histone-Konzentration (80 $\mu\text{g/ml}$) in Kombination mit steigenden Konzentrationen nativer PolySia bzw. der polysialylierten Transferrinmoleküle verglichen.

Aus vorhergehenden Versuchen bezüglich der Kettenlänge der verwendeten PolySia war eine durchschnittliche DP ≈ 50 bestimmt worden (Galuska et al. 2017c; Galuska et al. 2017a). Für die erste Messung werden die 5B8-Zellen aufsteigend mit nativen PolySia-Konzentrationen bei konstanter Histone-Konzentration inkubiert. In der zweiten Gruppe wurden die polysialylierten Transferrinmoleküle in äquivalenter Konzentration zu der nativen PolySia mit den Histonen inkubiert. Zwecks Vergleichbarkeit der Zytotoxizität wurden hierfür die berechneten molaren Verhältnisse (s. Sialyierungsgehalt der Proteine) zur Berechnung der zu applizierenden Transferrin-Konzentration zu Hilfe genommen.

Es ist also zu prüfen, ob und inwiefern die Applikationsform (native PolySia vs. polysialyliertes Trägermolekül) die Histone-vermittelte Zytotoxizität beeinflusst.

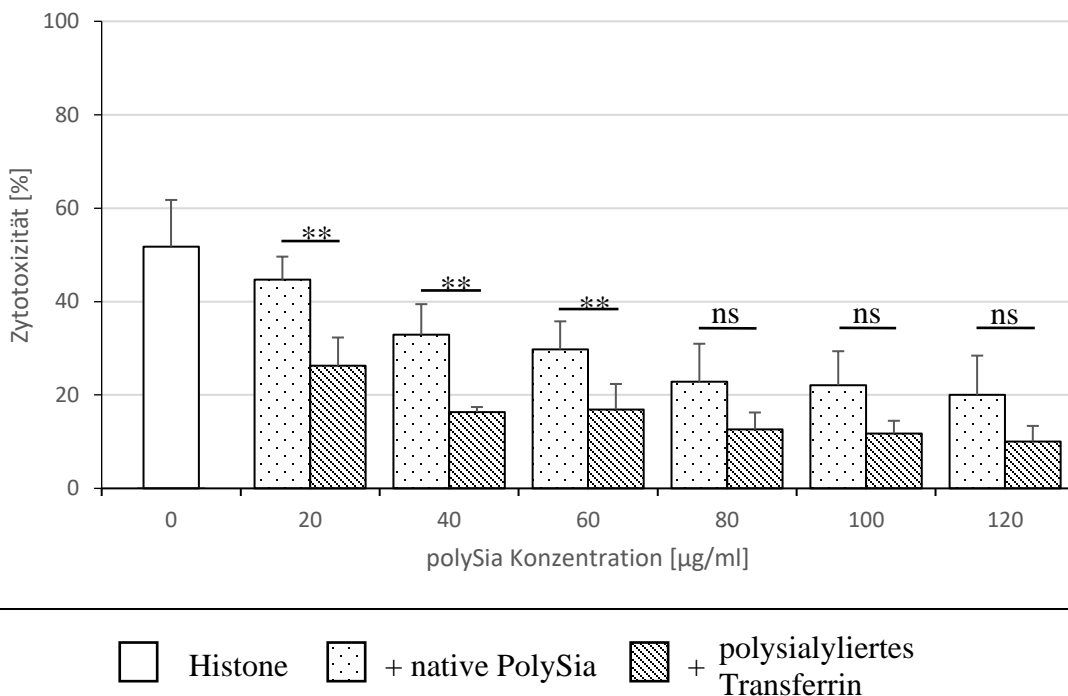


Abbildung 18: Zytotoxizitätsreduktion - native PolySia vs. polysialyliertes Transferrin

5B8-Zellen wurden mit Histone 80 $\mu\text{g/ml}$ und jeweils aufsteigender Konzentration nativer PolySia oder polysialyliertem Transferrin inkubiert und dem Zytotoxizitäts-Assay zugeführt. Die dargestellten Werte sind Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse. ns, nicht signifikant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Mittels des oben beschriebenen Zytotoxizitätsassays wurde eine Zytotoxizitätsreduktion durch PolySia und der polysialylierten Transferrinmoleküle nachgewiesen. Bei freier PolySia kommt es zu einem konzentrationsabhängigen Abfall der relativen Zytotoxizität auf bis zu $46,7 \pm 23,7\%$. Die polysialylierten Transferrinmoleküle konnten die Histon-vermittelte relative Zytotoxizität auf bis zu $22,0 \pm 6,2\%$ reduzieren (s. Abbildung 18).

Darüber hinaus lässt sich bei initial geringerer Konzentration eine vergleichsweise stärkere Zytotoxizitätsreduktion gekoppelter PolySia im Vergleich zu nativer PolySia beschreiben. So ließ sich die relative Zytotoxizität bei geringeren Konzentration bereits halbieren und bei höheren Konzentrationen sogar vierteln, wohingegen native PolySia bei äquivalenter Konzentration die relative Zytotoxizität maximal halbieren konnte. Dieser Effekt schlägt sich durch statistische Auswertung in einer signifikanten Reduktion der Histon-vermittelten Zytotoxizität für die initialen Konzentrationen nieder.

5.5 Polysialylierung von Nanopartikel

Zusätzlich zu Transferrin sollten auch Nanopartikel polysialyliert werden. Dies hätte den Vorteil, dass man kostengünstige Materialien als Träger verwenden kann. Zudem können Nanopartikel mit zusätzlichen Proteinen oder chemischen Wirkstoffen beladen werden. Über PolySia könnte so zum einen die Zytotoxizität von Histonen reduziert und zum anderen parallel auch therapeutisch nützliche Moleküle in NET-positiven Bereichen im Körper angereichert werden. PolySia würde somit als molekularer Anker fungieren, welcher NET-Formationen über die Interaktion mit den darin enthaltenen Histonen binden kann.

Die Sialylierung von Nanopartikel, die Aminogruppen an der Oberfläche aufweisen, verlief vergleichbar zu der Proteinkopplung durch reduktive Aminierung. Nach der chemischen Reaktion wurde auch hier mittels HPLC überprüft, ob es zur Polysialylierung gekommen ist.

Die PolySia-Konjugate wurden äquivalent zu den Proteinen hydrolysiert, ultrafiltriert und der HPLC-Analyse zugeführt. Die Ergebnisse der HPLC-Analysen zeigen, dass auch Aminogruppen tragende Partikel äquivalent polysialyliert werden können (s. Abbildung 19).

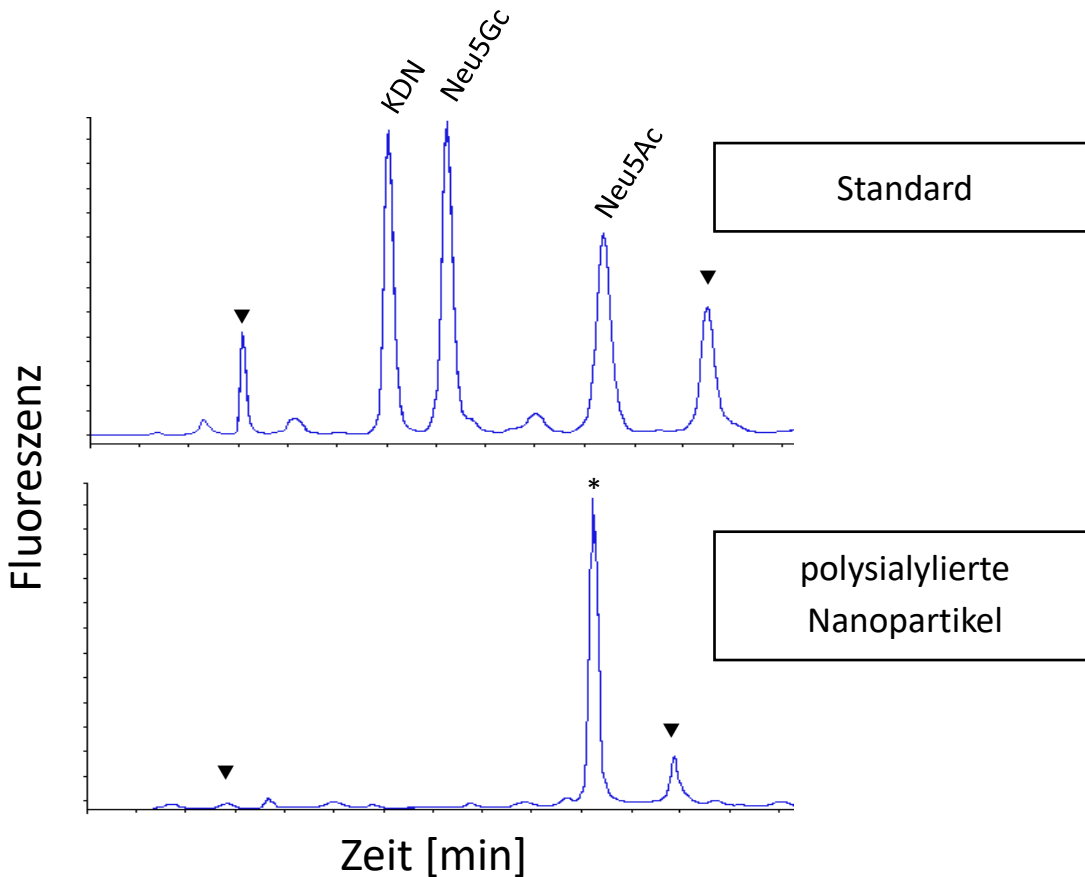


Abbildung 19: HPLC-Analyse polysialylierter Nanopartikel

Analysiert wurde das Hydrolysat der modifizierten Nanopartikel. Neu5Ac-Reste sind hierbei lediglich nach reduktiver Aminierung nachweisbar (*). Signale, die auf das DMB-Reagenz zurückzuführen sind, wurden mit Pfeilen gekennzeichnet (▼).

Die von mir erfolgreich entwickelten und darauf basierend hergestellten polysialylierten Partikel wurden innerhalb unserer Nachwuchsforschergruppe von verschiedenen Mitgliedern noch für zahlreiche Experimente verwendet, um deren Funktionalität zu

charakterisieren. Auch wenn diese Versuchsreihen nicht Teil der Ergebnisse meiner Inauguraldissertation sind, möchte ich sie hier in den folgenden Abschnitt kurz erläutern:

Zunächst wurde überprüft, ob auch an Nanopartikel gekoppelte PolySia weiterhin Histone inaktivieren kann. Äquivalent zu meinen polysialylierten Transferrinmolekülen wurden Zellen mit Histonen behandelt. Es zeigte sich, dass die von mir entwickelten Nanopartikel auch die Zytotoxizität von Histonen inhibieren (s. Abbildung 20) (Galuska et al., 2017a).

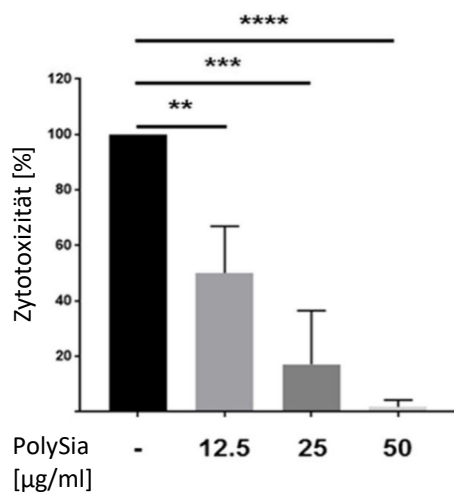


Abbildung 20: Zytotoxizitätsreduktion polysialylierter Nanopartikel.

Die Zytotoxizität von Histonen (schwarzer Balken) konnte konzentrationsabhängig durch die polysialylierten Partikel inhibiert werden. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse. ns, nicht signifikant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Abbildung aus (Galuska et al., 2017a) CC BY.

Des Weiteren wurde überprüft, ob bakterielle Sialidasen, die eigentlich ein freies nicht-reduzierendes Ende von PolySia benötigen, die chemisch oxidierten und gekoppelten Ketten degradieren können. Wie zu erwarten war, kam es nicht zur Freisetzung von Neu5Ac-Resten durch die Sialidasen (s. Abbildung 21) (Galuska et al., 2017a).

Somit kann mit der von mir entwickelten und durchgeführten Kopplungsstrategie Sialidase-resistente polysialylierte Konjugate produziert werden, die weiterhin biologisch aktiv sind, um zytoprotektiv zu wirken.

Abschließend wurde noch überprüft, ob die Histon-bindenden PolySia-Ketten auch mit NET interagieren können. Hierfür wurden fluoreszierende Partikel polysialyliert. Wenn man *in vitro* auf NET-Fasern polysialylierte Fluoreszenzpartikel aufträgt, kommt es zu einer Akkumulierung dieser (s. Abbildung 22) (Galuska et al., 2017a). Unpolysialylierte fluoreszenzmarkierte Nanopartikel zeigten hingegen keine vergleichbare Anreicherung.

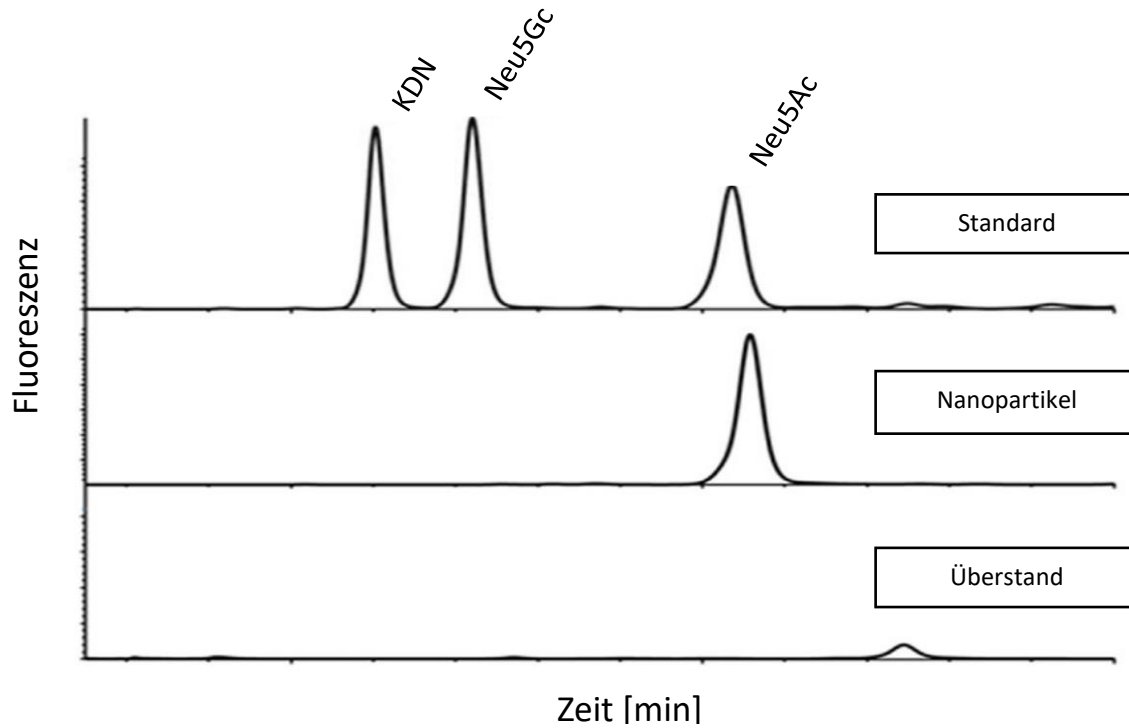


Abbildung 21: Sialidase-resistente polysialylierte Nanopartikel

Die polysialylierten Nanopartikel wurden mit bakteriellen Sialidasen inkubiert. Anschließend wurde im Hydrolysat der polysialylierten Nanopartikel sowie im Überstand der Inkubation Neu5Ac mittels HPLC bestimmt. Mod. Abbildung aus (Galuska et al., 2017a) CC BY.

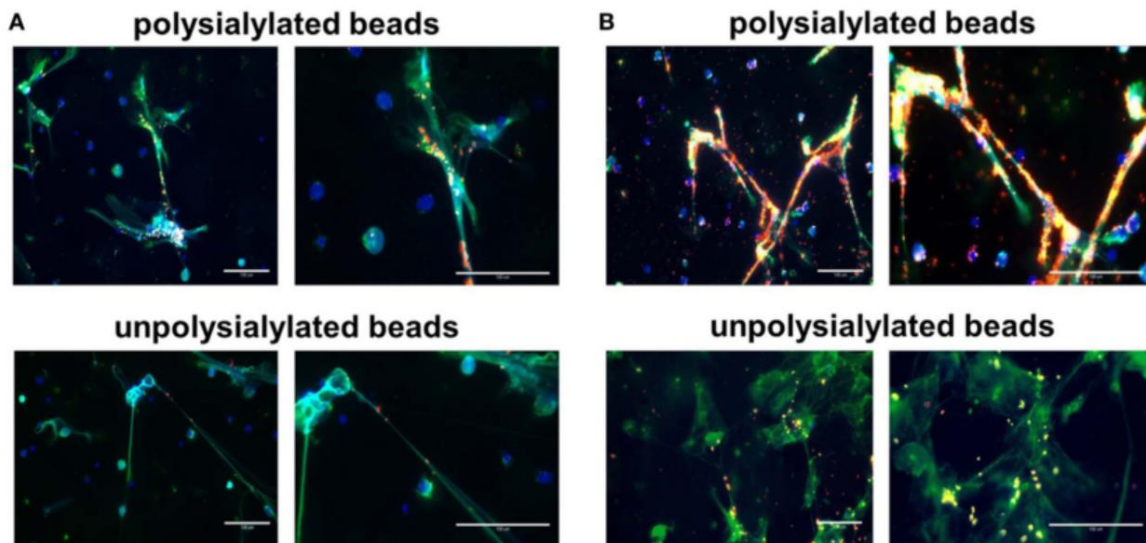


Abbildung 22: Polysialylierte Fluoreszenzpartikel akkumulieren an NET.

Unpolysialylierte und polysialylierte Fluoreszenzpartikel (rote Partikel) wurden in zwei verschiedenen Konzentrationen mit NET inkubiert. NET wurde visualisiert indem DNA blau und Neutrophile Elastase grün angefärbt wurden. Abbildung aus (Galuska et al., 2017a) CC BY

6 Diskussion

6.1 Ergebnisbezogene Diskussion

Die Untersuchungen, die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführt wurden, legen unterschiedliche Schlussfolgerungen nahe.

Zunächst wurden polysialylierte Glykokonjugate am Beispiel des humanen Transferrins hergestellt. Die Oxidation von PolySia, welche für die effektive Kopplung nötig ist, wurde mittels C7/C9-Methode nach Sato nachgewiesen (Sato und Kitajima 2013).

Die abschließende Polysialylierung der Transferrinmoleküle wurde mittels SDS-PAGE und anschließenden Western Blot qualitativ nachgewiesen werden (Simon et al. 2013). Das charakteristische Verschmieren der Proteinbanden von polysialylierten Proteinen konnte ebenso beobachtet werden. Überraschend war, dass auch unpolysialyliertes Transferrin visualisiert wurde, da Transferrin nur Monosialinsäuren aufweist (Denecke, 2009). Hier ist jedoch die unspezifische Immunfärbung vom Vorteil, da so direkt das Molekulargewicht vom nativen und vom polysialylierten Transferrin miteinander verglichen werden konnte.

Das Erhöhen des Molekulargewichts nach chemischer Polysialylierung ist heterogen und es kommt zu keiner scharfen Bande. Dies ist damit zu begründen, dass zur Kopplung nicht eine definierte Kettenlänge verwendet wurde, sondern ein Gemisch aus verschiedenen Kettenlängen. Zudem sind wahrscheinlich nicht alle freien Aminogruppen des Aminosäurerückgrats von Transferrin chemisch modifiziert worden, da chemische Reaktionen oft nicht zu 100% ablaufen und einer statistischen Normalverteilung folgen. Ebenso werden auch nicht bei allen Transferrinmolekülen die Anzahl der polysialylierten Aminogruppen identisch sein. Somit ist anzunehmen, dass die Transferrinmoleküle unterschiedlich verteilte und zusammengesetzte PolySia-Kettenlängenmuster tragen. Dies wurde jedoch bisher beim polysialylierten Transferrin nicht detailliert charakterisiert und ist auch schwer experimentell durchzuführen. Es wurde jedoch der durchschnittliche Sialyierungsgehalt bestimmt.

Methodisch angelehnt an die bereits durchgeführten Polysialylierungen von Fernandes et al. konnte in einem weiteren Schritt ein molares Verhältnis von $\text{sia}^\circ = 4.23 \pm 1.2$ respektive 7,29% sialylierter Lysin-Reste errechnet werden. Das Ergebnis fällt vergleichsweise niedriger aus als in den Versuchsreihen von Fernandes (Fernandes und Gregoriadis 1997).

Dieser konnte molare Verhältnisse von bis zu $\text{sia}^\circ = 5.5 \pm 0.6$ bei der Kopplungsreaktion mit Asparaginase erzielen. Unter gleichen Versuchsbedingungen erzielten andere Arbeitsgruppen mit $\text{sia}^\circ \approx 7.2$ höhere Ergebnisse (Wang et al. 2000). Hingegen wurden bei Polysialylierungsversuchen von Katalase lediglich Sialylierungsgrade von $\text{sia}^\circ = 3.8 \pm 0.4$ erzielt (Fernandes und Gregoriadis 1996). Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte bei der Polysialylierung von Pseudocholinesterase einen $\text{sia}^\circ \approx 6$ (Terekhov et al. 2015; Ilyushin et al. 2013).

Der Sialylierungsgrad lässt sich anhand der potenziell konjugierbaren Lysinreste der Proteine berechnen. Es ergibt sich mit einem niedrigeren Lysin-Anteil des Transferrins ein Wert von 7.2%. i. Vgl. zu 7.9% (Fernandes und Gregoriadis 1997). Der relativ hohe Prozentsatz sialylierter Lysin-Reste im Fall der Pseudocholinesterase von 16.2% (Terekhov et al. 2015) deutet bereits auf die Schwierigkeiten bei der Interpretation dieses Wertes hin. Bei dieser theoretischen Überlegung wird lediglich der Primärstruktur, allerdings nicht ihrer Konformation respektive höheren Strukturen Rechnung getragen. Interne Lysin-Reste, welche somit einer Sialylierung nicht zugänglich sind, werden nicht berücksichtigt.

Interessanterweise ist bei der Betrachtung der molaren Verhältnisse zu erkennen, dass sich bei der Konjugation oxidierter PolySia ohne Reduktionsmittel ein mit $\text{sia}^\circ = 0,63 \pm 0,11$ ebenfalls erhöhter Sialylierungsgrad im Vergleich zur Negativkontrolle berechnen lässt. Dies ist damit zu erklären, dass sich hier Schiff'sche Basen mit instabilen Imin-Bindungen ausbilden (s. Abbildung 11). Unter Umständen kann dies trotz der folgenden Waschgänge zu chromatographisch noch messbaren Sialinsäure-Residuen führen.

Nach der erfolgreichen Polysialylierung wurde getestet, ob polysialyliertes Transferrin die Zytotoxizität von extrazellulären Histonen inhibiert. Zunächst wurde die beschriebene konzentrationsabhängige Histon-vermittelte Zytotoxizität überprüft. Diese rangiert bei Konzentrationen von 20 – 200 $\mu\text{g/ml}$ zwischen $4,23 \pm 8,44 \%$ und $95,74 \pm 2,17 \%$. Die gemessene Zytotoxizität ist mit den vorherigen Messungen anderer Studien vereinbar (Saffarzadeh et al. 2012).

Für die weiteren Untersuchungen erfolgte zunächst als Negativkontrolle die Messung der Histon-vermittelten Zytotoxizität in Beisein von ansteigenden Konzentrationen nativer

Transferrinmoleküle. Transferrin hatte keinen signifikanten Effekt auf die Zytotoxizität von Histonen.

Neben nativen Transferrin wurde auch ungekoppelte PolySia als Kontrolle eingesetzt. Die publizierte Zytotoxizitätsreduktion von nativen PolySia-Ketten konnte bestätigt werden und es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der Histon-vermittelten relativen Zytotoxizität wie sie bereits zuvor beschrieben wurde (Galuska et al. 2017c; Saffarzadeh et al. 2012). Parallel wurde polysialyliertes Transferrin eingesetzt. Dabei wurde adaptiert an die Konzentrationen der nativen PolySia das chemisch polysialylierte Transferrin mit den Histonen inkubiert. Hier konnte eine Reduktion der relativen Zytotoxizität auf bis zu $22,0 \pm 6,2\%$ ermittelt werden.

Des Weiteren zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (PolySia vs. polysialyliertes Transferrin) bereits bei geringer Konzentration. Dies könnte damit zu tun haben, dass die eng beieinanderliegenden PolySia-Ketten am Transferrin Histone besser komplexieren bzw. umschließen können.

Die Anreicherung der von mir entwickelten und hergestellten polysialylierter Nanopartikel ist Gegenstand der weiteren Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe gewesen. Die fluoreszenzmikroskopisch generierten Bilder zeigen eine deutliche Affinitätsanreicherung der Nanopartikel an den NET-Formationen nach erfolgreicher Polysialylierung.

Es konnte bereits mittels nativer Gelelektrophorese sowie 3D-Simulationen gezeigt werden, dass PolySia-Ketten an Bereichen der DNA-Bindungsstellen von Histonen binden können (Galuska et al. 2017a). Dabei zeigte sich, dass die Zuckerketten sich ähnlich wie die DNA um Histonkomplexe herumwinden können (s. Abbildung 3). Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder stützen diese Hypothese.

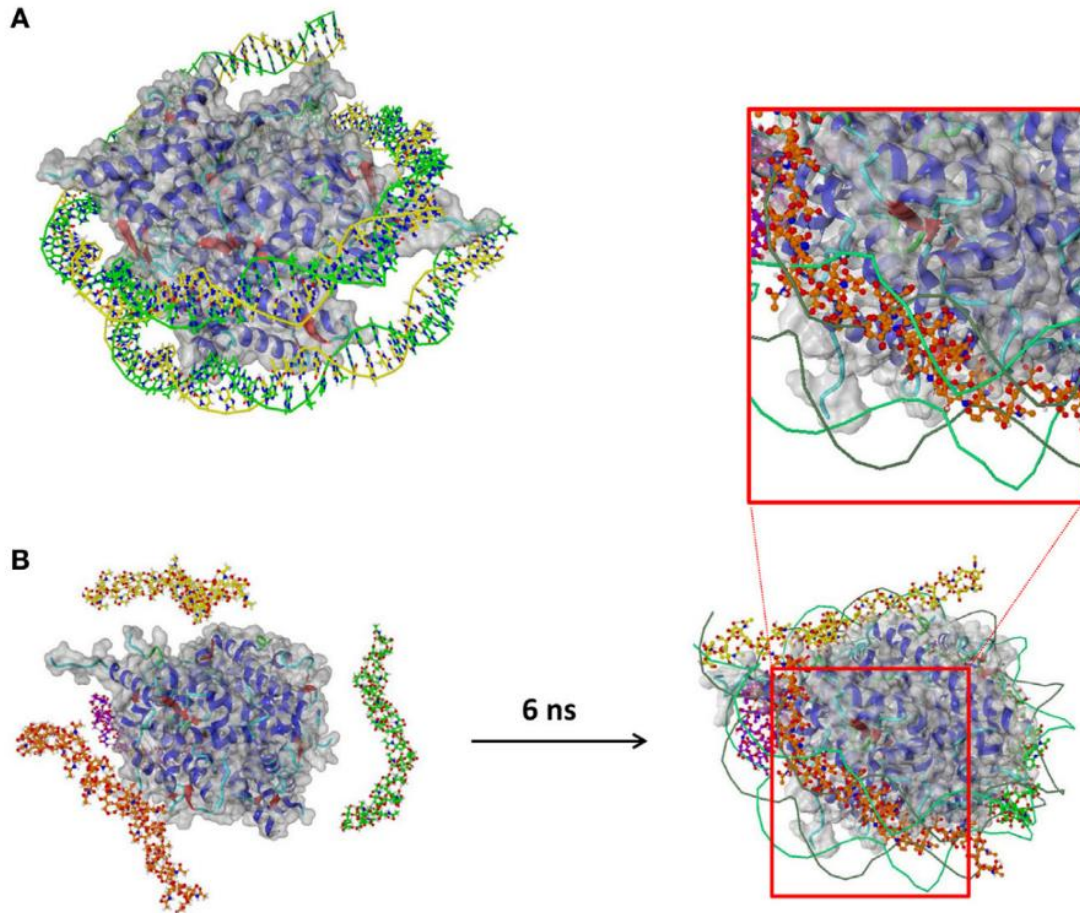


Abbildung 23: Simulation der Molekulardynamik von PolySia und Histonen.

(A) Nukleosom-Komplex mit Histon (grau) und 1,75 -fach gewundener DNA (gelb/grün). Der Histon-Anteil des Komplexes wurde als Rezeptor in einer Bindungs-Simulation nach Entfernung der DNA-Fragmente genutzt.

(B) vier PolySia-Ketten wurde in unmittelbare Nähe zum Histon in wässriger Lösung platziert (H_2O ausgeblendet). Nach 6ns haben die PolySia-Ketten an die DNA-Bindungsstelle der Histone gebunden. Abbildung aus (Galuska et al., 2017a) CC BY.

Zusammenfassend konnte somit durch meine Entwicklung eine Basis geschaffen werden, um zukünftig polysialylierte Transportsystem zu entwickeln, welche über die Interaktion mit NET-Formationen Therapeutika an solche immunologische Hot Spots akkumulieren könnten (s. Abbildung 24)(Galuska et al. 2017a).

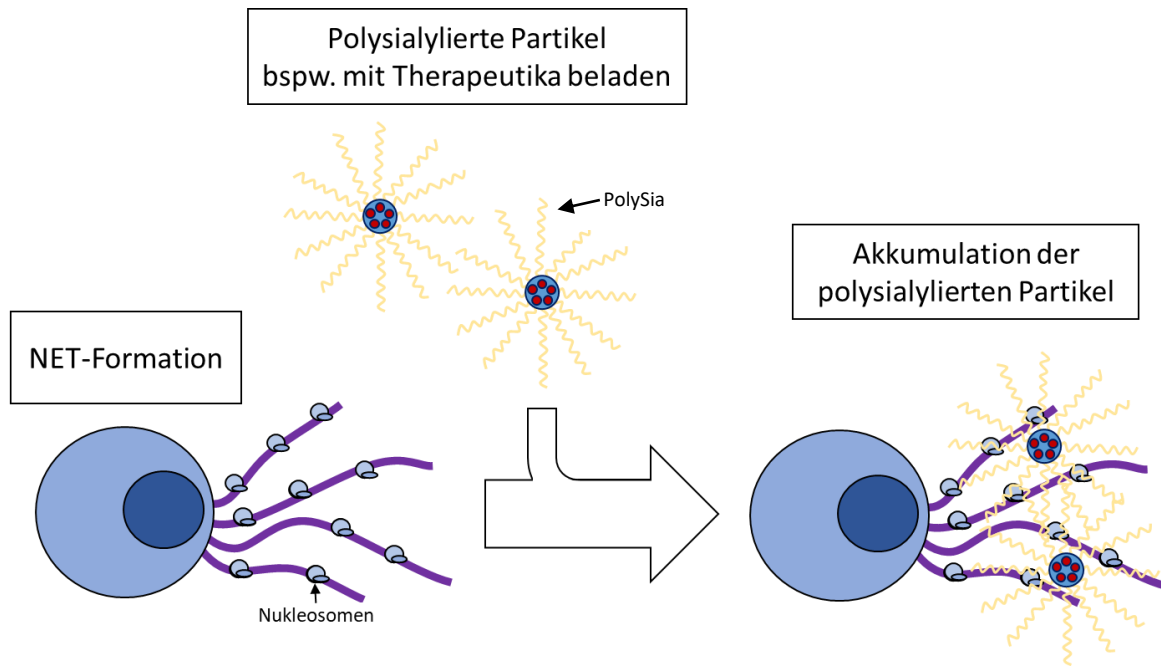


Abbildung 244: Akkumulation von polysialylierten Nanopartikeln an NET-Formationen.

Polysialylierte Nanopartikel sind dazu in der Lage, mittels ihrer PolySia-Ketten an Histonen und dekondensierter DNA zu binden und zu akkumulieren. Modell basierend auf (Galuska et al. 2017a) CC BY.

6.2 Limitationen und methodische Einschränkungen

Hinsichtlich der Methodik lassen sich einige Limitationen und Einschränkungen für die Aussagekraft der generierten Ergebnisse erkennen.

Bei der Polysialylierung der Proteine wurde nach der reduktiven Aminierung nicht festgestellt, ob PolySia in ihrem Polymerisationsgrad konstant geblieben sind. Die Quantifizierung des Sialylierungsgehalts mittels HPLC beruht darauf, dass das Polymer komplett hydrolysiert wird und die Neu5Ac-Monomere DMB-markiert werden. Dieses Prinzip ist hervorragend dafür geeignet, kleinste Mengen an Sialinsäuren zu detektieren und zu quantifizieren. Es werden jedoch nicht die Kettenlängen bestimmt.

Der in dieser Arbeit verwendete durchschnittliche Polymerisationsgrad von 50 Monomeren basiert auf der Annahme, dass die Colominsäure, welche hier verwendet wurde nach der

reduktiven Aminierung und anschließenden Aufreinigung konstant geblieben ist. Bei ähnliche Kopplungsversuchen bleibt trotz Nutzung einer kolorimetrischen Methode zur Bestimmung der Sialinsäure-Konzentration die Frage nach der Kettenlänge nach der chemischen Glykosylierung offen (Fernandes und Gregoriadis 1997, 1996).

Die durchschnittliche Polymerlänge von $DP \approx 50$ wurde im Vorfeld mithilfe der Anionen-Austausch-HPLC für die genutzte PolySia kalkuliert. Es wurde jedoch in vorherigen Untersuchungen gezeigt, dass eine statistisch signifikante Reduktion der Histon-vermittelten Zytotoxizität erst bei Kettenlängen von $DP \geq 30$ statistisch signifikant nachzuweisen ist (Galuska et al. 2017c). Demzufolge ist bei der gezeigten Reduktion der Histon-vermittelten Zytotoxizität dieser Polymerisationsgrad mindestens anzunehmen.

In letzter Konsequenz ist die Bestimmung der Kettenlänge von PolySia nach Konjugation jedoch als nächster Schritt unabdingbar. Dies betrifft vor allem die Aussagekraft des Sialylierungsgrades der Glykokonjugate für die Reduktion der Zytotoxizität (Zlatina et al. 2017). Methodische Schwierigkeiten sind bei der trägernahen Abspaltung der Polymere von den Vehikeln ohne interne Kettenbrüche zu erwarten. Vorherige Ergebnisse lassen darauf schließen, dass ein steigender Polymerisationsgrad von nativer PolySia mit einer Reduktion der Zytotoxizität einhergeht. Diese Frage kann für die in meiner Arbeit hergestellten polysialylierten Makromoleküle nicht beantwortet werden.

Wie bereits eingangs erwähnt ist ebenso zwischen den unterschiedlichen NET-Formationen zu differenzieren. Bislang wurde nur mithilfe von nicht physiologischen PMA und mittels des natürlichen Stimuli LPS eine Akkumulierung von polysialylierten Makromolekülen beobachtet (s. Abbildung 25). Diese Ergebnisse lassen jedoch beispielsweise keine Rückschlüsse auf die vitale NET-Formationen zu. Um weiterführende Aussagen treffen zu können, sind ergänzende *in vivo* Untersuchungen mit weiteren physiologischen Stimuli für die Bildung von NET sinnvoll.

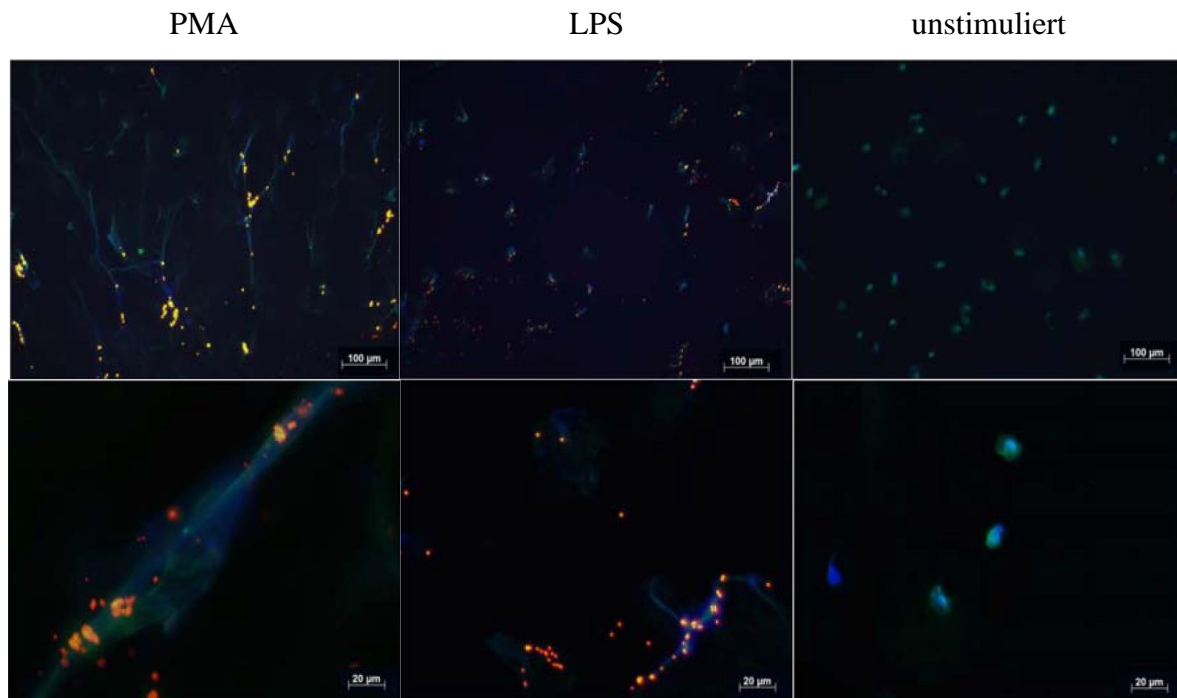


Abbildung 25: Stimulation Neutrophiler Granulozyten.

Dargestellt ist die Stimulation mit PMA (links), Lipopolysacchariden (LPS) (mittig) sowie unstimulierte Neutrophile (rechts). Fluoreszenzfärbung der DNA (blau), Neutrophile Elastase (grün), polysialylierte Nanopartikel (rot). Abb. aus (Galuska et al. 2017a) CC BY.

6.3 Ausblick

Die durchgeführten Untersuchungen bestärken das Potential von PolySia in der therapeutischen Nutzung gegen NET-assoziierte Pathologien. Die Ergebnisse liefern Grund zur Annahme, dass gekoppelte PolySia als Hybrid-Systeme funktionieren könnten. Einerseits ließe sich die Reduktion der Histon-vermittelten Zytotoxizität durch Kopplung der PolySia-Ketten potenzieren. Andererseits ist diese Kopplung selbst auch molekularer Anker für die Trägermoleküle an Histone bzw. Nukleosomen in NET-Formationen. Darüber hinaus kann die Polysialylierung selbst den enzymatischen Abbau der Trägermoleküle verhindern und somit deren Halbwertszeit verlängern.

In der Therapie NET-assoziiierter Pathologien könnte die Polysialylierung somit als sog. *drug delivery system* dienen. Unter diesen Pathologien ist aufgrund der derzeitigen Situation vor allem COVID-19 zu nennen. Hier wird aktuell NET als mögliches therapeutisches Ziel diskutiert (Barnes et al. 2020; Zuo et al. 2020). Das zu Beginn beschriebene Modifikationspotential dieser Zuckerketten lässt weitreichende Gedankenspiele zu. Nach diesem Modell ist beispielsweise die Kopplung von PolySia an das Enzym DNase denkbar, welches die Chromatinnetze der NET-Formationen aufspalten und gleichzeitig bei insgesamt verlängerter Halbwertszeit die freiwerdenden Histone zytoprotektiv abschirmen könnte.

Pilotprojekte konnten bezüglich der Halbwertszeit tatsächlich erste Erfolge verzeichnen. Kürzlich konnten polysialyliertes EPO artifiziell hergestellt werden sowie erfolgreich in Phase-1-Studien an gesunden Probanden getestet werden (Meng et al. 2018).

7 Zusammenfassung

Neutrophile Granulozyten sind in zahlreichen Immunprozessen involviert. Ein erst 2004 im Detail beschriebener Abwehrmechanismus gegen infiltrierende Pathogene stellen die neutrophilen extrazellulären Fallen dar (NETs). Hierbei bilden Neutrophile Granulozyten Netzwerke aus dekontensierter DNA bestückt mit Histonen und vielfältigen antimikrobiellen Substanzen, welche in den Extrazellularraum ausgeschüttet werden. Die Bildung von NETs wird mittlerweile mit einer Vielzahl an Erkrankungen in Zusammenhang gebracht (wie bspw. Sepsis oder akutes Lungenversagen), wobei der Hauptteil der Zytotoxizität aus der Akkumulation extrazellulärer Histone resultiert.

Das Polysaccharid Polysialinsäure (PolySia) stellt einen natürlichen Antagonisten dieser Histon-vermittelten Zytotoxizität dar. Am Vorbild polysialylierter Trägermoleküle wurden innerhalb dieser Arbeit polysialylierte Transferrin- und Nanopartikel-Konjugate entwickelt. Da Sialidasen gehäuft in NET-Formationen vorkommen, wurde bei der Glykosylierung das nicht-reduzierende Ende dieser Homopolymere geschützt. Dies war durch Oxidation der terminalen Sialinsäure und unmittelbarer reduktiver Aminierung an die Trägermoleküle möglich. Die Oxidation wurde chromatographisch mittels DMB-Markierung und HPLC-Analyse bestätigt. Der Kopplungserfolg konnte zunächst qualitativ mittels Western Blot nachgewiesen werden. Anschließend erfolgte die Quantifizierung des Sialyierungsgehalts des polysialylierten Transferrins. Hierfür wurden die gekoppelten PolySia hydrolytisch abgespalten und ebenso chromatographisch gemessen.

Darüber hinaus wurden die polysialylierten Glykokonjugate mit 5B8-Zellen inkubiert und deren Zytotoxizität mittels LDH-Assay untersucht. Die kovalent gebundenen PolySia-Ketten waren dazu in der Lage, die Histon-vermittelte Zytotoxizität stärker als native PolySia zu reduzieren.

Zudem wurden PolySia tragende Nanopartikel entwickelt, um das Bindungsverhalten polysialylierter Makromoleküle an NET zu charakterisieren. Die polysialylierten Nanopartikel akkumulierten wesentlich stärker an den NET-Formationen, sodass eine spezifische Bindung angenommen werden kann. Somit könnten sich PolySia-Ketten als molekularer Anker zur Akkumulation von aktiven Substanzen an NET-Formationen nutzen.

8 Abstract

Neutrophils are involved in numerous immunological events. One mechanism of neutrophils to combat pathogens is the formation of neutrophil extracellular traps (NETs). Thereby, neutrophils use DNA fibers to form a meshwork of DNA and histones as well as several antimicrobial components to trap and kill invaders. However, the formation of NETs can lead to pathological conditions triggering among other things (e.g., sepsis or acute lung failure), which is mainly a consequence of the cytotoxic characteristics of accumulated extracellular histones.

The carbohydrate polysialic acid (polySia) represents a naturally occurring antagonist of the cytotoxic properties of extracellular histones. Inspired by polysialylated vesicles, we developed polysialylated nanoparticles. Since sialidases are frequently present in areas of NET formation, we protected the sensitive non-reducing end of these homopolymers. To this end, the terminal sialic acid residue of the non-reducing end was oxidized and directly coupled to transferrin and nanoparticles. Oxidation was confirmed via DMB-labelling and subsequent HPLC analysis. Furthermore the degree of sialylation was measured by hydrolyzation of the polySia-residues and chromatographic analysis. After that the polysialylated glycoconjugates were incubated with 5B8-cells and histones. The cytotoxicity was measured by LDH-assays. The covalently linked sialidase-resistant polysialic acid chains neutralize histone-mediated cytotoxicity more efficient than native polySia acid chains.

In addition, polySia carrying nanoparticles were developed to characterize the binding of polysialylated macromolecules to NET. We observed via fluorescent microscopy, that the polysialylated particles bind to the NET filaments. Thus, polySia chains might act as an anchor to accumulate nanoparticles loaded with active substances in areas of NET formation.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: terminale Sialinsäure-Monomere in der Glykokalyx.....	2
Abbildung 2: Sialinsäure-Monomere	3
Abbildung 3: chemische Struktur von PolySia	5
Abbildung 4: polysialyliertes NCAM	7
Abbildung 5: Enzymabbau terminaler Sialinsäuren durch Sialidasen	9
Abbildung 6: Zytotoxizitätsreduktion durch Polysialylierung zervikaler Mucine.....	11
Abbildung 7: Abwehrmechanismen neutrophiler Granulozyten	13
Abbildung 8: intrazellulärer Signalweg bei lytischer NET-Formation, Mod. nach (Nel et al. 2016) CC BY.....	16
Abbildung 9: DMB-Markierung von PolySia.....	25
Abbildung 10: C7/C9-Methode nach Sato	28
Abbildung 11: Kopplung von PolySia mittels reduktiver Aminierung.....	29
Abbildung 12: HPLC von nativer Colominsäure	35
Abbildung 13: HPLC-Ergebnis der C7/C9-Methode nach Sato	36
Abbildung 14: Western Blot polysialylierter Transferrin-Moleküle.....	37
Abbildung 15: Sialylierungsgrad von polysialyliertem Transferrin	39
Abbildung 16: Histon-vermittelte Zytotoxizität auf 5B8-Zellen.	40
Abbildung 17: Histon-vermittelte Zytotoxizität bei Inkubation mit Transferrin	41
Abbildung 18: Zytotoxizitätsreduktion - native PolySia vs. polysialyliertes Transferrin....	42
Abbildung 19: HPLC-Analyse polysialylierter Nanopartikel.....	44
Abbildung 20: Zytotoxizitätsreduktion polysialylierter Nanopartikel.	45
Abbildung 21: Sialidase-resistente polysialylierte Nanopartikel	46
Abbildung 22: Polysialylierte Fluoreszenzpartikel akkumulieren an NET.	46
Abbildung 23: Simulation der Molekulardynamik von PolySia und Histonen.	50
Abbildung 244: Akkumulation von polysialylierten Nanopartikeln an NET-Formationen. 51	
Abbildung 25: Stimulation Neutrophiler Granulozyten.....	53

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: NET-Bestandteile, mod. nach (Nel et al. 2016) CC BY. 15

9.3 Literaturverzeichnis

Abbas, Abul K.; Lichtman, Andrew H.; Pillai, Shiv (2014): Basic immunology. Functions and disorders of the immune system. Unter Mitarbeit von David L. Baker und Alexandra Baker. Fourth edition. Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders.

Arazna, Magdalena; Pruchniak, Michal P.; Zycinska, Katarzyna; Demkow, Urszula (2013): Neutrophil extracellular trap in human diseases. In: *Advances in experimental medicine and biology* 756, S. 1–8. DOI: 10.1007/978-94-007-4549-0_1.

Athens, J. W.; Haab, O. P.; Raab, S. O.; Mauer, A. M.; Ashenbrucker, H.; Cartwright, G. E.; Wintrobe, M. M. (1961): LEUKOKINETIC STUDIES. IV. THE TOTAL BLOOD, CIRCULATING AND MARGINAL GRANULOCYTE POOLS AND THE GRANULOCYTE TURNOVER RATE IN NORMAL SUBJECTS*. In: *Journal of Clinical Investigation* 40 (6), S. 989–995.

Bainton, Dorothy Ford; Ulliyot, Joan L.; Farquhar, Marilyn G. (1971): THE DEVELOPMENT OF NEUTROPHILIC POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES IN HUMAN BONE MARROW : ORIGIN AND CONTENT OF AZUROPHIL AND SPECIFIC GRANULES. In: *The Journal of Experimental Medicine* 134 (4), S. 907–934.

Barnado, April; Crofford, Leslie J.; Oates, Jim C. (2016): At the Bedside: Neutrophil extracellular traps (NETs) as targets for biomarkers and therapies in autoimmune diseases. In: *Journal of leukocyte biology* 99 (2), S. 265–278. DOI: 10.1189/jlb.5BT0615-234R.

Barnes, Betsy J.; Adrover, Jose M.; Baxter-Stoltzfus, Amelia; Borczuk, Alain; Cools-Lartigue, Jonathan; Crawford, James M. et al. (2020): Targeting potential drivers of

COVID-19: Neutrophil extracellular traps. In: *The Journal of Experimental Medicine* 217 (6). DOI: 10.1084/jem.20200652.

Barry, G. T.; Goebel, W. F. (1957): Colominic acid, a substance of bacterial origin related to sialic acid. In: *Nature* 179 (4552), S. 206. DOI: 10.1038/179206a0.

Berthelot, Jean-Marie; Le Goff, Benoit; Neel, Antoine; Maugars, Yves; Hamidou, Mohamed (2017): NETosis: At the crossroads of rheumatoid arthritis, lupus, and vasculitis. In: *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* 84 (3), S. 255–262. DOI: 10.1016/j.jbspin.2016.05.013.

Bonten, E.; van der Spoel, A.; Fornerod, M.; Grosveld, G.; d'Azzo, A. (1996): Characterization of human lysosomal neuraminidase defines the molecular basis of the metabolic storage disorder sialidosis. In: *Genes & development* 10 (24), S. 3156–3169. DOI: 10.1101/gad.10.24.3156.

Bork, Kaya; Horstkorte, Rüdiger; Weidemann, Wenke (2009): Increasing the sialylation of therapeutic glycoproteins: the potential of the sialic acid biosynthetic pathway. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 98 (10), S. 3499–3508. DOI: 10.1002/jps.21684.

Bornhöfft, Kim F.; Rebl, Alexander; Gallagher, Mary E.; Viergutz, Torsten; Zlatina, Kristina; Reid, Colm; Galuska, Sebastian P. (2019): Sialylated Cervical Mucins Inhibit the Activation of Neutrophils to Form Neutrophil Extracellular Traps in Bovine in vitro Model. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 2478. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02478.

Brinkmann, Volker; Reichard, Ulrike; Goosmann, Christian; Fauler, Beatrix; Uhlemann, Yvonne; Weiss, David S. et al. (2004): Neutrophil extracellular traps kill bacteria. In: *Science (New York, N.Y.)* 303 (5663), S. 1532–1535. DOI: 10.1126/science.1092385.

Brinkmann, Volker; Zychlinsky, Arturo (2007): Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. In: *Nature reviews. Microbiology* 5 (8), S. 577–582. DOI: 10.1038/nrmicro1710.

Brusés, Juan L.; Rutishauser, Urs (2001): Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development. In: *Biochimie* 83 (7), S. 635–643. DOI: 10.1016/s0300-9084(01)01293-7.

Constantinou, A.; Epenetos, A. A.; Hreczuk-Hirst, D.; Jain, S.; Wright, M.; Chester, K. A.; Deonarain, M. P. (2009): Site-specific polysialylation of an antitumor single-chain Fv fragment. In: *Bioconjugate chemistry* 20 (5), S. 924–931. DOI: 10.1021/bc8005122.

Cools-Lartigue, Jonathan; Spicer, Jonathan; Najmeh, Sara; Ferri, Lorenzo (2014): Neutrophil extracellular traps in cancer progression. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71 (21), S. 4179–4194. DOI: 10.1007/s00018-014-1683-3.

Curreli, Sabrina; Arany, Zita; Gerardy-Schahn, Rita; Mann, Dean; Stamatou, Nicholas M. (2007): Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (42), S. 30346–30356. DOI: 10.1074/jbc.M702965200.

Drake, Penelope M.; Nathan, Jay K.; Stock, Christina M.; Chang, Pamela V.; Muench, Marcus O.; Nakata, Daisuke et al. (2008): Polysialic acid, a glycan with highly restricted expression, is found on human and murine leukocytes and modulates immune responses. In: *The Journal of Immunology* 181 (10), S. 6850–6858. DOI: 10.4049/jimmunol.181.10.6850.

Drake, Penelope M.; Stock, Christina M.; Nathan, Jay K.; Gip, Phung; Golden, Kevin P. K.; Weinhold, Birgit et al. (2009): Polysialic acid governs T-cell development by regulating progenitor access to the thymus. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (29), S. 11995–12000. DOI: 10.1073/pnas.0905188106.

Fernandes, A. I.; Gregoriadis, G. (1996): Synthesis, characterization and properties of sialylated catalase. In: *Biochimica et biophysica acta* 1293 (1), S. 90–96.

Fernandes, A. I.; Gregoriadis, G. (1997): Polysialylated asparaginase. Preparation, activity and pharmacokinetics. In: *Biochimica et biophysica acta* 1341 (1), S. 26–34.

Fuchs, Tobias A.; Abed, Ulrike; Goosmann, Christian; Hurwitz, Robert; Schulze, Ilka; Wahn, Volker et al. (2007): Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. In: *The Journal of cell biology* 176 (2), S. 231–241. DOI: 10.1083/jcb.200606027.

Fuchs, Tobias A.; Brill, Alexander; Wagner, Denisa D. (2012): Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32 (8), S. 1777–1783. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.242859.

Galluzzi, Lorenzo; Vitale, Ilio; Aaronson, Stuart A.; Abrams, John M.; Adam, Dieter; Agostinis, Patrizia et al. (2018): Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. In: *Cell death and differentiation* 25 (3), S. 486–541. DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4.

Galuska, Christina E.; Dambon, Jan A.; Kühnle, Andrea; Bornhöfft, Kim F.; Prem, Gerlinde; Zlatina, Kristina et al. (2017a): Artificial Polysialic Acid Chains as Sialidase-Resistant Molecular-Anchors to Accumulate Particles on Neutrophil Extracellular Traps. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 1229. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01229.

Galuska, Christina E.; Lütteke, Thomas; Galuska, Sebastian P. (2017b): Is Polysialylated NCAM Not Only a Regulator during Brain Development But also during the Formation of Other Organs? In: *Biology* 6 (2). DOI: 10.3390/biology6020027.

Galuska, Sebastian P.; Galuska, Christina E.; Tharmalingam, Tharmala; Zlatina, Kristina; Prem, Gerlinde; Husejnov, Farzali C. O. et al. (2017c): In vitro generation of polysialylated cervical mucins by bacterial polysialyltransferases to counteract cytotoxicity of extracellular histones. In: *The FEBS journal* 284 (11), S. 1688–1699. DOI: 10.1111/febs.14073.

Galuska, Sebastian P.; Geyer, Hildegard; Weinhold, Birgit; Kontou, Maria; Röhrich, René C.; Bernard, Ulrike et al. (2010a): Quantification of nucleotide-activated sialic acids by a combination of reduction and fluorescent labeling. In: *Analytical chemistry* 82 (11), S. 4591–4598. DOI: 10.1021/ac100627e.

Galuska, Sebastian P.; Rollenhagen, Manuela; Kaup, Moritz; Eggers, Katinka; Oltmann-Norden, Imke; Schiff, Miriam et al. (2010b): Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (22), S. 10250–10255. DOI: 10.1073/pnas.0912103107.

Gardiner, Elizabeth E.; Andrews, Robert K. (2012): Neutrophil extracellular traps (NETs) and infection-related vascular dysfunction. In: *Blood reviews* 26 (6), S. 255–259. DOI: 10.1016/j.blre.2012.09.001.

Gerardy-Schahn, R.; Bethe, A.; Brennecke, T.; Mühlenhoff, M.; Eckhardt, M.; Ziesing, S. et al. (1995): Molecular cloning and functional expression of bacteriophage PK1E-encoded endoneuraminidase Endo NE. In: *Molecular microbiology* 16 (3), S. 441–450. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02409.x.

Gregoriadis, G.; Fernandes, A.; Mital, M.; McCormack, B. (2000): Polysialic acids. Potential in improving the stability and pharmacokinetics of proteins and other therapeutics. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 57 (13-14), S. 1964–1969. DOI: 10.1007/PL00000676.

Gregoriadis, G.; McCormack, B.; Wang, Z.; Lively, R. (1993): Polysialic acids: potential in drug delivery. In: *FEBS Letters* 315 (3), S. 271–276. DOI: 10.1016/0014-5793(93)81177-2.

Hara, S.; Takemori, Y.; Yamaguchi, M.; Nakamura, M.; Ohkura, Y. (1987): Fluorometric high-performance liquid chromatography of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acids and its application to their microdetermination in human and animal sera, glycoproteins, and glycolipids. In: *Analytical biochemistry* 164 (1), S. 138–145.

Hromatka, Bethann S.; Drake, Penelope M.; Kapidzic, Mirhan; Stolp, Haley; Goldfien, Gabriel A.; Shih, Ie-Ming; Fisher, Susan J. (2013): Polysialic acid enhances the migration and invasion of human cytotrophoblasts. In: *Glycobiology* 23 (5), S. 593–602. DOI: 10.1093/glycob/cws162.

Ilyushin, Denis G.; Smirnov, Ivan V.; Belogurov, Alexey A.; Dyachenko, Igor A.; Zharmukhamedova, Tatiana Iu; Novozhilova, Tatjana I. et al. (2013): Chemical polysialylation of human recombinant butyrylcholinesterase delivers a long-acting bioscavenger for nerve agents in vivo. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (4), S. 1243–1248. DOI: 10.1073/pnas.1211118110.

Jain, Sanjay; Hreczuk-Hirst, Dale H.; McCormack, Brenda; Mital, Malini; Epenetos, Agamemnon; Laing, Peter; Gregoriadis, Gregory (2003): Polysialylated insulin. Synthesis, characterization and biological activity in vivo. In: *Biochimica et biophysica acta* 1622 (1), S. 42–49.

- Jennings, H. J.; Lugowski, C. (1981): Immunochemistry of groups A, B, and C meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugates. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 127 (3), S. 1011–1018.
- Jorch, Selina K.; Kubes, Paul (2017): An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. In: *Nature medicine* 23 (3), S. 279–287. DOI: 10.1038/nm.4294.
- Kiermaier, Eva; Moussion, Christine; Veldkamp, Christopher T.; Gerardy-Schahn, Rita; Vries, Ingrid de; Williams, Larry G. et al. (2016): Polysialylation controls dendritic cell trafficking by regulating chemokine recognition. In: *Science (New York, N.Y.)* 351 (6269), S. 186–190. DOI: 10.1126/science.aad0512.
- Knight, Jason S.; Carmona-Rivera, Carmelo; Kaplan, Mariana J. (2012): Proteins derived from neutrophil extracellular traps may serve as self-antigens and mediate organ damage in autoimmune diseases. In: *Frontiers in immunology* 3, S. 380. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00380.
- Kumar, Vinay; Robbins, Stanley L.; Kumar-Abbas-Fausto-Mitchell (2007): Robbins basic pathology. Online access + interactive extras studentconsult.com. 8. ed. Philadelphia, Pa.: Saunders Elsevier.
- Kwiatkowski, B.; Boschek, B.; Thiele, H.; Stirm, S. (1982): Endo-N-acetylneuraminidase associated with bacteriophage particles. In: *Journal of Virology* 43 (2), S. 697–704.
- Lange, Christina; Csernok, Elena; Moosig, Frank; Holle, Julia U. (2017): Immune stimulatory effects of neutrophil extracellular traps in granulomatosis with polyangiitis. In: *Clinical and experimental rheumatology* 35 Suppl 103 (1), S. 33–39.
- Li, Yanhong; Chen, Xi (2012): Sialic acid metabolism and sialyltransferases. Natural functions and applications. In: *Applied microbiology and biotechnology* 94 (4), S. 887–905. DOI: 10.1007/s00253-012-4040-1.
- Liu, Shuai; Su, Xiaoli; Pan, Pinhua; Zhang, Lemeng; Hu, Yongbin; Tan, Hongyi et al. (2016): Neutrophil extracellular traps are indirectly triggered by lipopolysaccharide and contribute to acute lung injury. In: *Scientific reports* 6, S. 37252. DOI: 10.1038/srep37252.
-

- Lundblad, Arne (2015): Gunnar Blix and his discovery of sialic acids. Fascinating molecules in glycobiology. In: *Uppsala journal of medical sciences* 120 (2), S. 104–112. DOI: 10.3109/03009734.2015.1027429.
- Mandrell, R. E.; Zollinger, W. D. (1982): Measurement of antibodies to meningococcal group B polysaccharide: low avidity binding and equilibrium binding constants. In: *The Journal of Immunology* 129 (5), S. 2172–2178. Online verfügbar unter <http://www.jimmunol.org/content/jimmunol/129/5/2172.full.pdf>.
- Mazmanian, Sarkis K.; Liu, Cui Hua; Tzianabos, Arthur O.; Kasper, Dennis L. (2005): An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. In: *Cell* 122 (1), S. 107–118. DOI: 10.1016/j.cell.2005.05.007.
- Meng, He; Jain, Sanjay; Lockshin, Curtis; Shaligram, Umesh; Martinez, Joseph; Genkin, Dmitry et al. (2018): Clinical Application of Polysialylated Deoxyribonuclease and Erythropoietin. In: *Recent patents on drug delivery & formulation* 12 (3), S. 212–222. DOI: 10.2174/1872211312666180717164758.
- Monti, Eugenio; Bonten; Erik; D'Azzo, Alessandra; Bresciani, Roberto; Venerando, Bruno et al. (2010): Sialidases in Vertebrates. In: Derek Horton (Hg.): *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. Volume 64, Bd. 64. Amsterdam: Elsevier (*Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, v. 64), S. 403–479.
- Mühlenhoff, M.; Eckhardt, M.; Gerardy-Schahn, R. (1998): Polysialic acid. Three-dimensional structure, biosynthesis and function. In: *Current opinion in structural biology* 8 (5), S. 558–564.
- Mukherjee, Manali; Lacy, Paige; Ueki, Shigeharu (2018): Eosinophil Extracellular Traps and Inflammatory Pathologies-Untangling the Web! In: *Frontiers in immunology* 9, S. 2763. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02763.
- Nakamura, Masaru; Hara, Shuuji; Yamaguchi, Masatoshi; Takemori, Yasuyo; Ohkura, Yosuke (1987): 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzene as a highly sensitive fluorogenic reagent for ALPHA.-keto acids. In: *Chem. Pharm. Bull.* 35 (2), S. 687–692. DOI: 10.1248/cpb.35.687.
-

- Nel, Jan G.; Theron, Annette J.; Pool, Roger; Durandt, Chrisna; Tintinger, Gregory R.; Anderson, Ronald (2016): Neutrophil extracellular traps and their role in health and disease. In: *S. Afr. J. Sci* Volume 112 (Number 1/2). DOI: 10.17159/sajs.2016/20150072.
- Pilsczek, Florian H.; Salina, Davide; Poon, Karen K. H.; Fahey, Candace; Yipp, Bryan G.; Sibley, Christopher D. et al. (2010): A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185 (12), S. 7413–7425. DOI: 10.4049/jimmunol.1000675.
- Pires, Ricardo H.; Felix, Stephan B.; Delcea, Mihaela (2016): The architecture of neutrophil extracellular traps investigated by atomic force microscopy. In: *Nanoscale* 8 (29), S. 14193–14202. DOI: 10.1039/c6nr03416k.
- Ray, G. Joseph; Ravenscroft, Neil; Siekmann, Jürgen; Zhang, Zhenqing; Sanders, Paul; Shaligram, Umesh et al. (2014): Complete structural elucidation of an oxidized polysialic acid drug intermediate by nuclear magnetic resonance spectroscopy. In: *Bioconjugate chemistry* 25 (4), S. 665–676. DOI: 10.1021/bc400456g.
- Ray, G. Joseph; Ravenscroft, Neil; Siekmann, Jürgen; Zhang, Zhenqing; Sanders, Paul; Shaligram, Umesh et al. (2016): Correction to Complete Structural Elucidation of an Oxidized Polysialic Acid Drug Intermediate by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. In: *Bioconjugate chemistry* 27 (8), S. 1958. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00335.
- Reyes, A. A.; Small, S. J.; Akeson, R. (1991): At least 27 alternatively spliced forms of the neural cell adhesion molecule mRNA are expressed during rat heart development. In: *Molecular and cellular biology* 11 (3), S. 1654–1661. DOI: 10.1128/mcb.11.3.1654.
- Rollenhagen, Manuela; Kuckuck, Sarah; Ulm, Christina; Hartmann, Maike; Galuska, Sebastian P.; Geyer, Rudolf et al. (2012): Polysialylation of the synaptic cell adhesion molecule 1 (SynCAM 1) depends exclusively on the polysialyltransferase ST8SiaII in vivo. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (42), S. 35170–35180. DOI: 10.1074/jbc.M112.375642.
-

Saffarzadeh, Mona; Juenemann, Christiane; Queisser, Markus A.; Lochnit, Guenter; Barreto, Guillermo; Galuska, Sebastian P. et al. (2012): Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death. A predominant role of histones. In: *PloS one* 7 (2), e32366. DOI: 10.1371/journal.pone.0032366.

Sandberg, Tomas; Blom, Hans; Caldwell, Karin D. (2009): Potential use of mucins as biomaterial coatings. I. Fractionation, characterization, and model adsorption of bovine, porcine, and human mucins. In: *Journal of biomedical materials research. Part A* 91 (3), S. 762–772. DOI: 10.1002/jbm.a.32266.

Sato, C.; Inoue, S.; Matsuda, T.; Kitajima, K. (1998): Development of a highly sensitive chemical method for detecting alpha2--8-linked oligo/polysialic acid residues in glycoproteins blotted on the membrane. In: *Analytical biochemistry* 261 (2), S. 191–197. DOI: 10.1006/abio.1998.2718.

Sato, C.; Kitajima, K.; Tazawa, I.; Inoue, Y.; Inoue, S.; Troy, F. A. (1993): Structural diversity in the alpha 2--8-linked polysialic acid chains in salmonid fish egg glycoproteins. Occurrence of poly(Neu5Ac), poly(Neu5Gc), poly(Neu5Ac, Neu5Gc), poly(KDN), and their partially acetylated forms. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (31), S. 23675–23684.

Sato, Chihiro; Kitajima, Ken (2013): Disialic, oligosialic and polysialic acids. Distribution, functions and related disease. In: *Journal of biochemistry* 154 (2), S. 115–136. DOI: 10.1093/jb/mvt057.

Schauer, Roland (2004): Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. In: *Zoology (Jena, Germany)* 107 (1), S. 49–64. DOI: 10.1016/j.zool.2003.10.002.

Schauer, Roland; Kamerling, Johannes P. (2018): Exploration of the Sialic Acid World. In: *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* 75, S. 1–213. DOI: 10.1016/bs.accb.2018.09.001.

Schnaar, Ronald L.; Gerardy-Schahn, Rita; Hildebrandt, Herbert (2014): Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. In: *Physiological reviews* 94 (2), S. 461–518. DOI: 10.1152/physrev.00033.2013.

- Segal, Anthony W. (2005): How neutrophils kill microbes. In: *Annual review of immunology* 23, S. 197–223. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653.
- Simon, Peter; Bäumner, Sören; Busch, Oliver; Röhrich, René; Kaese, Miriam; Richterich, Peter et al. (2013): Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase ST8SiaII. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (26), S. 18825–18833. DOI: 10.1074/jbc.M113.451112.
- Simon, Peter; Feuerstacke, Caroline; Kaese, Miriam; Saboor, Farhan; Middendorff, Ralf; Galuska, Sebastian P. (2015): Polysialylation of NCAM characterizes the proliferation period of contractile elements during postnatal development of the epididymis. In: *PloS one* 10 (3), e0123960. DOI: 10.1371/journal.pone.0123960.
- Smirnov, Ivan V.; Vorobiev, Ivan I.; Belogurov, Alexey A.; Genkin, Dmitry D.; Deyev, Sergey M.; Gabibov, Alexander G. (2015): Chemical Polysialylation of Recombinant Human Proteins. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1321, S. 389–404. DOI: 10.1007/978-1-4939-2760-9_26.
- Smutova, Victoria; Albohy, Amgad; Pan, Xuefang; Korchagina, Elena; Miyagi, Taeko; Bovin, Nicolai et al. (2014): Structural basis for substrate specificity of mammalian neuraminidases. In: *PloS one* 9 (9), e106320. DOI: 10.1371/journal.pone.0106320.
- Stamatos, Nicholas M.; Zhang, Lei; Jokilampi, Anne; Finne, Jukka; Chen, Wilbur H.; El-Maarouf, Abderrahman et al. (2014): Changes in polysialic acid expression on myeloid cells during differentiation and recruitment to sites of inflammation: role in phagocytosis. In: *Glycobiology* 24 (9), S. 864–879. DOI: 10.1093/glycob/cwu050.
- Suzuki, Misa; Angata, Kiyohiko; Nakayama, Jun; Fukuda, Minoru (2003): Polysialic acid and mucin type o-glycans on the neural cell adhesion molecule differentially regulate myoblast fusion. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (49), S. 49459–49468. DOI: 10.1074/jbc.M308316200.
- Takei, Hiroshi; Araki, Akemi; Watanabe, Hiroshi; Ichinose, Akitada; Sendo, Fujiro (1996): Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate
-

(PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. In: *J Leukoc Biol* 59 (2), S. 229–240. DOI: 10.1002/jlb.59.2.229.

Terekhov, S. S.; Smirnov, I. V.; Shamborant, O. G.; Bobik, T. V.; Ilyushin, D. G.; Murashev, A. N. et al. (2015): Chemical Polysialylation and In Vivo Tetramerization Improve Pharmacokinetic Characteristics of Recombinant Human Butyrylcholinesterase-Based Bioscavengers. In: *Acta naturae* 7 (4), S. 136–141.

Ulloa-Aguirre, Alfredo; Maldonado, Angélica; Damián-Matsumura, Pablo; Timossi, Carlos (2001): Endocrine Regulation of Gonadotropin Glycosylation. In: *Archives of Medical Research* 32 (6), S. 520–532. DOI: 10.1016/S0188-4409(01)00319-8.

Ulloa-Aguirre, Alfredo; Timossi, Carlos; Damián-Matsumura, Pablo; Dias, James A. (1999): Role of Glycosylation in Function of Follicle-Stimulating Hormone. In: *ENDO* 11 (3), S. 205–216. DOI: 10.1385/ENDO:11:3:205.

Ulm, Christina; Saffarzadeh, Mona; Mahavadi, Poornima; Müller, Sandra; Prem, Gerlinde; Saboor, Farhan et al. (2013): Soluble polysialylated NCAM. A novel player of the innate immune system in the lung. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70 (19), S. 3695–3708. DOI: 10.1007/s00018-013-1342-0.

Varki, Ajit (2011): Evolutionary forces shaping the Golgi glycosylation machinery: why cell surface glycans are universal to living cells. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (6). DOI: 10.1101/cshperspect.a005462.

Varki, Ajit (2017a): Biological roles of glycans. In: *Glycobiology* 27 (1), S. 3–49. DOI: 10.1093/glycob/cww086.

Varki, Ajit; Cummings, Richard D.; Esko, Jeffrey D.; Stanley, Pamela; Hart, Gerald W.; Aebi, Markus et al. (Hg.) (2017b): Essentials of glycobiology. Third edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Varki, Nissi M.; Varki, Ajit (2007): Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 87 (9), S. 851–857. DOI: 10.1038/labinvest.3700656.

Wang, Y. D.; Guo, L.; Qian, S. J.; Meng, G. Z.; Zhang, S. Z. (2000): Modification of L-asparaginase with colominic acid and the new characteristics of the modified enzyme. In: *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology* 16 (4), S. 517–520.

Weinhold, Birgit; Seidenfaden, Ralph; Röckle, Iris; Mühlenhoff, Martina; Schertzinger, Frank; Conzelmann, Sidonie et al. (2005): Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (52), S. 42971–42977. DOI: 10.1074/jbc.M511097200.

Werneburg, Sebastian; Buettner, Falk F. R.; Erben, Larissa; Mathews, Mona; Neumann, Harald; Mühlenhoff, Martina; Hildebrandt, Herbert (2016): Polysialylation and lipopolysaccharide-induced shedding of E-selectin ligand-1 and neuropilin-2 by microglia and THP-1 macrophages. In: *Glia* 64 (8), S. 1314–1330. DOI: 10.1002/glia.23004.

Werneburg, Sebastian; Mühlenhoff, Martina; Stangel, Martin; Hildebrandt, Herbert (2015): Polysialic acid on SynCAM 1 in NG2 cells and on neuropilin-2 in microglia is confined to intracellular pools that are rapidly depleted upon stimulation. In: *Glia* 63 (7), S. 1240–1255. DOI: 10.1002/glia.22815.

Werner, Anselm; Horstkorte, Rüdiger; Glanz, Dagobert; Biskup, Karina; Blanchard, Véronique; Berger, Markus; Bork, Kaya (2012): Glycoengineering the N-acyl side chain of sialic acid of human erythropoietin affects its resistance to sialidase. In: *Biological chemistry* 393 (8), S. 777–783. DOI: 10.1515/hsz-2012-0138.

Xu, Jun; Zhang, Xiaomei; Pelayo, Rosana; Monestier, Marc; Ammollo, Concetta T.; Semeraro, Fabrizio et al. (2009): Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. In: *Nature medicine* 15 (11), S. 1318–1321. DOI: 10.1038/nm.2053.

Yabe, Uichiro; Sato, Chihiro; Matsuda, Tsukasa; Kitajima, Ken (2003): Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (16), S. 13875–13880. DOI: 10.1074/jbc.M300458200.

Yipp, Bryan G.; Kubes, Paul (2013): NETosis: how vital is it? In: *Blood* 122 (16), S. 2784–2794. DOI: 10.1182/blood-2013-04-457671.

Yipp, Bryan G.; Petri, Björn; Salina, Davide; Jenne, Craig N.; Scott, Brittney N. V.; Zbytnuik, Lori D. et al. (2012): Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. In: *Nature medicine* 18 (9), S. 1386–1393. DOI: 10.1038/nm.2847.

Yousefi, S.; Morshed, M.; Amini, P.; Stojkov, D.; Simon, D.; Gunten, S. von et al. (2015): Basophils exhibit antibacterial activity through extracellular trap formation. In: *Allergy* 70 (9), S. 1184–1188. DOI: 10.1111/all.12662.

Yousefi, Shida; Stojkov, Darko; Germic, Nina; Simon, Dagmar; Wang, Xiaoliang; Benarafa, Charaf; Simon, Hans-Uwe (2019): Untangling "NETosis" from NETs. In: *European journal of immunology*. DOI: 10.1002/eji.201747053.

Zalewska, A.; Zwierz, K.; Zólkowski, K.; Gindzieński, A. (2000): Structure and biosynthesis of human salivary mucins. In: *Acta biochimica Polonica* 47 (4), S. 1067–1079.

Zlatina, Kristina; Galuska, Sebastian P. (2019): Polysialic Acid Modulates Only the Antimicrobial Properties of Distinct Histones. In: *ACS Omega* 4 (1), S. 1601–1610. DOI: 10.1021/acsomega.8b02222.

Zlatina, Kristina; Lütteke, Thomas; Galuska, Sebastian (2017): Individual Impact of Distinct Polysialic Acid Chain Lengths on the Cytotoxicity of Histone H1, H2A, H2B, H3 and H4. In: *Polymers* 9 (12), S. 720. DOI: 10.3390/polym9120720.

Zlatina, Kristina; Saftenberger, Max; Kühnle, Andrea; Galuska, Christina E.; Gärtner, Ulrich; Rebl, Alexander et al. (2018): Polysialic Acid in Human Plasma Can Compensate the Cytotoxicity of Histones. In: *International journal of molecular sciences* 19 (6). DOI: 10.3390/ijms19061679.

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. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (14), S. 9965–9971.

Zuo, Yu; Yalavarthi, Srilakshmi; Shi, Hui; Gockman, Kelsey; Zuo, Melanie; Madison, Jacqueline A. et al. (2020): Neutrophil extracellular traps in COVID-19. In: *JCI insight* 5 (11). DOI: 10.1172/jci.insight.138999.

10 Publikation in Zusammenhang mit dieser Arbeit



ORIGINAL RESEARCH
published: 29 September 2017
doi: 10.3389/fimmu.2017.01229

Artificial Polysialic Acid Chains as Sialidase-Resistant Molecular-Anchors to Accumulate Particles on Neutrophil Extracellular Traps

Christina E. Galuska^{1,2}, Jan A. Dambon^{1,2}, Andrea Kühnle¹, Kim F. Bornhöfft¹, Gerlinde Prem², Kristina Zlatina^{1,2}, Thomas Lütke^{3†} and Sebastian P. Galuska^{1,2*}

¹Institute of Reproductive Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Dummerstorf, Germany, ²Faculty of Medicine, Institute of Biochemistry, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany, ³Institute of Veterinary Physiology and Biochemistry, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany

Die in *Frontiers in Immunology* veröffentlichte Arbeit bezieht sich auf alle wesentlichen Schritte der Akkumulation polysialylierter Nanopartikel an Neutrophile extrazellulären Fallen wie in dieser Inauguraldissertation beschrieben.

11 Danksagung

Mein Dank gilt allen voran meinem Doktorvater PD. Dr. biol. hom. Sebastian P. Galuska für die Überlassung des Themas und die überragende Betreuung. Sowohl in Gießen als auch in Rostock standest Du mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Ebenso danke ich PD Dr. rer. nat. Joachim Weitzel für die Aufnahme am Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) in Dummerstorf zur Laborrotation. Ich wurde herzlich in die Arbeitsgemeinschaft aufgenommen und es war eine gewinnbringende Erfahrung insbesondere für die Methodik dieser Arbeit.

Kristina, Ashkan, Philip, Christina, Kim, Andrea & Gesine – Danke für die vielen Hilfestellungen bei den Unwägbarkeiten des Laboralltags. Ohne euch wäre es nur halb so schön gewesen.

Meiner Familien, meinen Freunden und Dir, Franziska, gilt mein ganz besonderer Dank. Ihr habt mir an so manchen Tagen den Antrieb verschafft, den ich gebraucht habe, um diese Arbeit zu vollenden und mich während des Studiums zu jeder Zeit unterstützt.

12 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. 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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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 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