

**Identifikation und funktionelle Analyse von
polysialylierten Glykoproteinen in der humanen
Mastzelllinie HMC₁**

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

vorgelegt von
Jan Philipp Huisl
aus Gießen

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: PD Dr. Galuska
Gutachter: Prof. Dr. Günther

Tag der Disputation: 01.07.2021

Inhaltsverzeichnis

1) Einleitung	1
1.1) (Poly-) Sialinsäure	2
1.2) Herstellung von PolySia und Polysialyltransferasen	5
1.3) Polysialyliertes NCAM	7
1.4) Polysialyliertes Neuropilin 2 und CCR 7	11
1.5) Stimulation von Immunzellen und dessen Folge für PolySia.....	13
1.6) Frei lösliches PolySia	13
1.7) Mastzellen	15
2) Zielsetzung	17
3) Material und Methoden	18
3.1) Kultivierung der HMC ₁ Zelllinie	24
3.2) Passagieren der HMC ₁ Zelllinie.....	25
3.3) Einfrieren und Auftauen einer Zelllinie	25
3.4) Aufbereitung der Zellen für weitere Versuche.....	25
3.5) Zellzahlzählung mittels Neubauer-Zählkammer.....	26
3.6) Gewinnung eines Zelllysats.....	26
3.7) Negativkontrolle der Immunfärbung mittels EndoN.....	27
3.8) Affinitätsaufreinigung.....	27
3.9) Auftrennung von Proteinen: die Gelelektrophorese	30
3.10) Visualisierung von Proteinen mittels Coomassie-Färbung	31
3.11) Visualisierung von Proteinen mittels Western Blot	32
3.12) Dot Blot.....	34
3.13) PNGase F Verdau	34
3.14) Immunfluoreszenz	35
3.15) Probenaufarbeitung für Proteomik	36
3.16) RNA Isolation.....	38
3.17) Umschreiben von mRNA in cDNA und anschließende qPCR	38
3.18) Spezifitätstest der qPCR mittels Agarosegel.....	41
3.19) Stimulation zur Degranulation der HMC ₁ Zellen	41
4) Ergebnisse	42
4.1) Polysialylierte Proteine auf humanen Mastzellen.....	42
4.2) Identifizierung des polysialylierten Proteins	47
4.3) Nachweis von polysialyliertem NCAM auf HMC ₁ Zellen.....	49
4.4) Polysialyliertes NCAM während des Degranulationsprozesses	54

4.5) Immunfluoreszenz von stimulierten Zellen.....	56
5) Diskussion	60
5.1) Identifizierung von polysialyliertem NCAM auf HMC ₁ Zellen	60
5.2) Einfluss von PolySia auf den Degranulationsprozess	62
6) Zusammenfassung	66
7) Abstract	67
8) Abkürzungsverzeichnis	68
9) Abbildungsverzeichnis	69
10) Tabellenverzeichnis	69
11) Literaturverzeichnis	70
12) Erklärung zur Dissertation	80
13) Danksagung	81

1) Einleitung

Ein Meilenstein in der jüngeren medizinischen und naturwissenschaftlichen Forschung wurde 2003 mit der vollständigen Entschlüsselung des menschlichen Genoms gelegt. Im Zuge des „Human Genome Project“ wurden die etwa 3,2 Milliarden Basenpaare sequenziert, um die genetische Information des Menschen zu erlangen. Zu diesem Zeitpunkt hatte man Erwartungen von einem hoch komplexen Genom, welches dasjenige anderer Lebewesen bei weitem überragt. Von 45.000 bis zu weit über 100.000 Gene war im Vorfeld die Rede. Umso ernüchternder war die Tatsache, dass man „nur“ ca. 25.000 Gene identifizieren konnte, von denen etwa 21.000 proteincodierend sind (Lander 2011). Zum Vergleich, ein Wasserfloh (*Daphnia pulex*) besitzt 31.000 Gene (Colbourne et al. 2011). Somit lässt sich allein anhand der Gene und deren gespeicherter Informationen nicht erklären, wieso der Mensch im Laufe der Evolution andere Lebewesen überholt hat. Vielmehr gibt es verschiedene Mechanismen auf unterschiedlichen Ebenen der Proteinsynthese und -modifikation, welche die Möglichkeiten zur Informationsspeicherung erhöhen. Eine in diesem Zusammenhang zu nennende Methode ist zum Beispiel das alternative Splicen auf Ebene der Gene. Dabei werden die verschiedenen Anteile der gleichen prä-mRNA nach der Transkription verwertet, um so mit einem einzigen Gen verschiedene Produkte auf Proteinebene zu erhalten. Doch diese Verfahren sind alle Template-gesteuert in Form der DNA. Somit sind sie begrenzt in ihren Möglichkeiten und tragen damit nur einen kleinen Beitrag dazu bei, verglichen mit den weitreichenden Möglichkeiten der posttranslationalen Modifikation. Damit werden allgemein alle Formen der Proteinmodifikation, welche nach der Translation durchgeführt werden, beschrieben. Diese Vorgänge werden alle enzymatisch gesteuert und arbeiten somit ohne ein Template. Deswegen sind ihre Vielfältigkeit und Möglichkeiten im Vergleich zu der starren Struktur der DNA enorm (Turnbull und Field 2007). Die posttranslationale Modifikation kann ganz unterschiedliche Ausmaße annehmen, vom einfachen Anhängen anorganischer Gruppen (Phosphorylierung, Hydroxylierung oder die Iodierung bei z.B. L-Thyroxin) oder Hinzufügen chemischer Bindungen wie einer Disulfidbrücke zweier benachbarter Cystein-Reste, wie es bei Insulin der Fall ist, bis zum Abspalten oder Anhängen ganzer Gruppen. Den größten Vertreter der anzubringenden Gruppen stellen die Zuckerketten dar, der Vorgang wird Glykosylierung bezeichnet. Diese Mechanismen sind so komplex und weisen eine so enorme Diversität auf, dass durch die Entschlüsselung der Glykan-Strukturen ein komplett neues Forschungsgebiet entstanden ist, die Glykomik, welche

inzwischen einen festen Stellenwert neben den etablierten Gebieten der Proteomik und Genomik aufweist (Turnbull und Field 2007). Fast alle extrazelluläre und zahlreiche intrazelluläre Proteine in einer Zelle sind glykosyliert. Die Zuckerketten können dabei an eine Hydroxylgruppe (O-Glykosylierung) der Aminosäuren Serin oder Threonin, oder an ein Stickstoffatom der Säureamid-Gruppe (N-Glykosylierung) von Asparagin gebunden sein. Im Falle einer intrazellulären O-Glykosylierung wird durch die Kopplung von N-Acetylglucosamin (GlcNAc) an die Hydroxylgruppe eine mögliche Phosphorylierungsstelle blockiert und somit wird ein entscheidender Einfluss auf die Regulierung intrazellulärer Signalkaskaden genommen. Intrazelluläre N-Glykosylierung dient als Markierung für den Transport von Proteinen ins Lysosom via Golgi-Apparat. Gerade extrazelluläre Proteine und Proteine, welche Teil der Zellmembran oder an dieser verankert sind, weisen meist mehrere Glykosylierungsstellen auf, die mit unterschiedlichsten Glykanen versehen werden können. Zusammen bilden die Glykokonjugate an der Zelloberfläche die sogenannte Glykokalix. Diese kann bis zu 300 nm dick sein und besteht vor allem aus großen, komplex gebauten Zuckerketten. Diese haben einen essenziellen Einfluss auf diverse Vorgänge wie zum Beispiel die Zell-Zell-Interaktion. Weiterhin dient die Glykokalix auch dem Schutz einer Zelle. Diese Dissertation befasst sich mit einer bestimmten Art der Glykosylierung, der Polysialylierung und deren Einfluss auf das gebundene Protein.

1.1) (Poly-) Sialinsäure

Bei der Sialinsäure handelt es sich um ein Monosaccharid, welches aus einem Grundgerüst von neun Kohlenstoffatomen besteht. Kennzeichnend für die Sialinsäure ist eine Carboxygruppe an C1 sowie eine Ketogruppe an C2. Da es sich unter normalen Bedingungen um eine instabile Form handelt, reagiert die Ketogruppe an C2 mit der Hydroxylgruppe an C6 unter Bildung eines intramolekularen Halbketals (Yu und Ledeen 1969). Es sind bereits mehr als 50 verschiedene Sialinsäuren in Organismen bekannt, welche sich anhand der Substituenten an den verschiedenen Kohlenstoffatomen unterscheiden. Im Prinzip kann jede Hydroxylgruppe durch eine Phosphat-, eine Acetyl-, Sulphonyl- oder Methylgruppe substituiert werden, sodass eine große Diversität unter den einzelnen Sialinsäuren herrscht (Sato und Kitajima 2013). Die beiden bekanntesten und bei Säugern am häufigsten vorkommenden Sialinsäuren sind N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) und N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) (Abbildung 1). Beide besitzen einen Substituenten am C5-Atom.

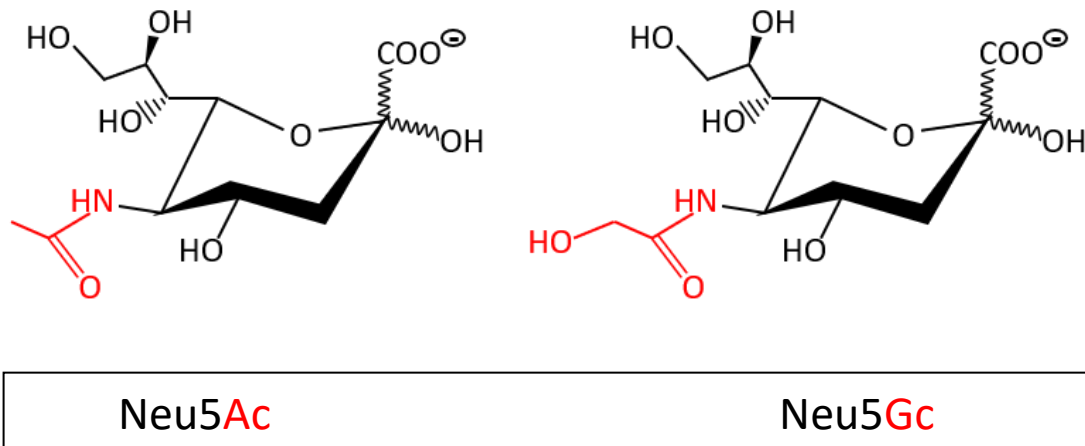


Abbildung 1. Die beim Menschen, wie bei allen Säugetieren, am häufigsten vorkommenden Sialinsäuren: Beide Monosaccharide bestehen aus dem für Sialinsäuren typischen Grundgerüst von neun Kohlenstoffatomen und einer Carboxygruppe an C1. Lediglich der Substituent an C5 unterscheidet sich; während es sich bei Neu5Ac um einen N-Acetylrest handelt, befindet sich am C5-Atom von Neu5Gc ein N-Glycolylrest.

Sialinsäuren sind häufig vor allem an der Außenseite von Zellmembranen zu finden, genauer als letzte Komponente von Glykoproteinen und Glykolipiden. Die funktionelle Bedeutung von Sialinsäuren ist komplex und vielfältig. Grob kann man sie in zwei verschiedene Bereiche zusammenfassen: Zum einen bilden die Sialinsäuren als Abschluss von Zuckerketten eine Art Hülle um die Zellen, damit diese nicht von eigenen Zellen erkannt und gegebenenfalls abgebaut werden können (Sato und Kitajima 2013). Diesen Mechanismus haben sich zum Beispiel Pathogene wie einige Bakterien zu Nutze gemacht und sind in der Lage, ihre Glykokalix mit Sialinsäuren zu versehen, um so mittels molekularem Mimikry dem Immunsystem zu entgehen (Whitfield 2006; Cress et al. 2014). Zum anderen interagieren Sialinsäuren selbst direkt oder indirekt mit diversen Rezeptoren und vermitteln oder inhibieren verschiedenste Zellsignale oder Zellkontakte. Eine weitere Besonderheit der Sialinsäuren ist die Tatsache, dass man sie als homologe Di- ($n = 2$), Oligo- ($n = 3-7$) oder Poly- ($n = \geq 8$) Sialinsäuren (PolySia) vorfindet. Diese Unterscheidung ist wichtig, da bestimmte Moleküle wie zum Beispiel Antikörper mit Sialinsäure erst ab einer bestimmten Kettenlänge interagieren können (Sato und Kitajima 2013). Dabei können die Homopolymere weit mehr als 90 einzelne Zuckermoleküle enthalten, welche $\alpha 2,8$ -glykosydisch miteinander verbunden sind (Abbildung 2) (Galuska et al. 2008; Galuska et al. 2017).

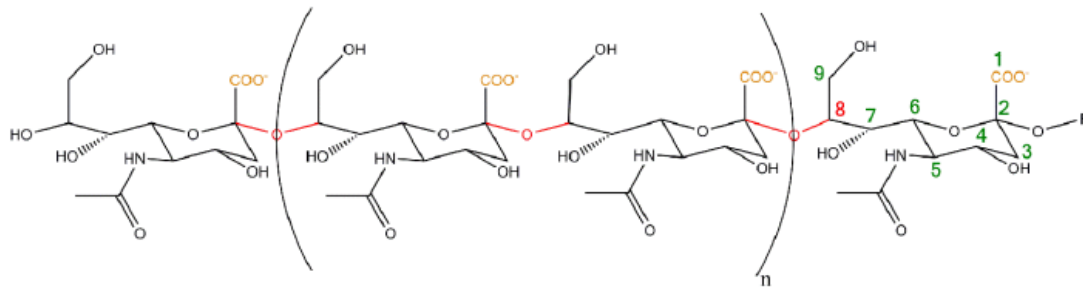


Abbildung 2. Aufbau von Polysialinsäure (PolySia): Die einzelnen Sialinsäuren sind jeweils an C2 bzw. C8 α -glykosidisch miteinander verbunden. Die Bindung wurde in rot hervorgehoben. Die einzelnen C-Atome eines Monomers sind in grün exemplarisch nummeriert und die für die Eigenschaften von PolySia wichtige Carboxylgruppe wurde in gelb unterlegt. Auf diese Weise kann eine Kette aus mehr als 90 einzelnen Sialinsäuren bestehen. Die Abbildung entstammt aus (Galuska et al. 2017), CC BY.

Diese langen Zuckerketten haben wiederum auf Grund ihrer biochemischen Eigenschaften großen Einfluss auf diverse Vorgänge in einem Organismus. Die wohl am besten untersuchte Funktion von polysialylierten Proteinen beruht auf der Inhibierung von Zell-Zell-Kontakten auf Grund der hydrostatischen Abstoßung zweier PolySia-Ketten bei NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) (Hildebrandt et al. 2010). Unter physiologischen Bedingungen liegt die Carboxylgruppe der Sialinsäure als Anion vor. Die negative Ladung einer Kette nimmt somit durch die Verlängerung der PolySia-Kette und die damit einhergehende Erhöhung der Carboxylgruppenzahl zu. Somit weist ein PolySia-Rest eine stark negative Ladung auf, die bewirkt, dass zwei homologe Moleküle, die ohne die Zuckerkette miteinander interagieren würden, sich abstoßen. Des Weiteren ist PolySia auf Grund der Ladung in der Lage, große Mengen an Wasser zu binden (Abbildung 3 A). Somit wirkt neben der ionischen Wechselwirkung auch eine räumliche Komponente auf die Inhibition von anderen Adhäsionsproteinen (Johnson et al. 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PolySia auf Grund seiner Ladung und Größe verschiedenste Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren oder Chemokine temporär bindet und so die Konzentration dieser Botenstoffe lokal um die Zelle erhöht (Abbildung 3 B). Dies kann dazu führen, dass niedrigere Konzentrationen des Botenstoffs ausreichen, um die intrazelluläre Signalkaskade zu aktivieren (Sato und Kitajima 2013; Rey-Gallardo et al. 2010; Rey-Gallardo et al. 2011).

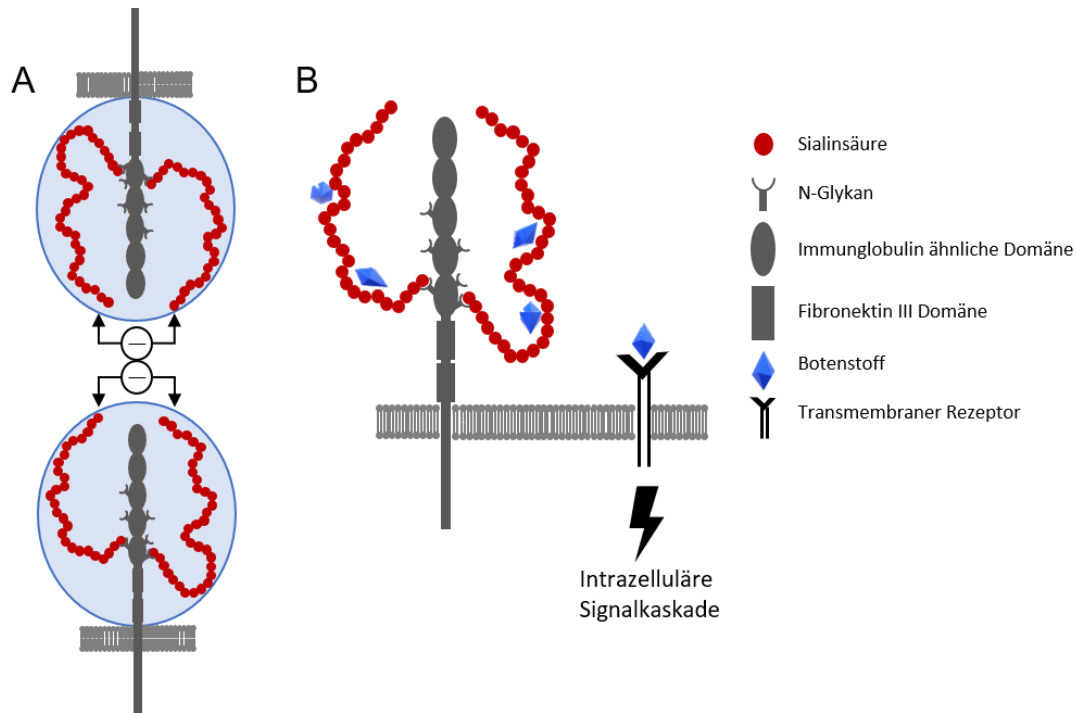


Abbildung 3. Vereinfachte Darstellung zweier Funktionen von polysialylierten Proteinen: A zeigt die Inhibition des Zell-Zell-Kontakts zweier NCAM. Die blaue Umkreisung symbolisiert die Wasserhülle, welche auf Grund der negativen Ladung der PolySia-Ketten entsteht. Daneben in B wird die lokale Konzentrationserhöhung von Botenstoffen durch PolySia verdeutlicht. Dadurch ist eine geringere Ausgangskonzentration notwendig, um den entsprechenden Rezeptor zu aktivieren.

1.2) Herstellung von PolySia und Polysialyltransferasen

Für die Verknüpfung von Sialinsäuren sind spezifische Enzyme verantwortlich, die Sialyltransferasen. Beim Menschen sind mehr als 10 verschiedene Transferasen bekannt, die alle die Gemeinsamkeit haben, dass sie in der Regel die aktivierten Zuckermoleküle mit dem nicht reduzierten Ende der Zuckerketten α 2,3- oder α 2,6-glykosidisch verknüpfen (Harduin-Lepers et al. 2001). Anhand des Akzeptors, welcher häufig die Hexose Galaktose darstellt, werden die Transferasen eingeteilt. Alle Sialyltransferasen sind im Golgi-Apparat gelegen und weisen einen typischen Aufbau auf, bestehend aus einer N-terminalen zytoplasmatischen Domäne, einer Transmembran-Domäne und einer langen C-terminalen Domäne, welche für die katalytische Aktivität verantwortlich ist (Jeanneau et al. 2004). Die katalytische Domäne wiederum besitzt hoch spezifische Peptidregionen, die für das Erkennen und Binden der aktivierten Sialinsäuren und des Akzeptors verantwortlich sind (Jeanneau et al. 2004).

Die Aktivierung der einzelnen Sialinsäuren erfolgt im Zellkern durch Anbringen eines Cytidinmonophosphats (CMP). Während alle Sialyltransferasen nur einzelne Sialinsäure-Reste übertragen bzw lediglich Di- oder Oligomere synthetisieren können, sind beim Menschen die Sialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV in der Lage, lange Homopolymere herzustellen und werden deshalb als Polysialyltransferasen bezeichnet. Diese beiden besitzen eine weitere spezifische Sequenz, die es ihnen ermöglicht, Sialinsäure als Akzeptor zu erkennen und so weitere Sialinsäure-Reste α 2,8-glykosydisch an die entstehende Kette anzufügen (Nakata et al. 2006). Dabei konnte gezeigt werden, dass primär eine Protein-Protein-Interaktion für den Start der Glykosylierung verantwortlich ist, später findet dann eine PolySia-Protein-Interaktion für die Elongation der Zuckerkette statt und das Voranschreiten der Zuckerkettenlänge führt schließlich auf Grund der zunehmenden negativen Ladung der entstehenden Kette zu einem negativen Feedback (Galuska et al. 2017). Für den Start der Glykosylierung benötigen die Proteine eine spezifische Sequenz, damit sie von den Polysialyltransferasen initial erkannt werden können. Damit handelt es sich bei der Polysialylierung um einen Protein-spezifischen Prozess, was einen Unterschied zu der sonstigen posttranslationalen Glykosylierung darstellt (Hildebrandt et al. 2010; Bhide et al. 2016). Bemerkenswert ist, dass beide Polysialyltransferasen sowohl unabhängig voneinander reguliert sind als auch arbeiten. In einem Mausmodell, in dem jeweils ein Gen für eine Transferase ausgeschaltet worden war, wurde das Gen der noch funktionierenden Polysialyltransferase nicht vermehrt exprimiert, verglichen mit dem Wildtyp. Trotzdem fand man annähernd im gesamten perinatalen Mäusehirn polysialylierte Proteine. Dies zeigt, dass die Transferasen überlappende Aufgabengebiete innehaben. Allerdings zeigte ein weiteres Mausmodell, dass ST8SialII für die perinatale Entwicklung den größeren Aufgabenbereich übernimmt, da deren Knockout zu einem ca. 60-prozentigen Verlust der Gesamtmenge an PolySia führte, während der Knockout von ST8SialIV zu keinem messbaren Unterschied führte (Mühlenhoff et al. 2009). Überhaupt wird die Polysialylierung hauptsächlich durch die verschieden starke Expression der Transferasen reguliert. So hängt der Grad der Polysialylierung in einem Organismus maßgeblich von der Aktivität und dem Grad der beiden Polysialyltransferasen ab (Galuska et al. 2006; Oltmann-Norden et al. 2008; Galuska et al. 2008). Interessanterweise sind die Polysialyltransferasen in der Lage, sich selbst zu polysialylieren, wobei der Grund hierfür noch nicht gezeigt werden konnte (Mühlenhoff et al. 1996; Close und Colley 1998).

1.3) Polysialyliertes NCAM

Das neurale Zelladhäsionsmolekül 1 (kurz NCAM₁), auch CD56 genannt, ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches erstmalig und damit namensgebend in neuronalem Gewebe von Mäusen identifiziert wurde (Jorgensen und Bock 1974; Rutishauser et al. 1976). Inzwischen ist bekannt, dass es auch in anderen Geweben aufzufinden ist, vor allem auf Immunzellen wie natürliche Killerzellen oder Monozyten (Mühlenhoff et al. 2013). NCAM gehört zu der Immunglobulin-Superfamilie, welche die größte Gruppe der Oberflächenproteine darstellt. Kennzeichnend für diese Gruppe ist mindestens eine Immunglobulin-ähnliche Domäne innerhalb des Moleküls. Meist sind Vertreter dieser Gruppe an homologen Protein-Protein-Interaktionen beteiligt. Neben der Gruppe der Immunglobuline gibt es als weitere Vertreter von Zelladhäsionsmolekülen noch die Gruppe der Cadherine, die Integrine und die Leucine. NCAM selbst besteht aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen und zwei Fibronectin-ähnlichen Domänen, welche für die Verankerung in der Zellmembran verantwortlich sind. Die Information für das Protein wird lediglich auf einem Gen gespeichert (Nguyen et al. 1986). Das Gen unterliegt einer starken Kontrolle und Regulierung, was besonders für die frühe Entwicklung eines Lebewesens entscheidend ist (Kolkova 2010). Doch obwohl das Protein nur auf einem Gen codiert ist, sorgen das alternative Splicen und die daraus resultierend bis jetzt bekannten 27 verschiedenen Transkripte für eine große Vielfalt von möglichen Proteinvarianten. Dies wird noch weiter verstärkt, indem es durch verschiedenste Varianten posttranslational modifiziert wird. Für die Glykosylierung beispielsweise sind mögliche sechs N-Glykane bekannt, an die die Zuckerketten potentiell gebunden vorliegen können (Kolkova 2010; Albach et al. 2004), wobei PolySia an den N-Glykanen der 5. und 6. N-Glykosylierungsstelle gebunden vorliegen kann (Abbildung 4).

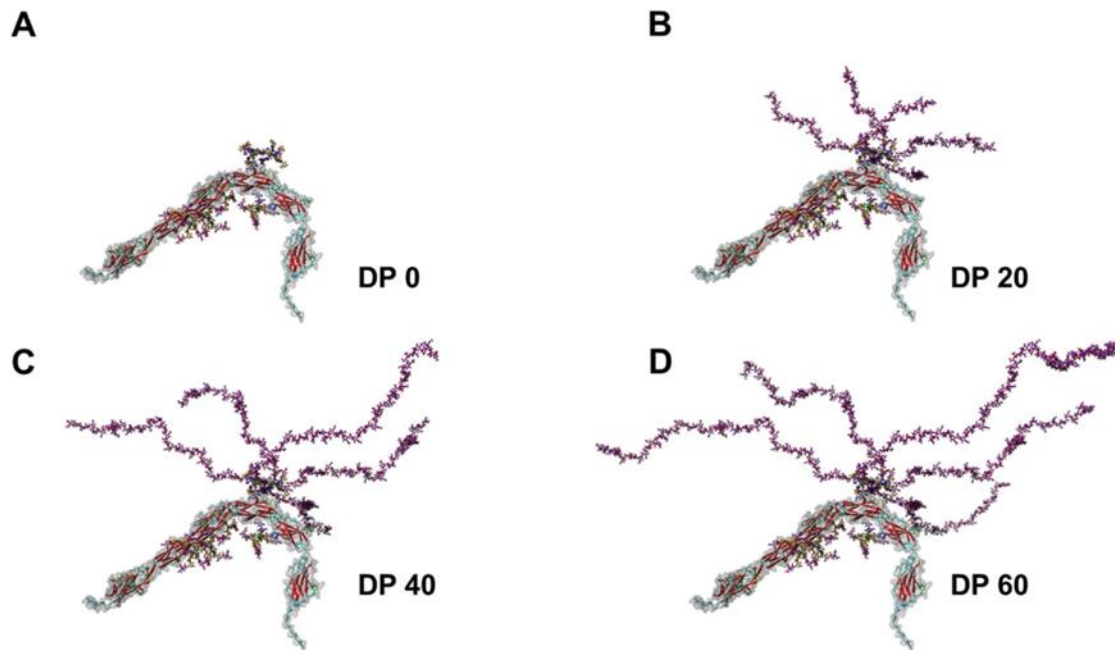


Abbildung 4. Polysialylierung von NCAM: Die Abbildung zeigt ein 3D-Modell von NCAM mit unterschiedlich langen PolySia-Ketten (Kettenlänge, DP). Man erkennt die enorme räumliche Größe der Ketten, die PolySia im Vergleich zum Proteinanteil einnehmen kann und die für die Eigenschaften von PolySia neben der Ladung entscheidend ist. Die Abbildung entstammt ursprünglich aus (Galuska et al. 2017), CC BY.

Weiterhin wurden zwei O-Glykosylierungsstellen in den Fibronectin III-ähnlichen Domänen festgestellt (Ong et al. 2002). Für die korrekte Polysialylierung wurde eine α -Helix in der ersten Fibronectin III Domäne auffindig gemacht (Mendiratta et al. 2006). Bei Säugetieren sind vor allem drei Isoformen von Bedeutung: NCAM 180, NCAM 140 und NCAM 120 (Abbildung 5). Dabei beziehen sich die Zahlen auf die Masse in Kilodalton des Grundproteins ohne Modifikation. Während es sich bei NCAM 180 und NCAM 140 um Transmembranproteine handelt, besitzt NCAM 120 einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anker. Weiterhin gibt es eine frei lösliche Isoform, welche nicht an der Zellmembran gebunden ist (Hildebrandt et al. 2010).

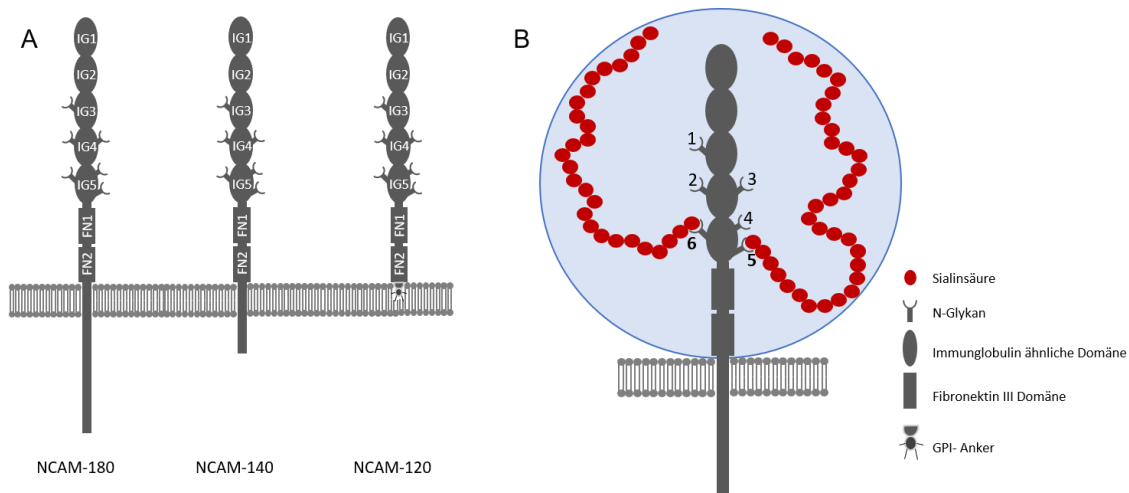


Abbildung 5. Schematische Darstellung von (polysialyliertem) NCAM: Die Abbildung A zeigt die drei bekanntesten Isoformen von NCAM. Daneben ist in B NCAM-140 exemplarisch polysialyliert abgebildet. Die einzelnen N-Glykane sind hervorgehoben. Zu beachten ist, dass lediglich die N-Glykane Nummer 5 und 6 polysialyliert vorliegen können.

Polysialyliertes NCAM ist das am besten untersuchte Protein in Hinblick auf die Funktion dieser Zuckerkette. Dies liegt auch in der Tatsache begründet, dass es das zuerst entdeckte und das am häufigsten vorkommende Trägerprotein von PolySia ist (Cremer et al. 1994; Mühlhoff et al. 2009; Hildebrandt et al. 2010). Doch die Funktionen des polysialylierten NCAM sind komplex. Die einfachste Eigenschaft besteht aus der Inhibition der Adhäsion des homologen Protein-Protein-Komplexes aus zwei NCAMs durch ionische Wechselwirkungen des stark negativ geladenen PolySia, wie es eingangs beschrieben wurde. Diese Inhibierung der Zell-Zell-Kontakte ist für die Entwicklung und Organogenese äußerst wichtig (Galuska et al. 2017). Dabei ist die neuronale Entwicklung besonders hervorzuheben. Nur durch das Aufheben der Adhäsionsproteine ist eine geordnete Zellwanderung von neuronalen Vorläufer-Zellen gegeben. Welche fundamentale Bedeutung PolySia für den Organismus innehat, konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, bei dem die Enzyme, welche für die Polysialylierung verantwortlich sind, ausgeschaltet wurden. Diese Mäuse zeigten spezifische Hirndefekte, einen Hydrozephalus, postnatale Wachstumsstörungen und eine deutlich reduzierte Lebenserwartung (Weinhold et al. 2005). So ist es wenig verwunderlich, dass das Polysialylierungsniveau von NCAM sich im Verlauf der Entwicklung stark verändert. Während am achten Tag der Entwicklung erstmals NCAM nachgewiesen werden kann, welches allerdings noch kein PolySia trägt, steigt der Anteil an polysialyliertem NCAM

kurze Zeit später stark an und erreicht sein Maximum in der perinatalen Phase. Zu diesem Zeitpunkt liegt so gut wie jedes NCAM polysialyliert vor. Während dieser Zeit findet das stärkste neuronale Wachstum statt, gemessen an der Masse des Gehirns. Dieses Wachstum findet bis zum Tag 9 postnatal statt, wobei dieser Zeitpunkt gleichzeitig dadurch gekennzeichnet ist, dass ab diesem Tag der Gehalt an PolySia bis zu ca. 70% vom Ausgangswert innerhalb von einer Woche abfällt und nun erstmalig wieder nicht polysialyliertes NCAM nachgewiesen werden kann, was im adulten Organismus den Hauptteil aller NCAMs darstellt (Hildebrandt et al. 2010). In der adulten Lebensphase bleibt der Gehalt an polysialyliertem NCAM weitestgehend konstant. Nun nimmt es eine zentrale Funktion bei Synapsenwachstum und neuronaler Plastizität sowie kognitive Funktionen ein (Bonfanti 2006). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass lösliches polysialyliertes NCAM einen extrasynaptischen Rezeptor inhibiert, welcher wiederum die Langzeitpotenzierung inhibiert und die Neurodegeneration fördert (Varbanov und Dityatev 2017). Daneben konnte gezeigt werden, dass PolySia mit verschiedensten neurotrophen Faktoren interagiert, wie zum Beispiel „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF), welcher für die Neurogenese wichtig ist. So wird vermutet, dass PolySia eine Art Reservoir für den Faktor bildet und so die lokale Konzentration erhöht, um die Aktivierung des Rezeptors für BDNF zu erleichtern (Sato und Kitajima 2019). Neben den positiven Einflüssen bezogen auf die Entwicklung, werden einige neuropsychiatrische Erkrankungen mit einem veränderten Polysialylierungsstatus in Verbindung gebracht. Vor allem bei Patienten, welche an einer Schizophrenie leiden, wurden Genveränderungen der Polysialyltransferase ST8Siall festgestellt, was zu reduzierter Aktivität sowie zu quantitativen und qualitativen Beeinträchtigungen des Polysialylierungsstatus von NCAM führte (Hane et al. 2016; Sato et al. 2016; Sato und Kitajima 2019; Mori et al. 2017). Die antiadhäsiven Eigenschaften spielen weiterhin in der Entstehung und Metastasierung von diversen Tumoren eine Rolle (Pinho und Reis 2015). Diese Reexpression von PolySia konnte beispielsweise beim klein- und nicht kleinzelligen Lungenkarzinom (Moolenaar et al. 1990; Tanaka et al. 2001), dem Neuroblastom (Livingston et al. 1988), dem Pankreas-Tumor (Kameda et al. 1999) oder dem Brustkrebs (Martersteck et al. 1996) nachgewiesen werden. Gleichzeitig ist das Vorhandensein von polysialylierten Proteinen auf Tumorzellen mit einer schlechten Prognose assoziiert (Tanaka et al. 2000). Ein Schlüsselproblem für das Wachstum von Tumoren ist häufig die hypoxische Umgebung auf Grund des schnellen Wachstums. Polysialyliertes NCAM dient dabei als eine Art Resistenzmechanismus, indem es auf Grund seiner antiadhäsiven Eigenschaften die Bewegung der Zellen fördert und so das Überleben verbessert (Elkashef et al. 2016). Deshalb steht PolySia bzw. die Polysialyltransferasen im Mittelpunkt einiger Forschungsgruppen als potentiell neues

Ziel von medikamentösen Therapien (Al-Sarairoh et al. 2013; Falconer et al. 2012; Sato und Kitajima 2019).

1.4) Polysialyliertes Neuropilin 2 und CCR 7

Neben den ausführlich beschriebenen Einflüssen von polysialyliertem NCAM hat PolySia auch großen Einfluss auf das angeborene und erworbene Immunsystem. Dabei ist unter anderem das polysialylierte Neuropilin 2 zu nennen. Neuropilin ist ein multifunktionaler Transmembran-Proteinrezeptor und vor allem auf Neuronen zu finden, aber auch auf Immunzellen wie den dendritischen Zellen. Er fungiert als Co-Rezeptor hauptsächlich für VEGF und Semaphorine sowie für verschiedenste andere Wachstumsfaktoren und hat dadurch maßgeblichen Einfluss auf die Angiogenese und die axonale Wegfindung (Prud'homme und Glinka 2012). Allgemein existieren zwei verschiedene Neuropilin-Rezeptoren, welche sich allerdings zu 44% bezüglich ihrer Aminosäurestruktur ähneln. Beide haben die gleiche Grundstruktur, welche aus insgesamt fünf extrazellulären Domänen besteht. Eine Polysialylierung konnte bisher lediglich für Neuropilin 2 gezeigt werden, bei dem, im Gegensatz zu NCAM, die Zuckerketten ausschließlich O-glykosidisch gebunden sind (Rollenhagen et al. 2013). Für die Polysialylierung ist die Meprin, thyrosin phosphatase Domäne (MAM) ausschlaggebend. Diese Domäne dient der Polysialyltransferase als Erkennungssequenz, womit gezeigt werden konnte, dass es sich bei der Polysialylierung um einen Protein-spezifischen Vorgang handelt (Bhide et al. 2016). Mausmodelle, bei denen das entsprechende Gen für Neuropilin 2 deaktiviert wurde, zeigten Defekte in der Entwicklung des lymphatischen Systems und der axonalen Wegfindung (Prud'homme und Glinka 2012; Neufeld 2002; Pellet-Many et al. 2008). Der Cystein-Cystein-Chemokin-Rezeptor 7 (CCR 7) wiederum ist an der Homöostase des Immunsystems beteiligt, indem er starken Einfluss auf die Architektur und Funktion des Thymus, sowie bei der Migration von Immunzellen in die lokalen Lymphknoten, nimmt. CCR 7 ist dabei Hauptrezeptor der beiden Chemokine Cystein-Cystein-Ligand 19 und 21 (CCL 19 bzw. 21), welche für die Chemotaxis von aktivierten dendritischen Zellen in die Lymphknoten verantwortlich sind (Förster et al. 2008). Dendritische Zellen gehören zu den Antigen-präsentierenden Zellen und liegen in ihrer unreifen Form in der Peripherie wie in der Haut des Gesichts vor. Durch Kontakt mit einem Antigen und dessen Aufnahme gerät eine Signalkaskade in Gang, die zu einem Reifungsprozess und Migration in die lokalen Lymphknoten führt. Im Lymphknoten wandern die nun reifen dendritischen Zellen in die zentrale T-Zone, in der sie durch Antigenpräsentation T-Zellen aktivieren und so eine

Immunreaktion auslösen (Randolph et al. 2005). Für die Migration der aktivierten unreifen dendritischen Zellen sind, wie oben beschrieben, CCL 19 und CCL 21 verantwortlich. Dabei ist CCL 19 vor allem für die Wanderung aus den Lymphgefäßen in die entsprechenden Lymphknoten verantwortlich und CCL 21 für den primären Schritt aus dem peripheren Gewebe in das Lymphgefäßsystem. Dieser Schritt ist maßgeblich durch PolySia beeinflusst. So wurde gezeigt, dass bei Mäusen, deren dendritische Zellen kein PolySia besitzen (ST8SialV knockout Mäuse), die dendritischen Zellen nicht in die Lymphgefäße gelangen und damit die Lymphknoten deutlich kleiner waren als bei der Kontrollgruppe. Strukturanalysen des Chemokins CCL 21 haben gezeigt, dass dessen C-terminales Ende in der Lage ist, mit PolySia zu agieren und dadurch erst die Bindung an seinen spezifischen Rezeptor, welchen der G-Protein gekoppelte Cystein-Cystein-Chemokin-Rezeptor 7 (CCR 7) darstellt, ermöglicht. Dies führte zu der These, dass polysialyliertes Neuropilin 2 eine transiente Bindung mit dem Chemokin eingeht, welche die lokale Konzentration des Chemokins erhöht und somit die Chemotaxis erleichtert (Rey-Gallardo et al. 2011; Rey-Gallardo et al. 2010). Weitere Untersuchungen zeigten, dass CCL 21 einer Autoinhibition unterliegt, welche durch eine Konformationsänderung in Anwesenheit von PolySia unterbrochen wird. Dieser Vorgang wird weiterhin dadurch begünstigt, dass CCR 7 selbst polysialyliert ist (Mühlenhoff et al. 2013; Förster et al. 2008; Kiermaier et al. 2016).

Doch nicht nur die Migration in die Lymphknoten wird von PolySia beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass während der Aktivierung und anschließenden Reifung der dendritischen Zellen der mRNA-Gehalt von Neuropilin 2 und St8SialV stark angestiegen ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass der Anstieg der mRNA sich ebenfalls an der Zelloberfläche widerspiegelt. So fand man bei dendritischen Zellen, welche zuvor mit LPS stimuliert wurden, einen höheren Gehalt an Neuropilin 2 an der Zelloberfläche. Es ist vorstellbar, dass diese Hochregulation von PolySia dazu führt, dass auf Grund der biochemischen Eigenschaften der Zuckerkette eine Art Hülle um die Zelle gebildet wird, damit sie auf dem Weg zu ihrem Lymphknoten keine anderen Interaktionen eingehen kann. Zuletzt konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen T-Zelle und dendritischen Zellen selbst durch PolySia beeinflusst wird. Durch das Entfernen der Zuckerkette erfolgte eine verstärkte T-Zell-Aktivierung *in vitro* (Curreli et al. 2007).

1.5) Stimulation von Immunzellen und dessen Folge für PolySia

Neben den dendritischen Zellen konnten Mikrogliazellen sowie THP-1 Makrophagen (Zelllinie, welche von einem Patienten mit akuter monozytischer Leukämie stammt) als PolySia tragende Immunzellen ausgemacht werden. Mikroglia finden sich im zentralen Nervensystem und gehören zu dem mononukleär phagozytären System. Sie sind für die Phagozytose von Fremdkörpern und Zellfragmenten sowie für die Antigenpräsentation im ZNS verantwortlich. In den meisten der Fälle wurde PolySia vor allem an der Zellmembran detektiert, was sich primär damit begründen lässt, dass NCAM als Hauptvertreter der polysialylierten Proteine ein membranständiger Rezeptor ist. Umso bemerkenswerter ist es, dass ein Hauptteil der PolySia tragenden Proteine bei den Mikroglia nicht in der Zellmembran, sondern im Golgi-Apparat gelegen ist. Der Golgi-Apparat ist ein Zellorganell, welches neben der Modifikation von Proteinen an der Bildung und Speicherung von Vesikeln für den Extrazellulärraum beteiligt ist. Bei den beobachteten Proteinen handelt es sich um Neuropilin 2 und E-Selectin-Ligand 1. Durch Stimulation mittels LPS, welche in der äußeren Zellmembran von gramnegativen Bakterien gelegen sind und eine starke Immunantwort *in vivo* hervorrufen, konnte eine Translokation an die Zelloberfläche und letztendlich auch eine Ausschüttung in den Extrazellulärraum der PolySia tragenden Proteine beobachtet werden. Diese Ausschüttung fand jedoch nicht statt, wenn die Zellen mit dem entzündungshemmenden Zytokin IL-4 inkubiert wurden. Somit lässt sich feststellen, dass PolySia lediglich durch einen inflammatorischen Reiz aus dem Golgi mobilisiert wird und als Reaktion auf solch einen sind Mikrogliazellen genauso wie andere Zellen des mononukleären phagozytären Systems in der Lage, entzündungsfördernde Zytokine sowie Stickstoffmonoxid auszustoßen, um die eindringenden Erreger zu bekämpfen. PolySia wiederum verringert die Ausschüttung dieser Entzündungsmediatoren. Dies kann man somit als negativen Feedback-Mechanismus ansehen, um ein zu starkes entzündungsförderndes Milieu zu verhindern und körpereigene Schäden zu verringern. Gerade im zentralen Nervensystem, in dem sich das Gewebe nur eingeschränkt erholen kann, könnte diese Fähigkeit von großer Bedeutung sein (Werneburg et al. 2015; Werneburg et al. 2016).

1.6) Frei lösliches PolySia

Weiterhin ist PolySia nicht nur als Komponente der Zelloberfläche von diversen Zellen zu finden, sondern auch in löslicher Form in menschlichen Körperflüssigkeiten wie dem Blut, der Milch oder dem Ejakulat (Hildebrandt et al. 2010; Simon et al. 2013). Auch wenn

die meisten Funktionen noch unklar sind, lassen einige Untersuchungen die Vermutung zu, dass PolySia sowohl eine Regulatorfunktion einer Immunreaktion in der Bekämpfung von Viren und Bakterien innehat als auch einen zytoprotektiven Effekt aufweist. Diese protektiven Eigenschaften wurden am besten in Hinblick auf extrazelluläre Histone untersucht. Schon lange ist bekannt, dass Histone weit mehr Bedeutung haben als in der Verpackung und Organisation der DNA. Obwohl diese Proteine vorwiegend intranukleär vorliegen, führen Mechanismen wie die Apoptose, die Nekrose oder NETose zu einem extrazellulären Anstieg von Histonen. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) ist ein Mechanismus von neutrophilen Granulozyten zur Bekämpfung von Pathogenen (Brinkmann et al. 2004; Ermert et al. 2009). Dabei entsteht ein dreidimensionales Netzwerk, welches primär aus dekondensierter DNA der Granulozyten besteht. Weiterhin besteht das NET aus antimikrobiellen Peptiden und Proteinen wie den Histonen. Diese besitzen einen stark kationischen Charakter und sind somit in der Lage, die Integrität der Zellmembranen durch Binden an Phospholipiden zu stören. Weiterhin führt diese Interaktion mit der Zellmembran zu einem intrazellulären Calciumeinstrom und somit eine Inangangsetzung verschiedenster Signalkaskaden. Diesen Vorgang macht sich das Immunsystem zur Bekämpfung von Mikroorganismen zu Nutze, allerdings deutet vieles darauf hin, dass die NETose und insbesondere die extrazelluläre Histon-Konzentration genauso schädlich für den Organismus selbst sind (Saffarzadeh et al. 2012; Xu et al. 2009). So führen unter anderem extrazelluläre Histone zu einer Immunreaktion über eine Aktivierung der Toll-like Rezeptoren 2 und 4 (Iwasaki und Medzhitov 2004). Diese Aktivierung des Immunsystems und die daraus resultierende Entzündungsreaktion könnte einen Einfluss haben auf die Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie dem Lupus Erythematoses, der Infertilität, der Entstehung einer Thrombose oder der überschießenden Immunreaktion bei einer Sepsis (Xu et al. 2009; Peng et al. 2016; Huang et al. 2011; Hakkim et al. 2010; Fuchs et al. 2012; Caudrillier et al. 2012; Alghamdi und Foster 2005). Interessanterweise ist PolySia in der Lage, freie extrazelluläre Histone zu binden und dabei die Zytotoxizität zu reduzieren. Dies gilt bei H1, H2A, H2B, H3 und H4, wobei zu erwähnen ist, dass H2A und H2B den Hauptanteil (ca. 70%) der freien Histone bei NET darstellt. Dabei ist die Inhibierung abhängig von der Kettenlänge von PolySia. Allerdings ist eine Kettenlänge von über 40 Sialinsäureresten, welche in dieser Länge in menschlichem Plasma nachgewiesen werden konnte, ausreichend, um die Toxizität der Histone zu verringern (Zlatina et al. 2017; Zlatina et al. 2018). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass, obwohl die Zytotoxizität durch PolySia reduziert wird, die antimikrobiellen Eigenschaften der Lysinreichen Histone, welche bei NET von entscheidender Bedeutung sind, kaum beeinträchtigt werden (Zlatina und Galuska 2019).

Ein weiterer Bindungspartner von PolySia im Zusammenhang mit NET ist Lactoferrin, das ebenfalls einen wichtigen Teil des angeborenen Immunsystems darstellt. Neben seiner Eisen bindenden Funktion, wodurch das Wachstum von Mikroorganismen gehemmt wird, kann Lactoferrin als Regulator von NET angesehen werden, indem es eine Art „Hülle“ um einen aktivierten neutrophilen Granulozyten bildet, welche das Ausschütten des Chromatins und der Proteine verhindert (Bullen et al. 1972; Okubo et al. 2016). Dieser Vorgang wird durch PolySia moduliert, indem es mit der Untereinheit Lactoferricin, welche einen Teil der N-terminalen Domäne von Lactoferrin darstellt, interagiert. So konnte gezeigt werden, dass langkettiges PolySia die Inhibierung von NET durch Lactoferrin verstärkt und dass PolySia die Interaktion von Lactoferrin mit schon bestehenden NET-Fasern beeinflusst (Kühnle et al. 2019c; Kühnle et al. 2019a; Kühnle et al. 2019b).

Dies lässt somit die These zu, dass PolySia sowohl in seiner gebundenen Form in der Zellmembran als auch in seiner löslichen Komponente einen Schutz gegen die extrazellulären Histone darstellt und weiterhin mit Hilfe von Lactoferrin ein entscheidender Regulator der Freisetzung von NET ist. Somit gibt es zahlreiche Beispiele, die zeigen, dass PolySia eine wichtige Rolle bei immunologischen Prozessen einnimmt. Interessanterweise konnte Frau Natascha Panasenکو aus der Arbeitsgruppe von Sebastian Galuska Hinweise für PolySia und mRNA von Polysialyltransferasen und NCAM in der humanen Mastzelllinie HMC₁ finden. Dies lässt vermuten, dass auch in Mastzellen PolySia-abhängige Prozesse stattfinden.

1.7) Mastzellen

Mastzellen sind hoch spezialisierte Zellen, welche ursprünglich von den myeloproliferativen Vorläuferzellen im Knochenmark abstammen. Die noch unreifen CD34⁺ Vorläufer-Zellen verlassen das Knochenmark und wandern in das periphere Gewebe, während sie unter verschiedensten lokalen Cytokin-Einflüssen ausreifen. Auf Grund der unterschiedlichen Einflüsse der Cytokine und deren Konzentrationen sind Mastzellen in ihrer Ausstattung der Granula gewebespezifisch (Gurish und Boyce 2006). Unter normalen Bedingungen ist die Konzentration der Mastzellen in den einzelnen Geweben relativ konstant, allerdings kann es während verschiedenster pathologischer Prozesse zu einer Vermehrung kommen. Im Grunde liegt die Aufgabe von Mastzellen darin, auf einen spezifischen Reiz hin mit der Ausschüttung ihrer im Zytosol gespeicherten Granula zu reagieren, welche Proteasen wie zum Beispiel Trypsin oder

Carboxypeptidase, Glykosaminoglykane, Histamin oder auch verschiedenste proinflammatorische Zytokine wie TNF- α enthalten (Prussin und Metcalfe 2006). Damit haben sie sowohl auf das angeborene wie auch das erworbene Immunsystem großen Einfluss. Weiterhin interagieren sie mit Nervenzellen und sind an diversen anderen Vorgängen beteiligt wie der Angio- und der Lymphangiogenese oder der Reparatur von Gewebe (Marone et al. 2016; Furuno et al. 2005). Die letztgenannten Eigenschaften sind besonders interessant im Hinblick auf die Entstehung und das Wachstum von Tumoren und gleichzeitig als Angriffspunkt neuer Therapien (Ribatti 2016).

Doch die wohl bekannteste Eigenschaft von Mastzellen ist deren Schlüsselrolle bei Allergien und damit zusammenhängenden Erkrankungen wie dem Asthma Bronchiale oder der chronischen Rhinitis. Typ 1 Allergien beruhen letztendlich, sowohl durch endogene wie exogene Einflüsse ausgelöst, auf einer Überproduktion von Immunglobulin E (IgE) (Gangwar et al. 2016). IgE wiederum ist das stärkste Stimulans für eine Mastzelldegranulation durch Quervernetzung mit dem spezifischen Rezeptor, dem „Hoch-Affinitäts“- IgE Rezeptor (Fc ϵ RI). Die Quervernetzung von zwei IgE Rezeptoren führt zur Aktivierung verschiedenster Signalkaskaden, die letztendlich zu einer Ausschleusung von Calcium-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum sowie zum Öffnen von Calcium-abhängigen Calciumkanälen. Dies führt zu einem starken Anstieg der Ionen im Zytoplasma und ist der entscheidende Trigger für die Verschmelzung der Granula mit der Zellmembran sowie der Umorganisation des Zytoskeletts (Draber et al. 2016). Doch IgE ist bei weitem nicht der einzige Aktivator für eine Mastzelldegranulation. Es sind diverse Mediatoren bekannt, die sowohl die durch IgE vermittelte Degranulation fördern oder auch komplett unabhängig die Zelle stimulieren. Demzufolge ist die Zelle mit einer Reihe anderer Rezeptoren ausgestattet, um mit ihrer Umgebung zu kommunizieren (Yu et al. 2016; Draber et al. 2016). Weiterhin gibt es aber auch Rezeptoren und Signalkaskaden, die einen hemmenden Einfluss auf die Degranulation haben. Interessanterweise gehört das „Sialinsäure-bindende Immunglobulin-ähnliche Lectin 8“ (Siglec 8, auch CD300a genannt) zu diesen inhibitorischen Rezeptoren. Siglecs gehören zu der Immunglobulin-Superfamilie und interagieren mit PolySia tragenden Proteinen. Während die Aktivierung von Siglec 8 auf Eosinophilen die Apoptose auslöst, konnte gezeigt werden, dass es bei Mastzellen zu einer Inhibition der durch IgE vermittelten Degranulation kommt. Dieser Rezeptor stellt somit unter anderem einen neuen Ansatz für neuartige Therapien bei allergischen Erkrankungen dar (Yokoi et al. 2008; Kikly et al. 2000; Harvima et al. 2014; Bornhöfft et al. 2018).

2) Zielsetzung

Neben der großen Bedeutung von PolySia in der neuronalen Entwicklung, konnten einige weitere immunmodulierende Funktionen der Zuckerkette nachgewiesen werden. Da polysialylierte Proteine schon auf einigen weiteren Immunzellen gefunden werden konnten, rückten die Mastzellen in den Vordergrund der weiteren Forschung. Nachdem Frau Natascha Panasenکو aus der Arbeitsgruppe von Sebastian Galuska PolySia in HMC₁ Zellen, was einer humanen Mastzelllinie entspricht, vorfinden konnte, stellte sich zwangsläufig die Frage nach dessen Funktion für die Zellen. Dies ist gerade in der heutigen Zeit im Hinblick auf die steigenden Zahlen an Allergien und atopischen Erkrankungen von Interesse, da sich eventuell durch die Funktion des Sialinsäurepolymers neue therapeutische Möglichkeiten ergeben. Somit waren die Ziele dieser Dissertation die Beantwortung folgender Fragen:

- An welches Protein ist PolySia bei diesen Zellen gebunden?
- Welche Funktion hat die Zuckerkette bei HMC₁ Zellen inne?
- Ist PolySia Teil eines immunologischen Mechanismus von Mastzellen und lassen sich daraus für die weitere Forschung interessante Erkenntnisse gewinnen?

3) Material und Methoden

Geräte

<u>Name Gerät</u>	<u>Offizieller Name</u>	<u>Firma/Artikelnummer</u>
Pipetten	Rotilabo-Mikroliterpipetten	Roth, 0,5-10 TA21.1 Roth, 10-100 TA23.1 Roth, 100-1000 TA25.1
Pipetten	Pipetman P2 (0,2-2 µl)	Gilson, F144801
Pipetten	Pipetman P10 ml (1-10 ml)	Gilson, F161201
Elektrophorese- gerät	Electrophoresis Power Supply EPS 601	Healthcare Life Sciences, 18- 1130-02
Glasplatte Elektrophorese hinten	30-30-104G Glasplatte, 10,6 cm x 10,2 cm, notched	Biostep, 30-30-104G
Glasplatte Elektrophorese vorne rund	Glasplatte, 10,2 cm x 10,6 cm, outer	Biostep, 30-30-103
Blot für Western Blot	Hoefer TE77X Semidry Blotting Systems	Thermo Fisher, 03-500-613
Snap-System	SNAP i.d.® 2.0 Protein Detection System	Millipore, SNAP2BASE
Kassette zum Entwickeln von Bildern	Hypercassette	Sigma, GERPN11642
Bilder einscannen	ChemiDoc MP, Imaging System	Biorad
Magnetstand	DynaMag Magnetic Particle Concentrator	Invitrogen, 123.21D
Thermoshaker	Thermo-Shaker-Cool	Kisker Biotech, L058
ddH ₂ O	Reinstwasseraufbereitung Purelab classic	Elga
SpeedVac	Rotations-Vakuum- Konzentrator	Christ, RVC2-18 CD plus

SpeedVac Pumpe	Chemie-Vakuumsystem	Vacuubrand, MZ 2C NT +AK+EK
Laser-Mikroskop	LSM 800 Fa. Observer.ZA	Zeiss
Zentrifuge	Heraeus Primo R Centrifuge	Thermo Fisher, 75005440
Brutschrank	Typ: UM200	Memmert, B203.0684
Proteinmessung	FLUOstar Omega	BMG Labtech
Wippe	MR-1, Miniwippe-Schüttler	Biosan, BS-010152-AAG
Rührergerät	Colorsquid	IKA, 513669922
Vortexer	MINI-Vortex VPE=1	Kisker Biotech, L023
DotBlot Apparatur Vakuumpumpe für die Apparatur	DotBlot Apparatur Vakuumpumpe für die Apparatur	Roth, T790.1 Millipore, WP6122050

Verbrauchsmaterialien

Name	Offizieller Name	Firma/Artikelnummer
Eppis 2ml	SafeSeal Reagiergefäße 2ml	Sarstedt, 72.695.500
Eppi 1,5ml	RotiLabo Sicherheitsreaktionsgefäß	Roth, XC63.1
Spitzen 1000 µl, blau	Pipettenspitze 1000 µl, blau	Sarstedt, 70.762.010
Spitzen 200 µl, gelb	Pipettenspitze 200 µl, gelb	Sarstedt, 70.760.012
Spitzen 10 µl, farblos	Pipettenspitze 10 µl, farblos	Sarstedt, 70.1116
Spitzen 1250 µl, mit Filter	Biosphere Filter Tips neutral 1250 µl extra long	Sarstedt, 70.1186.210
Parafilm	Parafilm, Laboratory Film	Hartenstein, PF10
Ace Glow	Ultrasensitive Chemoluminescence Substrate	Peqlab, 37-3420
Ionomycin		Cell signaling Technology, 99955
RIPA Buffer (10X)		Cell Signaling Technology, 9806
Proteaseinhibitoren		Böhringer Mannheim, 1836153
Dynabeads M-280 Tosylactivated		Invitrogen, 14203

Dynabeads Protein A		Thermo Fisher Scientific, 10001D
Fetal Bovine Serum		Thermo Fisher (Gibco), 16140071
Super PAP Pen Liquid Blocker Mini		Science services, N71312
Cover slips		Carl Roth, P233.1
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)		Roth, 6335
Kaiser's Glycerolgelatine		Merck, 1.09242.0100
Albumin Fraktion V		Roth, 8076.4
Milchpulver	Blotting grade, pulv.	Roth, T145.1
Albumin, igG-frei		Roth, 3737.2
Probenpuffer	3X Blue Loading Buffer	Cell Signaling Technology, 7722S
Marker	Color Prestained Protein Standard, broad range 11-245 kDa	NEB, P7712
Transfer-Membran	Immobilon-P Transfer-Membranes PVDF 0,45µm	Millipore, IPVH00010
Blottingpapier	Rotilabo-Blottingpapiere, Dicke 1,0mm	Roth, CL74.1
Fotopapier	Hyperfilm ECL	Fisher Scientific, 10534205
Entwickler	Entwicklerkonzentrat Kodak	Hartenstein, GBXE
Fixierer	Fixiererkonzentrat Kodak	Hartenstein, GBXF
Kit für Immunpräzipitation	Pierc Classic IP-Kit	26146

Chemikalie	Firma/Artikelnummer
Natriumdihydrogenphosphat-monohydrat	Roth, K300.2
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, P030.2
Ammoniumsulfat	Roth, 9218.1
HCL	Roth, 6331.3
Glycine	Roth, 3908.2
Tris	Roth, 5429.3
SDS	Roth, CN30.2
Methanol	Roth, 4627.4
NaCl	Roth, 3957.1
Tween 20	Serva Art, 39796.01
Acrylamid	Serva Art, 10688.01
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth, 9592.3
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Serva Art, 35930.02
2-Propanol	Roth, 9866.5
Luminol	AppliChem, A2185
Cumarinsäure	Sigma, C9008-1G
Wasserstoffperoxid	Roth, 8070.2
Triton-X100	Sigma, X100-100ML
Triethylamin	Roth, X875.1

Primäre Antikörper

<u>Primäre Antikörper</u>	<u>Eigenschaft</u>	<u>Referenz/Firma/ Artikelnummer</u>	<u>Konzentrationen</u>
Anti-PolySia (mAK 735)	Monoklonaler Antikörper (mAK) 735 (Maus IgG2A); erkennt α 2,8-verknüpfte PolySia ab einer Kettenlänge von acht Sialinsäuren	von Prof. Rita Gerardy-Schahn, Medizinische Hochschule Hannover (MHH)	WB: 1 μ g/ml DB: 0,67 μ g/ml IF: 20 μ g/ml
Anti-Mast Cell Tryptase (FL-275)	Rabbit polyclonal, erkennt Mastzell-Tryptase in den Isoformen α , β und γ	Santa Cruz, sc-32889	IF: 1 μ g/ml
Anti-NCAM, Clone 1G4	Mouse monoclonal gegen die Aminosäure 20-718 von humanem NCAM ₁	OriGene, TA506208	WB: 1 μ g/ml
Anti-NCAM	Mouse monoclonal gegen humanes NCAM ₁	Santa Cruz, sc-59864	WB: 0,2 μ g/ml
Anti-NCAM, MOC-1	Mouse monoclonal gegen humanes NCAM ₁	Santa Cruz, sc-51742	WB: 0,1 μ g/ml
Anti-NCAM, H300	Rabbit polyclonal gegen das N-terminale Ende von humanem NCAM ₁	Santa Cruz, sc-10735	IF: 2 μ g/ml

WB = Western Blot, IF = Immunfluoreszenz, DB = DotBlot

Sekundäre Antikörper

<u>Sekundäre Antikörper</u>	<u>Eigenschaft</u>	<u>Referenz/Firma/ Artikelnummer</u>	<u>Verdünnungen</u>
Polyclonal Rabbit anti-mouse, HRP-linked Antibody	HRP-linked Antibody	Dako, P0260	WB: 0,22 μ g/ml DB: 0,144 μ g/ml
F(ab') ₂ -goat anti-Rabbit IgG (H+L) cross-absorbed secondary Antibody, Alexa Fluor 633	Alexa Fluor 633, fluoresziert Infrarot	Thermo Fisher Scientific, A-21072	IF: 10 μ g/ml
pAk Ziege α -Maus IgG	Goat monoklonal α Maus mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt	Dianova	IF: 15 μ g/ml

Enzyme

<u>Enzyme</u>	<u>Eigenschaften</u>	<u>Referenz/Firma/ Artikelnummer</u>
Endoneuraminidase N (EndoN)	Stammt aus einem E. coli K1 Phagen. Bindet an α 2,8- verknüpfte Sialinsäuren ab einem Polymerisationsgrad von acht Resten und spaltet ein Oktamer in drei Reste.	von Prof. Rita Gerardy-Schahn, Medizinische Hochschule Hannover (MHH)
Inaktives EndoN	Das Enzym wurde im aktiven Zentrum durch zwei Punktmutationen inaktiviert (Arg 596 Ala/Arg 647 Ala), sodass das Enzym die PolySia-Kette zwar noch bindet, jedoch nicht mehr spalten kann.	von Prof. Rita Gerardy-Schahn, Medizinische Hochschule Hannover (MHH)
Phalloidin mit TRITC gekoppelt	Darstellung des Zytoskeletts durch Bindung an f-Aktin. Gleichzeitig ist ein orange fluoreszierender Farbstoff gekoppelt.	Sigma, Nr.P-1951
PNGase F	Spaltet N-glykosidisch gebundene Zuckerreste	NEB, P0704S

Materialien und Geräte in der Zellkultur

<u>Name</u>	<u>Offizieller Name</u>	<u>Firma/Artikelnummer</u>
Brutschrank	Heracell 150i CO ₂ Inkubator Edelstahl-Innenbehälter	Thermo Scientific, 5536007
Sicherheitswerkbank	Safe 2020 biologische Sicherheitswerkbänke der Klasse II	Thermo Scientific, Typ S2020.1
Zentrifuge		Sigma, Typ 2-6
Pipetus	accu-jet pro	Brand, 26300
Nährmedium	HyCLone Bovine Calf Serum Supplemented	GE Healthcare Lifesciences, SH30072
Nährmedium	500 ml Fetal Bovine Serum	Gibco, 16140071
IMDM + Phenylrot	IMDM Iscove's Modified Dulbecco's Medium	Gibco, 21980-032
RPMI	RPMI Medium 1640	Gibco, 11835-063
PenStrep (10.000 U/mL)	PenStrep (10.000 U/mL)	Thermo Fisher, 15140122
Thioglycerol		Sigma, M6145
Paraformaldehyd		Sigma, P6148
Petrischale	TC-Schale 100, Suspension	Sarstedt, 83.3902.500
Spitzen mit Filter 1000 μ l	Biosphere Filter Tips	Sarstedt, 70.1186.210 neutral
Spitzen mit Filter 2- 200 μ l	Biospere Quality Tips	Sarstedt, 70.760.202

Spitzen mit Filter 0,5-10 µl	Biosphere Filter Tips	Sarstedt, 70.1115.210
24-Well-Platte	TC-Platte 24-Well-Suspension	Sarstedt, 83.3922.500
Einwegpipetten	Serologische Einwegpipetten 25 ml	Greiner Bio, 760160
PBS Steril	DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Gibco, 14190-094
Falcons 15ml	Röhre/Tube 15 ml	Sarstedt, 62.554.002

Materialien und Geräte für die Gentechnischen Untersuchungen

<u>Gerät/Material</u>	<u>Offizieller Name</u>	<u>Firma/Katalognummer</u>
I-Script Synthese-Kit		Biorad, 64110212
RNeasy Kit		Qiagen, 74106
Nanodrop		Kisker
RNase-freies Wasser	Gibco distilled water	Life technologie
RNA in cDNA	iScript cDNA-Synthesis Kit	Biorad
Thermocycler	Primus 96Plus; RT50 cyc-Program	Biotech
Primer ST8Siall/IV, GAPDH, NCAM ₁		TIB Molbiol
Primer NCAM ₁		SIGMA
PCR-Platten	Hard-Shell PCR-Plates, 96 well thin wall	Biorad, HSP9601
Platten-zentrifuge	Plate centrifuge	Starlab
Probenauswerter	CFX96 Real-time-System; C1000 Touch-Thermal-Cycler	Biorad
Größenstandard für Agarosegel	FastRuler™ Low Range DNA Ladder (50-1500 bp)	Thermo Fisher, SM1103
SYBRGold	SYBRGold nucleic acid gel stain	Life technologies, S11494
SYBR-Mix	IQ SYBR Green Supermix	Biorad, 170-8882
TAE-Puffer	Rotiphorese ^R 50x TAE Puffer	Roth, CL86.2

Geräte und Materialien für die Massenspektrometrie

<u>Gerät/Material/Chemikalie</u>	<u>Offizieller Name</u>	<u>Firma/Katalognummer</u>
NH ₄ HCO ₃	Ammonium bicarbonate 500g	Sigma, 09830-500G
Acetonitril		Roth, HL44.2
Probenpuffer	2x Laemmli Sample Buffer	Biorad, 161-0737
Elektrophoresepuffer	10x TGS Buffer	Biorad, 161-0732
MS-Gele	Mini-Protean TGX Precast Gel	Biorad, 456-10865
Coomassie	Roti-Blue 5x konzentriert	Roth, A152.1
2-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol	Sigma, BCBD7392V
Trypsinlösung	Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade	Promega, V5280
DTT	Dithiothreitol	Sigma, D-5545
Iodoacetamide	Iodoacetamide	Sigma, 6125-25G
TFA	Trifluoressigsäure	Roth, 6957.1
Surfactant	ProteaseMAX Surfactant, Trypsin Enhancer	Promega, V2071

3.1) Kultivierung der HMC₁ Zelllinie

Bei der „Human Mast Cell“- (kurz und im Folgenden nur noch HMC₁-) Zelllinie handelt es sich um eine leukämische Zelllinie, welche ursprünglich von einem Patienten mit Mastzell-Leukämie gewonnen wurde. Diese Zelllinie dient in vielfältiger Weise zur Erforschung der Eigenschaften und des Verhaltens von Mastzellen, da Vertreter dieser Linie in Bezug auf die Morphologie als auch in ihrem Verhalten als solches noch sehr den nativen Mastzellen ähneln. Die Zelllinie wurde in „Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium“ + Phenylrot (IMDM) kultiviert, welchem 10% eines bovinen Kälberserums (HyCLone Bovine Calf Serum Supplemented), 0,1% Thioglycerol und 1% des Antibiotikagemisches Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden. Für die Kultivierung benötigen die Zellen 37°C bei einem CO₂ Gehalt von 5% (Brutschrank Heracell 150i, Thermo Fisher).

3.2) Passagieren der HMC₁ Zelllinie

Zum Passagieren der Zellen wurden diese mittels einer Pipettierhilfe in Falcons überführt, um im Anschluss den Überstand bei 900 rpm für 3 min abzuzentrifugieren (Sigma Laborzentrifugen 2-6). Nachdem der Überstand entnommen wurde, wurde das trockene Pellet in einem Milliliter eines passenden Mediums aufgenommen und die gewünschte Zellzahl in eine neue Kulturschale mit 20 ml Medium gegeben.

3.3) Einfrieren und Auftauen einer Zelllinie

Um mit einer Zelllinie mehr oder weniger unbegrenzt lange arbeiten zu können, ist es erforderlich, diese bei -196°C in flüssigem Stickstoff zu lagern. Bei solch niedrigen Temperaturen finden keine biochemischen Reaktionen mehr statt und die Zelllinie ist somit geschützt vor äußeren Einflüssen wie einer Kontamination oder auch der allgemeinen Zellalterung. Wichtig für das Einfrieren ist die Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO), da dieses die Kristallbildung und den damit verbundenen Zelltod während des Frierens minimiert.

Zum Einfrieren wurden in ein Cryo-Röhrchen 500 µl des Kultivierungsmediums IMDM, welchem 10% des bovinen Kälberserums und 20% DMSO zugegeben wurden, vorgelegt und auf Eis gelagert. Das trockene Zellpellet wurde in 500 µl IMDM, welchem insgesamt 40% des bovinen Kälberserums zugesetzt wurden, gelöst, der schon vorgelegten Lösung hinzugegeben und gut vermischt. Das Einfrieren erfolgte schrittweise, indem die Zellen primär für 24 h auf -80°C gekühlt wurden, um sie anschließend bei -196°C im Stickstofflager aufzubewahren. Beim Auftauen war darauf zu achten, dass man das DMSO schnellstmöglich entfernt, da dieses für nicht eingefrorene Zellen toxisch ist. Dafür wurden die Zellen nach dem Auftauen direkt in 10 ml IMDM ohne Zusätze gegeben. Daraufhin wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand entfernt und in 20 ml eines geeigneten Mediums zum Kultivieren gegeben.

3.4) Aufbereitung der Zellen für weitere Versuche

Unabhängig vom beabsichtigten Experiment wurde für die Aufbereitung der Zellen zunächst immer die gleiche Methode angewandt. Zuerst wurde das trockene Zellpellet 3-mal mit je einem Milliliter PBS resuspendiert und gewaschen, um Rückstände des Nährmediums selbst bestmöglich zu entfernen. Danach wurden die Zellen je nach

weiterem Vorhaben in entweder 1 ml sogenanntem „Hungermedium“ (reines Nährmedium ohne Zusätze) oder wiederum in 1 ml PBS resuspendiert. Das Hungermedium wurde für die Herstellung vitaler Zellen verwendet, während PBS zur Gewinnung von Zelllysaten benutzt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

3.5) Zellzahlzählung mittels Neubauer-Zählkammer

Bei der Neubauer-Zählkammer handelt es sich um einen speziell geschliffenen Objektträger, in dem genau definierte große Quadrate eingearbeitet wurden. Um mit Hilfe dieser Kammer die Zellzahl abschätzen zu können, gibt man 10 µl der Zellsuspension, bei aufgelegtem Deckplättchen, seitlich auf die Kammer, sodass die Flüssigkeit sich gleichmäßig mittels Kapillarkraft verteilt. Nun zählt man unter einem Lichtmikroskop alle Zellen aus, welche sich in einem Großquadranten befinden. Aus statistischen Gründen ist dabei darauf zu achten, dass man nur diejenigen Zellen zusätzlich mitzählt, welche sich auf zwei willkürlich im Vorfeld festgelegten Grenzlinien befinden. Zuletzt bildet man den Mittelwert der Zellzahl aus allen vier Großquadranten und multipliziert den Wert mit 10^4 , da diese Kammer darauf geeicht wurde, die Zellzahl pro ml zu bestimmen.

3.6) Gewinnung eines Zelllysats

Für die Gewinnung eines Zelllysats wurden 8×10^6 Zellen mit 400 µl RIPA Lysepuffer, zusammen mit ausreichend Proteaseinhibitoren, versetzt und mit Hilfe eines Ultraschallstabs homogenisiert. Das Lysat inkubierte bei 8°C für 30 min unter 450 rpm, bevor es anschließend bei $14.000 \times g$ für 10 min bei 8°C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde schließlich in ein neues Eppi überführt und je nach weiterem Vorhaben behandelt.

3.7) Negativkontrolle der Immunfärbung mittels EndoN

Um eine spezifische Bindung des mAK 735 (im Folgenden nur noch als Anti-PolySia bezeichnet) zu zeigen, wurden die Aliquots der Proben als Negativ-Kontrolle mit dem Enzym Endoneuraminidase N (EndoN) behandelt, je nach Versuch mit einer unterschiedlichen Konzentration. Dieses stammt ursprünglich aus einem Bakteriophagen (*E. coli K1*) und ist in der Lage, an α 2,8-verknüpfte Sialinsäureketten von einer Länge von mindestens acht Resten zu binden und diese zu spalten (Stummeyer et al. 2005). Dadurch kann der Antikörper gegen PolySia nicht mehr an die Zuckerkette binden, da dieser acht Reste benötigt um binden zu können. Dies hat somit zur Folge, dass ein Signalverlust nach der Behandlung mit EndoN das Vorhandensein von PolySia beweist. Falls nicht anders angegeben, wurde das Enzym in den Versuchen dieser Arbeit in einer finalen Konzentration von 2,23 μ g/ml bei einem Western Blot und 33,5 μ g/ml für eine Immunfluoreszenz verwendet.

3.8) Affinitätsaufreinigung

Lösungen	Inhalt
Waschpuffer 1	Natriumphosphat-Puffer (0,1 M; pH 7,4)
Kopplungspuffer	Ammoniumphosphat-Puffer (3 M)
Blocking-Puffer	0,5% BSA in PBS (pH 7,4)
Waschpuffer 2	0,1% BSA in PBS (pH 7,4)
Elutionspuffer	100 mM Triethylamin mit 150 mM NaCl

Bei der Affinitätsaufreinigung handelt es sich um ein biochemisches Verfahren, bei dem man ein bestimmtes Antigen von den restlichen Bestandteilen einer Lösung („aus einem inhomogenen Gemisch von Antigenen in einer Lösung“) isoliert. Dafür wird meist ein an einer stationären Phase gekoppelter Antikörper benutzt, damit dieser das Antigen aus der flüssigen Phase, wie zum Beispiel einem Zelllysate, affin bindet und somit von den restlichen Bestandteilen trennt.

In dieser Arbeit hingegen wurde an Stelle eines Antikörpers ein modifiziertes Enzym verwendet, welches das Ziel über einen Enzym-Substrat-Komplex bindet. Bei dem Enzym handelt es sich um die Endoneuraminidase N, welche zwei Punktmutationen im aktiven Zentrum aufweist (Arg 596 Ala/Arg 647 Ala). Diese bewirken, dass das Enzym PolySia noch bindet, allerdings die katalytische Funktion verloren geht und somit das

Polysaccharid nicht mehr verkürzen kann (Schwarzer et al. 2009). Dieses Enzym wurde an magnetische, tosylaktivierte Dynabeads (Dynabeads M-280 Tosylactivated, Invitrogen) gekoppelt, die in diesem Fall die stationäre Phase darstellen. Durch die magnetische Eigenschaft ist es so möglich, die Beads mit Hilfe eines Magneten von dem Rest einer Lösung zu trennen. Die Tosylgruppe (der kovalent gebundene Rest der p-Toluolsulfonsäure) ist der entscheidende Reaktionspartner für die Kopplung des Enzyms. Bei der chemischen Reaktion handelt es sich um eine nukleophile Substitution, genauer eine SN_2 Reaktion. Für die Kopplungsreaktion wurden 5 mg (das entspricht einem Volumen von 165 μ l aus dem Originalgefäß und dient zur Isolation von ca. 5-50 μ g Antigen, in diesem Fall PolySia) in ein separates Reaktionsgefäß entnommen und zunächst mit 1 ml Na-Phosphat-Puffer (0,1 M; pH 7,4) gewaschen. Dies geschieht, indem man das Reaktionsgefäß kurz vortext, bis eine homogene Lösung entsteht, und dann an einen Magneten hält, sodass man die flüssige Phase entfernen kann und die Beads im Reaktionsgefäß zurückbleiben. Danach wurden die Beads wieder in 160 μ l Waschpuffer 1 resuspendiert. Nun wurden für den Kopplungsvorgang 100 μ g inaktives EndoN in 150 μ l Waschpuffer 1, zusammen mit 100 μ l Kopplungspuffer (Ammoniumphosphat-Puffer, 3 M) zu den Dynabeads gegeben und über Nacht bei 37°C unter ständigem Rollen inkubiert. Darauffolgend wurde der Überstand entfernt, und zum Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Beads mit 0,5% BSA in PBS (pH 7,4) bei 37°C für eine Stunde unter ständigem Rollen inkubiert. Nach dem Blocken wurden die Beads schließlich zweimal mit 0,1% BSA in PBS (pH 7,4) gewaschen und waren für die weiteren Versuche einsatzbereit.

Für diese Affinitätsaufreinigung wurden die wie oben beschrieben hergestellten Beads über Nacht mit dem Zellhomogenisat unter ständigem Rollen inkubiert. In dieser Zeit entsteht eine kovalente Bindung von Ziel-Struktur und dem gekoppelten Enzym. Anschließend wurden die Beads 3-mal mit Waschpuffer 2 gewaschen, bevor man das Antigen wieder eluiert. Für die Eluation wurden 80 μ l Eluationspuffer (100 mM Triethylamin mit 150 mM NaCl) zu den Beads gegeben und nach kurzer Inkubation unverzüglich in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zuletzt wurden die Proben mit Hilfe einer SpeedVac trocken gezogen.

Daneben wurden weitere Beads genutzt, welche allerdings mit dem Protein A gekoppelt waren. Dieses Protein stammt ursprünglich aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus*. Dort dient es dem Bakterium als Resistenzmechanismus, indem es Antikörper an der Fc-Region bindet und so für das Bakterium unschädlich macht. Diese Eigenschaft wird bei den Protein A Beads ausgenutzt, indem man einen Antikörper mit Hilfe des Proteins an die magnetischen Beads koppelt. Für die Kopplung wurden je 1 μ g

Antikörper gegen verschiedene Epitope von NCAM₁ verwendet und zusammen mit 50 µl der Beads (entspricht 1,5 mg Dynabeads) und 185 µl PBS mit 0,02 % Tween 20 für 20 min unter Rotation inkubiert. Nach zweimaligem Waschen konnten die Beads mit einem Zelllysats inkubiert werden. Bei diesem Verfahren genügte eine Zeit von 30 min für die Bindung des Antigens. Zum Entfernen von unspezifischen Bindungen wurde der Antigen-Antikörper-Komplex zuerst mit einem Waschpuffer bestehend aus 20 mM Tris/HCl und 150 mM NaCl, pH 8,0 gewaschen. Darauffolgend wurde 3-mal mit demselben Waschpuffer gewaschen, welchem zusätzlich 0,5% Triton X-100 hinzugegeben wurde. Zuletzt wurde noch einmal mit dem ursprünglichen Waschpuffer ohne Triton gewaschen um letztendlich das Antigen mittels 100 mM Triethylamin in 150 mM NaCl zu eluieren. Das eluierte Antigen wurde umgehend in Flüssigstickstoff gefroren und anschließend per SpeedVac getrocknet.

Bei einer weiteren Form der Immunpräzipitation, welcher wir uns bedient haben, wurde ein schon etabliertes Verfahren verwendet und nach Anleitung des Herstellers gehandelt (Pierce Classic IP Kit, Thermo Fisher). Letztendlich beruht das Prinzip dieses Sets wieder auf die Antikörperkopplung mittels Protein A. 100 µl des wie oben beschrieben gewonnenen Zelllysats wurden zusammen mit 500 µl des zu dem Kit gehörigen Puffers in ein Mikrozentrifugen-Tube gegeben. Die Lösung wurde nun mit dem mAK 735 mit einer finalen Verdünnung von 1/200 versetzt, welcher über Nacht bei 4°C inkubierte, um den Immunkomplex zu bilden. Zum Auffangen des Immunkomplexes wurden 20 µl der in dem Set enthaltenen und mit Prot A beschichteten Agarosekugeln genommen und für 1 h unter ständigem Schütteln mit dem Immunkomplex inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die Eluation durch Zugabe von 2-fach Probenpuffer sowie DTT (c = 20 mM) und Erhitzen auf 100°C für 5 min. Danach konnte die Probe mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot weiter verarbeitet werden.

3.9) Auftrennung von Proteinen: die Gelelektrophorese

Für ein 7% Trenngel 8 x 8,5 cm	Mengenangabe
Acrylamid (30:0,8) [ml]	1,75
Tris 1,5 mol/l, pH 8,8 [ml]	1,88
ddH ₂ O [ml]	3,75
SDS 10% [ml]	0,08
APS 10% (Ammoniumperoxidisulfat) [ml]	0,05
TEMED (N,N,N',N',-Tetramethylethan-1,2-diamin [µl]	5,0

Für ein 5% Sammelgel mit 8 x 8,5 cm	Mengenangabe
Acrylamid (30:0,8) [ml]	0,63
Tris 0,5 Mol/l, pH 6,8 [ml]	0,95
ddH ₂ O [ml]	2,13
SDS 10% [ml]	0,038
APS 10% (Ammoniumperoxidisulfat) [ml]	0,075
TEMED (N,N,N',N',-Tetramethylethan-1,2-diamin [µl]	5,0

Lösung	Zusammensetzung
10 x Laemmli	60,5 g Tris, 100 g Glycine, 10 g SDS

Eine Elektrophorese dient der Auftrennung verschiedener Proteine nach ihrer Größe und Ladung mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Bei der Gelelektrophorese speziell macht man sich ein Gel zu Nutze, welches eine bestimmte Porengröße aufweist, sodass die unterschiedlichen Proteine nach ihrer Größe unterschiedlich schnell und somit weit wandern. Diese Porengröße entsteht in unserem Fall durch den Gehalt an Acrylamid in dem Gel, durch welches große Proteine langsamer wandern als kleine. Damit in einer eindimensionalen Proteintrennung, wie es bei uns immer der Fall war, die unterschiedlichen Ladungen der Proben keinen Einfluss auf die Laufeigenschaften haben, wird sowohl dem Gel als auch der Probe selbst zusätzlich SDS hinzugeben, welches bewirkt, dass alle Proteine die gleiche negative Ladung aufweisen und somit auf Grund der Ladung zur Anode wandern. Für diese Promotion wurde immer ein kontinuierliches System verwendet mit einem Gehalt von 7% Acrylamid pro Trenngel

und zusätzlich ein 5-prozentiges Sammelgel. Für die Herstellung dieser Gele gab man die Bestandteile nacheinander zu, wobei APS und TEMED die letzten waren, da nach deren Zugabe die Polymerisation beginnt. Das Gemisch wurde zwischen zwei Glasplatten gegeben und mit Isopropanol überschichtet, um eine Austrocknung des Gels während des Polymerisationsvorgangs zu verhindern. Im Anschluss wurde das Sammelgel, bei dem die Herstellung analog zum Trenngel mit Ausnahme eines geringeren Gehaltes an Acrylamid erfolgte, mit dem Trennkamm für die Taschen hinaufgegeben. Das fertige Gel wird nun in die dafür vorgesehene Apparatur zusammen mit dem Laemmli-Puffer gegeben. Die Proben wurden, bevor man sie auf das Gel auftragen kann, mit 3-fach Probenpuffer bei ca. 100°C gekocht, um nicht kovalente Bindungen (wie zum Beispiel Wasserstoffbrücken) zu lösen. Dieses Auflösen der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur ermöglicht eine vollständige und gleichmäßige Bindung von SDS, welches sich im Probenpuffer befindet, an die Proben. Durch die negative Ladung des SDS wandern nun die Moleküle, entsprechend ihrer Größe, zur Anode; je kleiner das Protein ist, desto weniger stark wird es von dem dreidimensionalen Acryl-Netzwerk aufgehalten und läuft demzufolge weiter als große Moleküle. Beim Auftragen der Proben ist für eine quantitative Aussage darauf zu achten, dass man die Taschen mit gleichen Mengen an Protein belädt. Zusätzlich wurde jeweils ein Marker aufgetragen, um eine Größenabschätzung der gewanderten Proteine zu ermöglichen (Color Prestained Protein Standard, broad range 11-245 kDa) Schließlich wurde die Apparatur an die Stromquelle angeschlossen und der Lauf gestartet. Dafür wurde zunächst eine Stromstärke von 20 mA für ein Gel eingestellt, welche auf 30 mA erhöht wurde, sobald die Proben das Trenngel erreicht hatten. Für die Spannung wurde kontinuierlich 400 V und für die Leistung 100 Watt eingestellt. Für die Visualisierung der aufgetrennten Proteine dienen verschiedene weitere Methoden, wobei für diese Doktorarbeit nur der Western Blot und die Coomassie-Färbung eine Rolle spielten.

3.10) Visualisierung von Proteinen mittels Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung beruht auf dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau. Dieser lagert sich unspezifisch an basische Seitenketten von Aminosäuren an und färbt diese so blau. Die nicht vorhandene Spezifität hierbei ist ein entscheidender Unterschied zum hoch spezifischen Western Blot. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei <30 ng/Protein. Für diese Methode wurden 10 ml Roti® -Blue [Roth] zusammen mit 30 ml dH₂O und 10 ml Methanol vermischt und das Gel mit den aufgetrennten Proteinen darin über Nacht inkubiert. Zum Entfärben wurde 25%iges Methanol verwendet.

3.11) Visualisierung von Proteinen mittels Western Blot

Lösungen	Zusammensetzung
10 x Towbin-Transferpuffer, pH 8,0, 1 L	141 g Glycine (200 mM), 30 g Tris (25 mM), 7,5 g SDS, 20% Methanol (v/v) erst unmittelbar für 1x Transferpuffer zugeben
10 x TBS, pH 7,4, 1 L	24,2 g Tris, 80 g NaCl, mit HCl auf pH 7,4 einstellen
1 x TBS-T Waschpuffer	100 ml 10 x TBS mit 900 ml aqua dest. verdünnen, 1 ml Tween 20
Blocking Puffer	0,5% fettfreie Milch in TBS-T
Chemolumineszenz (Menge für eine Membran)	8 ml Luminol, 3 µl H ₂ O ₂ , 0,8 ml Coumarinsäure

Der Western Blot folgt unmittelbar nach dem Ende der Gelelektrophorese und ermöglicht den Transfer der aufgetrennten Proteine im Gel auf eine Trägermembran. Während bei einer Gelelektrophorese die Proteine vertikal nach ihrer Größe aufgetrennt werden, wird nun ein elektrisches Feld senkrecht zum Gel angelegt, sodass das Muster der aufgetrennten Proteine erhalten bleibt. Trägermembranen können aus Nitrocellulose (NC) oder aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) gefertigt sein, wobei von uns nur letztere verwendet wurden, da diese eine höhere Proteinbindekapazität pro cm² aufweisen.

Vor dem Blotten wurden die auf 8 x 8,5 cm zugeschnittenen Filterpapiere (4 pro Gel) in den Transferpuffer eingelegt. Die PVDF-Membran wurde kurzzeitig mit Methanol benetzt, bevor sie nach dem Abspülen mit ddH₂O ebenfalls in den Transferpuffer gegeben wurde. Zuletzt erfolgte das Einlegen des mit den Proteinen beladenen Gels für 7 min in die gleiche Lösung. Nach Ablauf der Zeit wurden alle Materialien folgenderweise von der Anode ausgehend in der Blotapparatur geschichtet:

2 Filterpapiere

PVDF-Membran

das proteinbeladene Gel

2 Filterpapiere

Dabei ist besonders zu beachten, dass weder das Gel noch die Membran zu irgendeinem Zeitpunkt austrocknen und dass zwischen diesen beiden Schichten sich keinerlei Luftblasen befinden, da diese das Übertragen der Proteine verhindern würden.

Deshalb wurden nach dem Stapeln aller Materialien mögliche Luftblasen mittels vorsichtigen Ausstreichens entfernt. Zuletzt wurde die Apparatur zusammengesetzt und Strom angelegt. Geblottet wurde dabei für 1 h mit 1 mA/cm^2 .

Direkt danach wurde die nun mit Protein beladene Membran in ein SNAP-System überführt. Dieses Gerät saugt mit Unterdruck Lösungen durch die PVDF-Membran und beschleunigt so das Waschen und Blocken. Dafür wurden jeweils 30 ml einer Lösung mit 5 bar durch die Membran gesaugt. Zuerst wurde nun die Membran einmal mit dem oben beschriebenen Waschpuffer gewaschen; dem folgte der Blockschrift mittels 0,5-prozentiger fettfreier Milch in TBS-T und zuletzt wurde wiederholt 3-mal gewaschen. Das Blocken dient dem Absättigen von unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran. Nach dem Waschen wurde die Membran in eine Schale überführt, in der unter leichtem Schwenken bei 8°C über Nacht die Antikörper-Bindung erfolgte. Der Antikörper wurde dabei in 5% bovines Kälberserum IgG Fraktion IV in TBS-T angerührt. Wenn nicht anders beschrieben, wurde der mAK 735 (gegen PolySia von einer Länge von mindestens 8 Zuckerketten gerichtet) in einer finalen Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ verwendet.

Am folgenden Tag wurde zum Entfernen der nicht gebundenen Antikörper die Membran 3-mal für jeweils 10 min mittels TBS-T unter leichtem Schwenken gewaschen. Nun folgte die Bindung des zweiten Antikörpers, welcher mit einer Peroxidase (HRP) gekoppelt ist. Dieses Enzym ist in der Lage, verschiedene Peroxide (in unserem Fall Wasserstoffperoxid) zu reduzieren und so das vorher farblose Chromogen zu einem farbigen Endprodukt zu oxidieren. Wenn nicht anders angegeben handelte es sich dabei um einen Antikörper, welcher gegen die Epitope, welche aus einer Maus stammen, gerichtet ist (Polyclonal Rabbit anti-mouse, HRP linked). Dieser wurde in einer finalen Konzentration von $0,22 \mu\text{g/ml}$ in 0,5% fettfreier Milch in TBS-T gegeben und für 1,5 h bei RT leicht schwenkend inkubiert. Nach wiederholtem dreimaligem Waschen für je 10 min mit TBS-T, wurde die PVDF-Membran kurz mit dH_2O gewaschen, bevor die Chemolumineszenzlösung für 2 min auf die Membran gegeben wurde. Die damit beschichtete Membran wurde anschließend in einer Dunkelkammer, unter Rotlicht, auf einen Film entwickelt und fixiert. Je nach Intensität des Signals variierte die Entwicklungszeit.

3.12) Dot Blot

Eine weitere Methode, welche vom Prinzip dem herkömmlichen Western Blot sehr ähnlich ist, ist der Dot Blot. Der Unterschied ist, dass Proben direkt auf die Membran pipettiert werden und diese auf Grund eines Unterdrucks an der Membran haften bleiben. Der Vorteil dabei ist, dass man deutlich kleinere Mengen einer Probe braucht und weiterhin eine deutlich größere Anzahl verschiedener Proben auf eine Membran laden kann. Beim Dot Blot wurde, ähnlich wie beim Western Blot, zuerst eine PVDF-Membran mit Methanol benetzt und ein Filterpapier in ddH₂O eingelegt. Anschließend wurden beide in die Dot Blot-Apparatur eingespannt, wobei das Filterpapier unter die Membran gelegt wurde. Das System wurde an eine Pumpe angeschlossen, sodass die Flüssigkeiten, welche man in die verschiedenen Löcher transferiert, durch die Membran gesaugt wurden. Erst wurde jedes Loch zweimal mit ddH₂O gespült, danach die jeweiligen Proben hinaufgegeben und zuletzt erfolgte wieder ein dreimaliger Spülvorgang mit ddH₂O. Daraufhin wurde die PVDF-Membran aus der Apparatur genommen und in das SNAP-System überführt. Nun glich der weitere Vorgang jenem des Western Blots.

3.13) PNGase F Verdau

Bei dem Enzym Peptid-N-Glykosidase F (kurz PNGase F) handelt es sich um ein Enzym, welches ausschließlich N-glykosidisch gebundene Zuckerreste von deren Proteingerüst abspaltet. Demzufolge gibt ein Verdau Aufschluss über die zu Grunde liegende Bindung der Zuckerkette an dem Proteingrundgerüst. Das Set beinhaltet zusätzlich einen Denaturierungspuffer (5% SDS, 400 mM DTT), einen NP-40-Puffer sowie einen PNGase F-Reaktionspuffer (0,5 M Na-Phosphat-Puffer, pH 7,5).

Für den Verdau wurden die vorher mittels Dynabeads isolierten trockenen Proben in je 16 µl Glykoprotein-Denaturierungspuffer resuspendiert und anschließend bei 100°C für 10 min denaturiert. Nach dem Abkühlen wurde jeweils 1,5 µl des Detergenz NP-40, sowie 2 µl des Na-Phosphat-Puffers, hinzugeben. Letztendlich wurde eine Probe geteilt und in die Hälfte 100 U PNGase F hinzugegeben. Alle Proben inkubierten daraufhin bei 37°C über Nacht. Die fertigen Proben wurden nun mit Probenpuffer versehen und je äquivalente Mengen der Proben wurden per SDS Page, Western Blot und anschließender Chemolumineszenz entwickelt.

3.14) Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz dient der Detektion des zu untersuchenden Antigens mittels eines spezifischen Antikörpers, welcher wiederum mit Hilfe eines zweiten fluoreszierenden Antikörpers visualisiert wird. Zu Beginn wurden entsprechend passende Cover Slips in eine 24-Well-Platte gegeben und je 80.000 Zellen in 500 µl Hungermedium hinzugegeben. Diese wurden für mindestens 15 min im Brutschrank ruhiggestellt, um durch Stress bedingte Reaktionen der Zellen zu vermeiden. Je nach weiterem Vorgehen gab man nun ein Stimulans hinzu oder verlängerte die Ruhephase auf mindestens eine Stunde. Diese Zeit wurde benötigt, damit die Zellen sich auf Grund ihrer eigenen Größe und der Schwerkraft auf den Cover Slips absetzten. Um die Zellen nun zu fixieren und, je nach Versuch, bei vorangegangener Stimulation diese zu unterbrechen, wurden jeweils weitere 500 µl 8% Paraformaldehyd vorsichtig hinzugegeben, sodass man auf eine finale Konzentration von 4% PFA kommt. Paraformaldehyd quervernetzt die Proteine in einer Zelle und fixiert diese somit. Weitere 30 min bei 37°C reichten aus, um diesen Vorgang abzuschließen. Die Cover Slips mit den darauf befindlichen fixierten Zellen konnten nun vorsichtig aus den jeweiligen Wells entnommen und auf einen Objektträger platziert werden. Für den handlicheren Umgang wurden die Cover Slips mit einem hydrophoben Fettring umgeben, der es ermöglichte, alle Flüssigkeiten in den weiteren Schritten vorsichtig auf die Zellen zu geben und im Anschluss diese wieder abzusaugen. Zuerst folgten drei Waschvorgänge für je 5 min mit TBS. Nach dem Waschen mussten die Zellen permeabilisiert werden. Dafür wurden sie für 1 min mit 0,5% Triton X-100 behandelt und anschließend wiederholt 3-mal für je 5 min mit TBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu beseitigen, blockte man diese nun mit 2% IgG-freiem BSA in TBS für 30 min bei 37°C. Im Anschluss konnte man nun die Zellen mit dem jeweiligen Antikörper oder dem Enzym EndoN inkubieren. Diese wurden in der jeweils passenden Konzentration in 2% IgG-freiem BSA in TBS gelöst und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die nicht gebundenen Reste wurden daraufhin durch dreimaliges Waschen entfernt, um dann im Falle der primären Antikörper den sekundären Antikörper, welcher gegen das Epitop des primären AK gerichtet und mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist, hinzuzugeben. Auch dieser wurde in 2% IgG-freiem BSA in TBS gelöst, allerdings genügte die Zeit von 1 h bei Raumtemperatur zum Inkubieren. Falls eine Mehrfachfärbung erwünscht war, begann man nun nach dem wiederholten dreimaligen Waschen wieder mit einem weiteren primären Antikörper. Anderenfalls wurde eine Kernfärbung mittels 2 µM 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) für 10 min durchgeführt. DAPI interkaliert dabei mit der DNA des Zellkerns und färbt diesen somit an. Nach anschließendem Waschen wurden die Zellen nochmals mit 2% PFA für 30 min

bei RT fixiert und anschließend eingedeckelt. Dafür wurden je 8 µl Glycerolgelatine verwendet.

3.15) Probenaufarbeitung für Proteomik

Ausgehend von einem wie oben beschrieben hergestellten Zellysate wurde eine Immunpräzipitation mittels EndoN-Dynabeads durchgeführt, um Material für eine Proteinidentifizierung zu gewinnen. Dafür wurde nach erfolgreicher Isolierung des vermuteten Proteins ca. 10% einer trockenen Probe in 2-fach Probenpuffer auf ein separates Gel aufgetragen und mittels anschließendem Western Blot und Chemolumineszenz ausgewertet. Dieser Schritt diente der Sicherung einer erfolgreichen Affinitätspräzipitation, und dies stellte somit die Basis einer Proteinaufkonzentrierung dar.

Die aufkonzentrierten Proben wurden in 30 µl 2 × Laemmli Sample Buffer, welcher mit 0,7 µl Mercaptoethanol versehen wurde, resuspendiert und anschließend für 5 min denaturiert bei 96°C. Für die nun folgende Gelelektrophorese wurde ein industriell gefertigtes Gradientengel genutzt, um eine Kontamination der Proben weitestgehend zu reduzieren. Zum einen wurden 15 µl der Proben für die massenspektrometrische Analyse auf eine Bande aufgetragen, zum anderen, mit einem Abstand von einigen Banden, wurden weitere 10 µl aufgetragen. Der zweite Bereich dient zur Weiterbearbeitung mittels Western Blot und Chemolumineszenz, um den Kilodalton-Bereich, in dem sich das zu identifizierende Protein befindet, zu ermitteln. Die andere Hälfte des Gels wurde einer Coomassie-Färbung unterzogen, um die Proteine zu fixieren. Dies geschah, indem das Gel in eine Lösung aus 30 ml dH₂O zusammen mit 10 ml Methanol und 10 ml RotiBlue über Nacht bei RT unter leichtem Schwenken gegeben wurde. Im Folgenden wurde das Gel mit 25% Methanol in dH₂O entfärbt, bis die gewünschte Färbung erreicht wurde. Nun konnte man die gewünschten Bereiche anhand der Immunfärbung im Western Blot aus dem Gel vorsichtig ausschneiden.

Alle weiteren Schritte erfolgten unter möglichst hochreinen Bedingungen, um Kontaminationen mit Hautschuppen weitestgehend auszuschließen. Sämtliche Vorgänge fanden nacheinander statt, wobei jede vorherige Lösung entfernt wurde, bevor die nächste hinzugegeben wurde. Die Gelstücke mussten in ein Low-Binding-Eppi überführt und in ca. 1 mm² kleine Stücke zerschnitten werden, damit die Enzyme und Chemikalien eine möglichst große Oberfläche zur Verfügung haben. Zunächst erfolgte das Reinigen der Probe mit 200 µl Aqua dest. bei leichtem Vortexen für 30 s. Danach

wurden die Gelstücke zum Entfärben für eine Minute mit 200 µl einer Lösung aus Methanol und 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (1:1 v/v) unter ständigem Vortexen versetzt. Dieser Vorgang wurde anschließend wiederholt. Nun erfolgte die Dehydrierung für 5 min durch 200 µl Acetonitril mit 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3) (1:1 v/v), wieder unter ständigem Vortexen. Für eine endgültige Dehydrierung sorgte eine anschließende Hinzugabe von 200 µl 100% Acetonitril für 30 s. Der Überstand wurde in der üblichen Weise entfernt, nur sorgte eine anschließende Behandlung in der SpeedVac für die Entfernung der letzten Flüssigkeitsreste. Die Rehydrierung erfolgte in 100 µl frisch angesetztem 25 mM Dithiothreitol (DTT) mit 50 mM NH_4HCO_3 . Dieser Vorgang vollzog sich bei 56°C für 20 min unter Rütteln, um eine reversible Spaltung der Disulfidbrücken (Reduktion der Cysteine) zu bewerkstelligen. Für eine irreversible Alkylierung der frei gewordenen Sulfhydrylgruppe und damit die endgültige Spaltung der Disulfidbrücken wurden 100 µl frisch angesetztes Iodoacetamid (55 mM) mit 50 mM NH_4HCO_3 für 20 min bei RT in Dunkelheit hinzugegeben. Dies war erforderlich, damit die während des enzymatischen Verdau im Folgenden entstehenden neuen Peptidfragmente keine neuen ungewollten Bindungen eingehen. Nach dem Vorgang mussten die Gelstücke 2-mal mit 400 µl ddH₂O gewaschen werden, bevor eine zweite Dehydrierung exakt nach dem oben beschriebenen Verfahren durchgeführt wurde. Diesmal erfolgte allerdings die Rehydrierung in 20 µl einer Lösung aus 12 ng/µl Trypsin in 0,025% ProteaseMax™/50 mM NH_4HCO_3 für 10 min. Danach, sofern dies erforderlich war, wurde so viel dieser Lösung ohne Trypsin hinzugegeben, bis die Gelstücke vollständig beschichtet waren. Nun wurde die Probe für den enzymatischen Verdau bei 37°C unter leichtem Rütteln für 3 Stunden inkubiert. Zum Auffangen des Kondensats wurde die Probe für 10 Sekunden bei 12.000 × g zentrifugiert, um anschließend 10 µl von 0,01% Protease Max Surfactant in ddH₂O hinzuzugeben und für 5 min auf dem Schüttler zu inkubieren. Nun wurde der Überstand in ein neues Low-Binding Eppi überführt. Anschließend wurde den Gelstücken 20 µl 1% Trifluoressigsäure (TFA) in 0,01% ProteaseMax Surfactant hinzugegeben, um die basischen Peptide möglichst aus der Gelmatrix zu extrahieren. Wieder inkubierte dies unter Rütteln für 5 min, bevor man den Überstand in das neue Eppi überführte. Die Extraktion mittels TFA wurde wiederholt und letztendlich wurde das Eppi mit den extrahierten Überständen bei -20°C schockgefroren und gelagert.

50% der verdauten Probe (C1) wurde lyophilisiert und für Proteomics-Testmessungen an das Applikationslabor der Firma Bruker Daltonik GmbH, Bremen, geschickt. Hier erfolgten die Messungen über ein ESI-LC-QTOF (Impact II) Instrument. Zur Proteinidentifizierung wurden die generierten MS- und MS/MS-Daten zur Datenbanksuche (Mascot) eingesetzt.

3.16) RNA Isolation

Für die Isolation von RNA wurde das RNeasy Kit von Qiagen verwendet. Primär wurde ein Zellpellet, bestehend aus 5×10^6 Zellen, in 10 ml PBS zum Waschen gelöst und anschließend für 5 min bei 4°C und $300 \times g$ abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 600 μl Lysepuffer resuspendiert. Nach erfolgreicher Lyse wurde der Überstand bei $10.000 \times g$ abzentrifugiert und auf einen gDNA Eliminator-Filter gegeben, welcher in ein 2 ml Sammelbehältnis überführt wurde. Nach dem Zentrifugieren bei $10.000 \times g$ für 30 s wurde der Filter mit der gebundenen DNA verworfen und der Durchfluss wurde im Verhältnis von 1:1 mit 70% Ethanol auf einen RNA-Filter gegeben. Nach wiederholtem Zentrifugieren für 15 s bei $10.000 \times g$ wurde nun der Durchfluss verworfen und auf den Filter wurde 700 μl RNA-Puffer gegeben. Der Durchfluss wird nach erfolgter Zentrifugation für 15 s verworfen und auf die Membran wurde 500 μl des RPE-Puffers gegeben. Dieser wird für 15 s abzentrifugiert und wieder verworfen. Der Vorgang wurde wiederholt, allerdings beim zweiten Mal für 2 min im Anschluss zentrifugiert. Nun wurde der RNA-Filter in ein neues Sammelbehältnis überführt, bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert und im Anschluss bei Raumtemperatur getrocknet. Zuletzt überführte man den Filter in ein neues Sammelgefäß, gab zum Eluieren der RNA 30 μl RNase-freies Wasser hinzu und zentrifugierte das Gemisch für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit. Die Konzentration und Qualität wurde mit dem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Peqlab Biotechnologie GmbH, München, Germany) gemessen. Dabei diente das Verhältnis der Absorptionsmaxima von 260nm/280nm der Kontrolle der Reinheit der im Vorfeld isolierten RNA. Unterhalb eines Verhältnisses von 1,8 könnte man eine Verunreinigung von Proteinen oder Phenolen vermuten; ab einem Verhältnis von 2,0, welches in dieser Arbeit bei allen Proben in etwa erreicht wurde, kann man von reiner RNA sprechen.

3.17) Umschreiben von mRNA in cDNA und anschließende qPCR

Um das Vorkommen von mRNA für die Gene *st8sia2*, *st8sia4* und *ncam* zu untersuchen, musste primär die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dafür wurde das I-Script Synthese-Kit von Biorad verwendet. 1 μl der im Vorfeld isolierten RNA ($c = 200 \text{ ng}/\mu\text{l}$) wurde in 14 μl RNase-freiem Wasser verdünnt und mit 4 μl der iScript cDNA Synthesis Kit Mix-Lösung sowie 1 μl der reversen Transkriptase versetzt. Als Negativkontrolle diente derselbe Ansatz ohne die reverse Transkriptase. Dies geschieht zum Ausschluss von Verunreinigungen der Probe in Form von jeglicher DNA. Die

Reaktion wurde mit Hilfe eines Thermocyclers (MWG-Biotech, Primus 96 plus) durchgeführt.

Die hergestellte cDNA wurde mittels real Time PCR repliziert. Dafür wurde der Icyler von Biorad benutzt. Dieser kombiniert eine herkömmliche Polymerase-Kettenreaktion mit einer fluoreszenzspektrometrischen Messung. Dies ermöglicht eine quantitative Messung von bestimmten Genprodukten. Dafür wurde der fluoreszierende Farbstoff SYBR Green I benutzt. Dieser lagert sich in der kleinen Furche von Doppelstrang-DNA an. Somit steigt das Fluoreszenzsignal proportional zu den hergestellten DNA-Produkten. Dies ist allerdings auf Grund der optimalen Reaktionsbedingungen nur während der exponentiellen Phase der PCR möglich. Damit unterscheidet sich dieses Verfahren auch von anderen PCR-Methoden, welche erst nach Ablauf der PCR eine quantitative Auswertung ermöglichen.

Für die PCR wurden dann die 200 ng/µl Ausgangslösung RNA, welche in cDNA umgeschrieben worden war, auf ein Fünftel der Ausgangskonzentration verdünnt. 1 µl dieser Lösung wurde zusammen mit 9 µl einer Lösung bestehend aus 4 µl des Primermixes für das jeweilige Gen und 5 µl des fluoreszierenden Farbstoffs „IQ SYBR Green Supermix“ von Biorad in eine 96-Well-Platte gegeben. Die PCR wurde insgesamt mit 40 Zyklen durchgeführt, währenddessen es jeweils zur Denaturierung der Doppelstrang-DNA, Primerhybridisierung und schließlich Amplifikation durch die DNA-Polymerase kam. Ein Zyklus bestand aus 3 min bei 94°C, 30 s bei 60°C, 45 s bei 70°C, gefolgt von 10 s bei 94°C, 30 s bei 60°C und 45 s bei 70°C. Zuletzt wurde die PCR mit 10 s bei 94°C, 30 s bei 60°C und 7 min bei 70°C durchgeführt. Zur Positiv-Kontrolle wurde zusätzlich ein Primer für das Transkript GPDH angefertigt. Dies ist ein Enzym, welches in fast allen Zellen vorhanden ist und somit bei richtigem Versuchsaufbau und Umsetzung nachzuweisen sein sollte.

Die Primer wurden für die entsprechenden Exons designed, welches für das zu untersuchende Gen codiert. Beim Designen mussten mehrere Faktoren berücksichtigt werden. Zum einen sollte ein Primer nicht größer als 30 Basenpaare sein, da mit steigender Größe sowohl die Schmelz- als auch die Hybridisierungstemperatur (auch Annealing-Temperatur) steigen. Die Hybridisierungstemperatur beträgt ca. 65-70°C, die Schmelztemperatur, also die Temperatur, bei der der Primer die Bindung an der DNA verliert, sollte maximal 20° C darunter liegen, da eine zu niedrige Schmelztemperatur zu falsch positiven Ergebnissen führen würde. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer hatten eine Schmelztemperatur von ca. 60°C. Weiterhin von Bedeutung ist der Gehalt an Guanin-Cytosin (GC) innerhalb des Primers. Diese bilden drei

Wasserstoffbrückenbindungen und sind somit stabiler als Adenosin-Thymin (zwei Wasserstoffbrückenbindungen). Somit ist die Bindung von Primern mit hohem Gehalt an GC stabiler. Um eine bestmögliche Spezifität des Primers zu gewährleisten, wurde die Gensequenz möglichst so ausgesucht, dass die Sequenzen auf zwei verschiedenen Exons lokalisiert sind. Wenn DNA-Verunreinigungen vorhanden sind, kommt es zu größeren PCR-Produkten, da sie noch das Intron zwischen den beiden Exons besitzen. Zuletzt wurde noch die Selbstkomplementarität der Primer berücksichtigt. Dies meint die Fähigkeit des Primers, an sich selbst und andere Primer zu binden. Somit ist hier ein möglichst niedriger Wert vorteilhaft. Die Primer stammen von TIB-Molbiol mit Ausnahme des Primers für das Transkript von NCAM (SIGMA). Die Sequenzen der Primer sind im Folgenden aufgeführt:

Transkript	Forward Primer	Produktgröße (Bp)	Datenbank- nummer
	Reverse Primer		
NCAM (SIGMA)	394-413 GGGAAGATGCCGTGATTGT	183	NM_000615.6
	576 – 557 TCTGCCCTCACAGCGATAAG		
NCAM	532-555 GATCTTTCAGAAGCTCATGTTCAA	224	NM_000615.7
	755-732 GATAAGTGCCCTCATCTGTTTTCT		
ST8SialI	373-396 GAGACATAACCAGACGCTCTCTCT	210	NM_006011.4
	582-559 GTCCCAAAGTGCTTATTCTTCAGT		
ST8SialIV	701-724 TACCTGAAGTTTCACCAATGAAGA	212	NM_005668.6
	912-889 TGCTCTTTGTACAACTGATGGATT		
GAPDH	923-946 TAGAAAACCTGCCAAATATGATG	217	NM_002046.7
	1139-1116 CTGTAGCCAAATTCGTTGTCATAC		

Tabelle 1. Gensequenzen der für diese Dissertation benutzen Primer

3.18) Spezifitätstest der qPCR mittels Agarosegel

Nachdem die qPCR durchgeführt wurde, wurden die Ergebnisse mittels 2% Agarosegel bestätigt. Für das Gel wurden 2g Agarose (Serva) in 100 ml 1 × TAE Puffer gelöst und für 3 min in einer Mikrowelle erhitzt. Danach wurden zum Anfärben der PCR-Produkte 5 µl SYBR Gold nucleic acid gel stain von Life Technologies dem Gel hinzugefügt. Dieser Farbstoff interkaliert in der DNA und färbt sie somit an. Nach der Polymerisation des Gels in einer geeigneten Apparatur von Biorad wurde das Gel mit der vervielfältigten DNA sowie den Positiv- und Negativ- Kontrollen beladen und eine Auftrennung der Proben erfolgte mittels Tischelektrophorese. Zum Vergleichen der errechneten Produktgrößen mit den tatsächlichen Proben wurde ebenfalls ein Marker aufgetragen.

3.19) Stimulation zur Degranulation der HMC₁ Zellen

Um zu untersuchen, welche Rolle PolySia bei der Degranulation von Mastzellen spielt, war es wichtig, eine gezielte Degranulation der Mastzellen zu bewerkstelligen. Als Stimulans wurde Ionomycin verwendet, da sich in anderen Arbeiten gezeigt hatte, dass eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration eine Degranulation auslöst (Draber et al. 2016). Ionomycin wird ursprünglich vom Bakterium *Streptomyces conglobatus* gebildet und gehört neben vielen anderen Stoffen zu der Gruppe der Ionophore. Dies sind Moleküle, welche in der Lage sind, Ionen durch eine biologische Membran (Zellmembran) zu transportieren. Dafür gibt es verschiedene Mechanismen, wobei die meisten, einschließlich Ionomyin, Ionen binden und zusammen mit dem gebundenen Ion in die Zelle diffundieren und diese letztendlich dort wieder freisetzen. Ionomycin transportiert spezifisch Ca²⁺ Ionen, was in der Zelle verschiedenste Reaktionen aufweist. So aktiviert es viele durch Ca²⁺ getriggerte Signalwege wie zum Beispiel auch die Degranulation der Mastzellen. Für die Stimulation wurde Ionomycin zu den in Lösung befindlichen Zellen in einer 24-Well-Platte (siehe Immunfluoreszenz) in einer Endkonzentration von 0,6 µM in Hungermedium gegeben und für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Falls mit den fertigen Proben ein Western Blot durchgeführt werden sollte, wurde an Stelle einer 24-Well-Platte eine 6-Well-Platte benutzt und es wurden 2 × 10⁶ Zellen in 1 ml Hungermedium resuspendiert. Nach der Inkubation wurde im Falle einer Immunfluoreszenz so wie oben beschrieben weiter vorgegangen, oder das weitere Vorgehen war wie folgt: Der Überstand wurde vorsichtig abpipetiert und in ein separates Eppi überführt. Die Zellen dagegen wurden in 300 µl RIPA Lysepuffer mit Hilfe eines Zellschabers aufgenommen und in ein neues Eppi überführt.

4) Ergebnisse

4.1) Polysialylierte Proteine auf humanen Mastzellen

Da schon im Vorfeld zu dieser Arbeit Frau Natascha Panasenکو aus der Arbeitsgruppe von Sebastian Galuska PolySia in Zelllysaten von HMC₁ Zellen detektieren konnte, galt es zunächst dieses Ergebnis zu bestätigen. Dafür wurde ein Zelllysate von HMC₁ Zellen wie beschrieben hergestellt. Dieses wurde durch eine Immunpräzipitation mittels der hergestellten Dynabeads konzentriert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot visualisiert. Als Kontrolle diente eine weitere Zelllinie (THP₁). Diese Monozyten-Zelllinie stammt ursprünglich von einem Patienten mit akuter monozytärer Leukämie und wurde verwendet, da bei dieser Zelllinie schon nachgewiesen wurde, dass diese PolySia exprimieren (Werneburg et al. 2016). Weiterhin diente, wie oben beschrieben, das Enzym EndoN als Kontrolle der Spezifität des primären Antikörpers. Ein Verlust des Immunsignals zeigt, dass dieser spezifisch gebunden hat. Um etwaige Unterschiede in der Proteinkonzentration auszuschließen, wurde in dieser Arbeit stets eine Probe hergestellt, diese erst unmittelbar für den Enzymverdau geteilt und anschließend äquivalente Mengen pro Bande aufgetragen. Für den enzymatischen Verdau wurde die eine Hälfte der Probe bei 37°C für zwei Stunden inkubiert und anschließend auf das Gel aufgetragen.

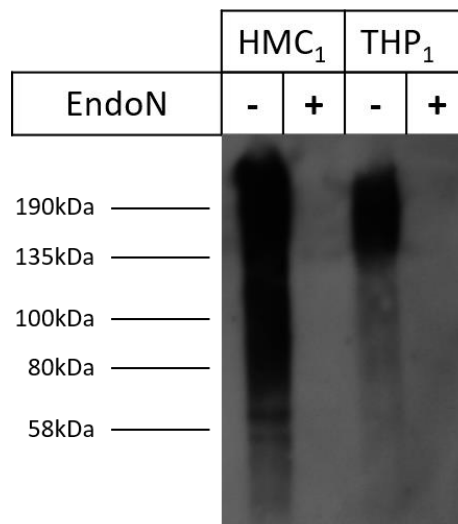


Abbildung 6. Visualisierung von polysialylierten Proteinen auf HMC₁ und THP₁ Zellen mittels Western Blot: Darstellung von PolySia in einem Zelllysate von HMC₁ und THP₁ Zellen. Letztere dienten lediglich als Kontrolle, da bei diesen das Vorhandensein von PolySia schon bestätigt wurde. Die Proben wurden mit mAK 735 (im Folgenden nur noch Anti-PolySia bezeichnet) inkubiert. Weiterhin diente der enzymatische Verdau durch EndoN als Kontrolle der Spezifität des primären Antikörpers.

In Versuchen von Frau Natascha Panasenکو, welche hier nicht dargestellt sind, konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Signalen der polysialylierten Proteine auf Mastzellen um hochmolekulare Proteine handelt. Deshalb wurde wie auch bei diesem Versuch immer ein siebenprozentiges Trenngel verwendet. Abbildung 6 zeigt das Ergebnis des Western Blots aus den Zelllysaten; als Antikörper diente Anti-PolySia. Man erkennt den für PolySia spezifischen Schmier, welcher sich im hochmolekularen Bereich befindet. Das Signal des Zelllysats der Mastzellen (erste Bande von links) reicht über ein Spektrum von über 190 kDa bis unter 58 kDa, was durch die unterschiedlich langen Zuckerketten zu Stande kommt. Durch den vollständigen Signalverlust nach dem enzymatischen Verdau (siehe Bande 2 bzw. 4) kann man davon ausgehen, dass der primäre Antikörper spezifisch gebunden hat. Da bei der Kontroll-Probe (Bande 3) ebenfalls ein Signal zu erkennen ist, kann man Fehler bei der Proteinübertragung ausschließen. Zu erkennen ist weiterhin, dass das Signal bei den THP₁ Zellen deutlich kürzer und schwächer ist als das der Mastzellen.

Die Kenntnis der Lokalisation eines Proteins ist von großer Bedeutung, sofern man auf dessen Funktion innerhalb einer intakten vitalen Zelle schließen möchte. Zur Darstellung und Bestimmung des Aufenthaltsortes nutzten wir eine Immunfluoreszenz. Bei dieser diente die „Mastzelltryptase“ als Mastzellmarker. Dabei handelt es sich um ein Enzym, welches sich in den Granula, die wiederum fast das gesamte Zytoplasma ausfüllen, der Zellen befindet. Der gegen Mastzelltryptase gerichtete Ak ist aus dem Kaninchen und wurde mittels entsprechendem Sekundärantikörper, der mit Alexa fluor 633 (Anregungswellenlänge 631 nm; Emissionswellenlänge 647 nm) konjugiert ist, visualisiert. PolySia dagegen wurde mit gegen Mausantikörper gerichtetem sekundärem Ak angefärbt, der mit FITC versehen ist, welches bei 493 nm angeregt wird und bei 517 nm emittiert. Der Kernfarbstoff DAPI wurde übersichtshalber mitgefärbt, um eine genauere Abgrenzung zum Zytoplasma zu erhalten. DAPI wird bei 353 nm angeregt und emittiert bei 465 nm. Weiterhin wurden Kontrollen, welche in dieser Arbeit nicht dargestellt wurden, angefertigt, um mögliche Kreuzreaktionen der Antikörper untereinander auszuschließen.

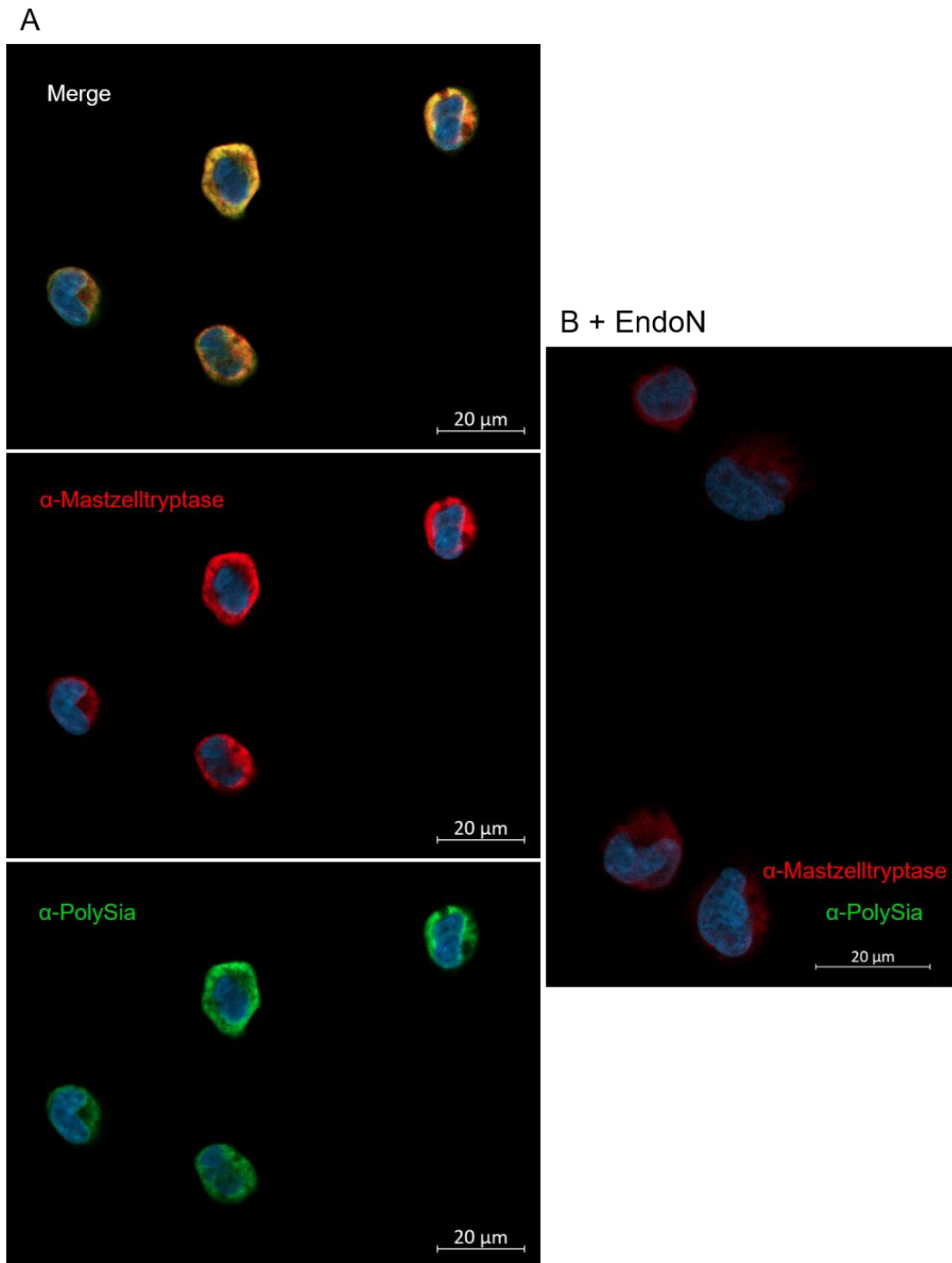


Abbildung 7. Immunfluoreszenz von HMC₁ Zellen: Zu sehen sind HMC₁ Zellen, bei denen sowohl die Mastzelltryptase (rot), als auch PolySia (grün) angefärbt wurden. Zudem wurde der Zellkern mittels DAPI (blau) angefärbt. A zeigt das Mischbild sowie die jeweiligen einzelnen Kanäle. B wiederum stellt die PolySia-Negativ-Kontrolle dar. Hier wurde PolySia enzymatisch degradiert.

Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abbildung 7 dargestellt. Zu sehen sind HMC₁ Zellen, bei denen sowohl die Mastzelltryptase (rot) als auch PolySia (grün) angefärbt wurden. Zudem wurde eine Kernfärbung mittels DAPI (blau) gemacht. Dieses interkaliert in der DNA und färbt diese somit an. Daneben wird die Negativkontrolle gezeigt, indem die Zellen mit dem Enzym EndoN behandelt wurden und folglich PolySia enzymatisch verdaut wurde (Abbildung 7 B). Der Verlust des Signals zeigt wie beim Western Blot die Spezifität des Antikörpers gegen PolySia. Anhand der Bilder in der linken Reihe lässt sich zeigen, dass sich PolySia ubiquitär in der gesamten Zelle befindet mit Ausnahme des Zellkerns. Es ist sowohl in der Zellmembran wie auch granulär im gesamten Zytoplasma lokalisiert, wobei das Signal randständig ein wenig intensiver zu sein scheint. Ähnlich verhält sich das Signal der Mastzelltryptase. Das granuläre Signal füllt das gesamte Zytoplasma aus, da dieses mit zur Ausschüttung bereiten Granula versehen ist.

Nachdem nachgewiesen wurde, dass PolySia auf den Mastzellen zu finden ist und die Signale hauptsächlich intrazellulär lokalisiert sind, stellte sich die Frage nach dem Trägerprotein der Zuckerkette. Dafür wurde das polysialylierte Protein mit dem Enzym Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) verdaut. Da das Enzym ausschließlich N-glykosidisch gebundene Zuckerketten von ihrem Grundgerüst abspaltet, gibt dies somit Aufschluss über die Bindungsart, mit welcher die Zuckerkette an das Protein gebunden ist. Die verdaute Probe wurde anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und per Western Blot dargestellt. Als Antikörper diente Anti-PolySia. Damit würde ein Signalverlust bei erfolgreichem Verdau auf eine rein N-glykosidische Bindung an das Protein hindeuten.

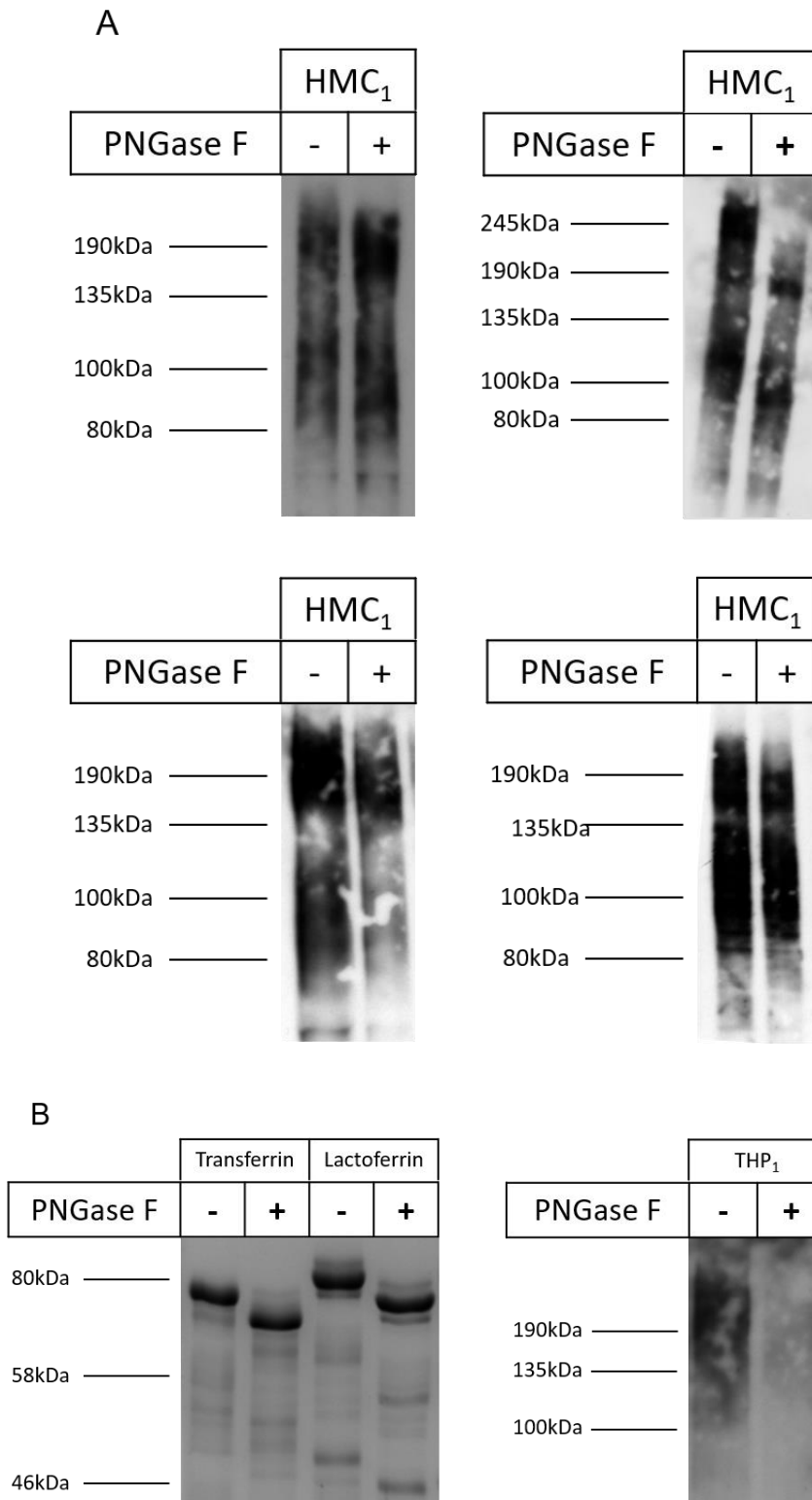


Abbildung 8. Enzymatischer Verdau von Zelllysaten mit anschließendem Western Blot: Abbildung A stellt 4 unabhängige Replikate desselben Versuchsaufbaus dar. Es handelt sich jeweils um ein Zelllysate von HMC₁ Zellen, welches geteilt und je eine Hälfte mit dem Enzym PNGase F behandelt wurde. Abbildung B zeigt lediglich die Kontrollen, welche in jedem der Versuche mitliefen. Es wird jeweils der enzymatische Verdau zweier Standards (linkes Bild) beziehungsweise der Monozyten-Zelllinie (rechtes Bild) dargestellt. Die Standards wurden mittels Coomassie-Färbung visualisiert.

Für die Interpretation des Versuches ist es unerlässlich, dass man über den erfolgreichen enzymatischen Verdau Auskunft hat. Deshalb wurden immer parallel auch Kontrollen neben den eigentlichen Proben unter den gleichen Bedingungen gehalten und mit dargestellt. Als Kontrolle dienten zum einen die beiden Glykoproteine Transferrin und Lactoferrin, da diese N-glykosidisch gebundene Zuckerketten besitzen. Weiterhin wurde ein Lysat der Monozyten-Zelllinie auf gleiche Weise behandelt und dargestellt wie das der Mastzellen. Dies geschah, da bei dieser Zelllinie die N-glykosidische Bindung von PolySia an NCAM bereits bekannt war (Hildebrandt et al. 2010; Werneburg et al. 2016). Das mit den Proben beladene Gel wurde nach dem Lauf getrennt und die Standards Lactoferrin und Transferrin wurden lediglich mittels Coomassie-Färbung visualisiert, wie in B von Abbildung 8 dargestellt. Man erkennt deutlich den Größenverlust der Proteine durch die Abspaltung der N-glykosidisch gebundenen Zuckerketten. Die THP₁ Zellen wurden wie auch die Mastzellen mittels Western Blot dargestellt. Bei ersteren zeugt der komplette Verlust des Signales von rein N-glykosidisch gebundenem PolySia. Sofern PolySia auch O-glykosidisch gebunden wären, hätte der Antikörper binden können und man würde keinen vollständigen Signalverlust erwarten. Bei den Proben der HMC₁ Zellen verhält es sich wiederum anders. Auf Grund der nicht ganz eindeutigen Interpretation wurden 4 Ergebnisse desselben Versuchsaufbaus dargestellt (A aus Abbildung 8). So konnte auch nach enzymatischen Verdau mittels PNGase F immer ein Signal von polysialylierten Proteinen beobachtet werden. Trotzdem lässt sich auch ein in allen verschiedenen Untersuchungen spezifischer Unterschied wahrnehmen. So wurde einerseits der für PolySia typische Schmier kürzer. Andererseits wurden die polysialylierten Proteine kleiner, sodass sie im Gel weiter wanderten. Dies führt zu dem dargestellten Versatz der Bande nach unten. Auch lassen sich gerade nach dem Verdau zwei verschiedene Bereiche ausmachen, welche ein verstärktes Signal von PolySia aufweisen. Einer befindet sich im hochmolekularen Bereich bei ca. 180 kDa, während sich der zweite eher bei 100 kDa befindet.

4.2) Identifizierung des polysialylierten Proteins

In vorangegangenen Versuchen von Frau Natascha Panasenکو konnte gezeigt werden, dass mRNA der Polysialyltransferase ST8SialIV sowie von NCAM vorhanden sind. NCAM als alleiniger PolySia-Träger wäre jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen des PNGase F-Verdaus (Abbildung 8), da polysialylierte N-Glykane von NCAM abgespalten werden können. Aus diesem Grund wurden die Expressionsversuche nochmals mit unabhängigen Primern durchgeführt. Gleichzeitig sollte, ebenfalls

nochmals mit unabhängigen Primern, überprüft werden, welche Polysialyltransferase in den Zellen aktiv und für die Polysialylierung verantwortlich ist. Dafür wurde mRNA aus einem Zellpellet der Mastzellen isoliert, mittels einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend mit einer bestimmten Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt. Das Vorhandensein der spezifischen Enzyme bzw. des Proteins wurde mit entsprechend hergestellten Primern überprüft. Zur Darstellung des Ergebnisses wurde die vervielfältigte DNA mit SCBR Green, einem fluoreszierenden Farbstoff, welcher sich an doppelsträngige DNA anlagert und diese somit anfärbt, versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen. Zum Größenvergleich der Genprodukte diente ein Marker. Für den Versuch wurde als Positivkontrolle GAPDH benutzt. Dieses Enzym wird von praktisch jeder Zelle exprimiert und sollte somit bei korrekter Versuchsdurchführung nachzuweisen sein.

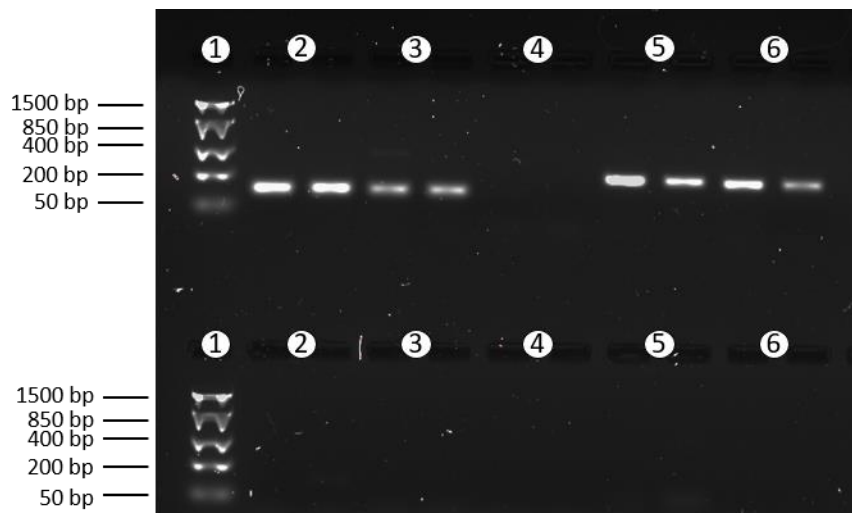


Abbildung 9. 2%iges Agarosegel der RNA-Analyse mit anschließender qPCR: Die obere Reihe zeigt die je doppelt aufgetragenen vervielfältigten DNA-Produkte in folgender Reihenfolge:

1: Marker; 2: GAPDH; 3: ST8SiaIV; 4: ST8Siall; 5: NCAM; 6: NCAM [Sigma]. Die zweite Reihe stellt dieselben Proben dar, welchen allerdings keine reverse Transkriptase zugesetzt wurde. Sie dienen somit als Negativkontrolle, um mögliche Verunreinigungen in Form von DNA auszuschließen.

Dessen Vorhandensein (Bande 2 in Abbildung 9) zeigt, dass die RNA Isolierung mit anschließender qPCR grundsätzlich erfolgreich war. Um mögliche Pipettierfehler oder sonstige Unregelmäßigkeiten zu minimieren, wurden letztendlich alle Proben doppelt aufgetragen. Als weiterer Sicherheitsfaktor wurden zwei verschiedene Primer für NCAM verwendet. Die beiden Primer waren lediglich gegen unterschiedliche Genloci gerichtet;

dies diene der Sicherheit, sofern ein Primer nicht sensitiv genug gewesen wäre. Auf Grund der Signale 3 und 4 lässt sich sagen, dass für die Polysialylierung bei HMC₁ Zellen ausschließlich ST8SiaIV verantwortlich ist, da man lediglich für diese mRNA isolieren konnte. Weiterhin wird NCAM in den Zellen exprimiert, was die Banden 5 und 6 beweisen. Das Genprodukt liegt bei ca. 200 Bp, was mit dem im Vorfeld anhand der Primer berechneten Produkt übereinstimmt. Um mögliche Verunreinigungen in Form von DNA zu detektieren, wurde jede Probe geteilt. Der zweiten Hälfte wurde keine reverse Transkriptase zugegeben, sodass bei diesen Proben kein Signal erwartet werden konnte, da die isolierte mRNA nicht umgeschrieben werden konnte. Das Fehlen des Signals in der gesamten zweiten Reihe zeigt somit die Reinheit der Probe.

4.3) Nachweis von polysialyliertem NCAM auf HMC₁ Zellen

Da mRNA von NCAM nachweisbar war, sollte mittels Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot kontrolliert werden, ob polysialyliertes NCAM gebildet wird.

Dafür wurde ein Zelllysate wie beschrieben gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine Membran übertragen. Diese wurde getrennt und je eine der beiden Hälften wurde mit einem primären Antikörper gegen PolySia oder gegen NCAM inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mittels Chemolumineszenz. Als Sicherheit, um die Wahrscheinlichkeit für ein falsch negatives Ergebnis zu minimieren, wurden drei Antikörper verwendet, welche jeweils gegen ein anderes Epitop von NCAM gerichtet sind. Alle Antikörper sind aus der Maus. Wie immer erfolgte als Marker für die Spezifität des Antikörpers gegen PolySia der Verdau eines Teils der Probe durch EndoN. Das Ergebnis der beiden getrennten Gelhälften ist in Abbildung 10 dargestellt. In A ist die eine Hälfte der Membran, welche mit Anti-PolySia inkubiert wurde, dargestellt. Deshalb lässt sich nach dem Verdau mit EndoN auch kein Signal mehr nachweisen, was gleichsam die Spezifität des Antikörpers beweist. B dagegen zeigt dieselbe Probe, welche allerdings mit einem primären Antikörpergemisch, das gegen die unterschiedlichen Epitope von NCAM gerichtet ist, inkubiert wurde. Die Probe, welche auf der zweiten Bande von Abbildung 10 B aufgetragen wurde, wurde zusätzlich mit EndoN verdaut. Bande 1 zeigt auch mit den gegen NCAM gerichteten Antikörpern den charakteristischen für polysialylierte Proteine spezifischen „Schmier“, welcher auf Grund der unterschiedlich langen Zuckerketten, die an das Protein gekoppelt sind, zustande kommt.

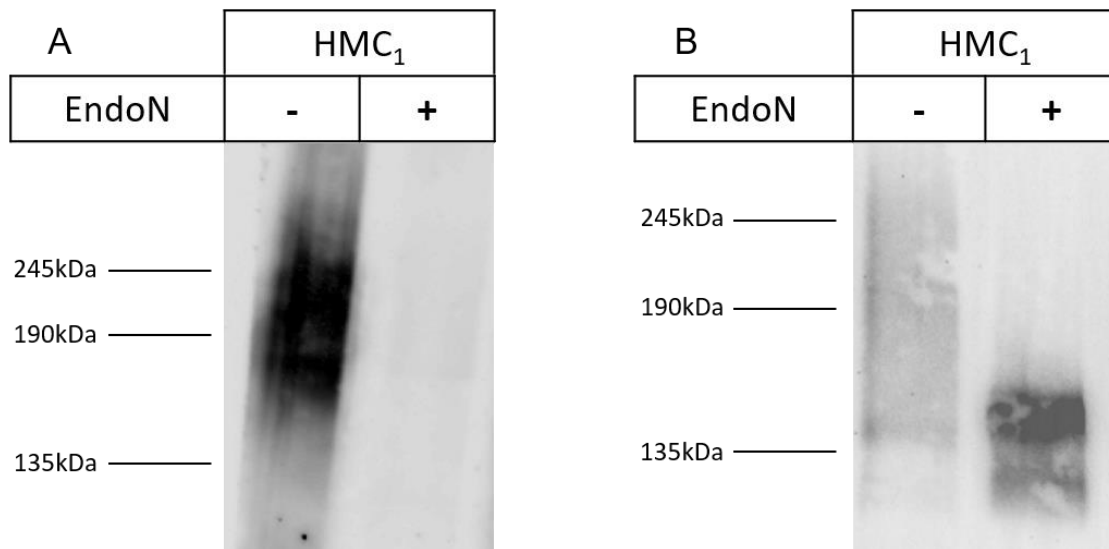


Abbildung 10. Nachweis von polysialyliertem NCAM auf humanen Mastzellen: Die Probe in Abbildung A wurden mit Anti-PolySia inkubiert, während in B dieselbe Probe dargestellt wird, welche allerdings mit dem Antikörpergemisch gegen die verschiedenen Epitope von NCAM inkubiert wurde. Die zweite Bande jeweils zeigt dieselbe Probe, welche zusätzlich mit dem Enzym EndoN verdaut wurde.

Nach dem Verdau des Polysaccharids liegt eine fokussierte Bande bei ca. 140 kDa vor, da nur noch Sialinsäureoligomere vorliegen (2. Bande in Abbildung 10 B). Zusammenfassend liefert dieses Ergebnis in Zusammenschau mit den im Vorfeld durchgeführten Untersuchungen den eindeutigen Hinweis für das Vorhandensein von polysialylierten Proteinen auf HMC₁ Zellen. Als weitere Kontrolle für die Tatsache, dass polysialyliertes NCAM in den Zellen vorliegt, wurde eine Immunpräzipitation mittels Protein A Beads, welche mit den verschiedenen Antikörpern gegen NCAM gekoppelt wurden, durchgeführt. Die mittels SpeedVac getrocknete Probe wurde in 100 µl TBS-Puffer resuspendiert und danach per Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot entwickelt. Als Antikörper für den Western Blot, welcher in Abbildung 11 dargestellt wird, diente Anti-PolySia.

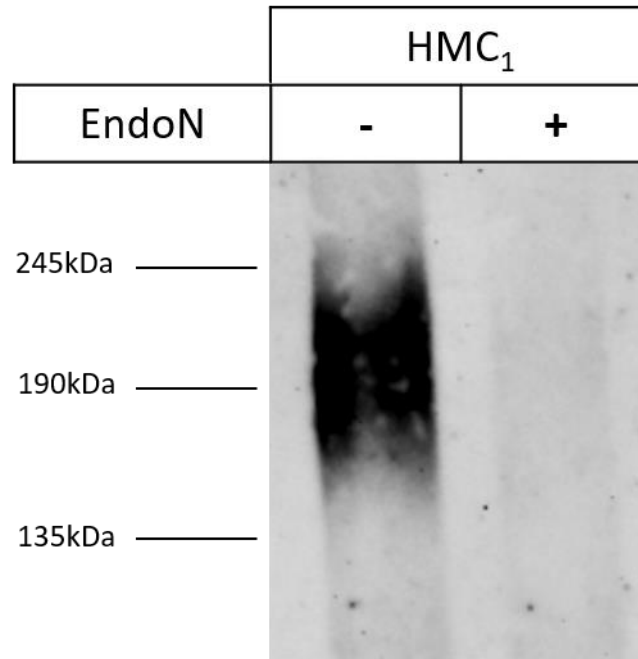
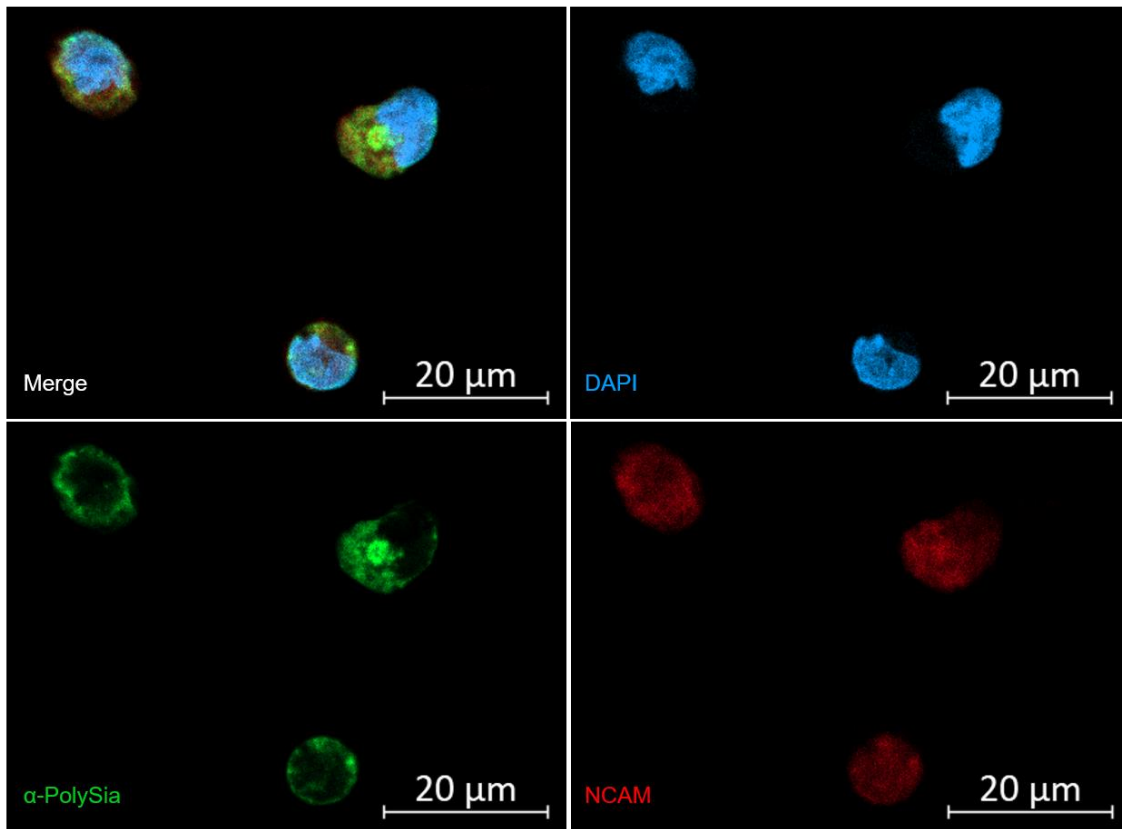


Abbildung 11. Isoliertes NCAM₁ mit anschließender Western Blot-Analyse: NCAM₁ wurde aus einem Zelllysat durch eine Immunpräzipitation mit Prot A Beads isoliert und die daraus gewonnene Probe gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit einem Western Blot dargestellt. Als Antikörper wurde Anti-PolySia benutzt.

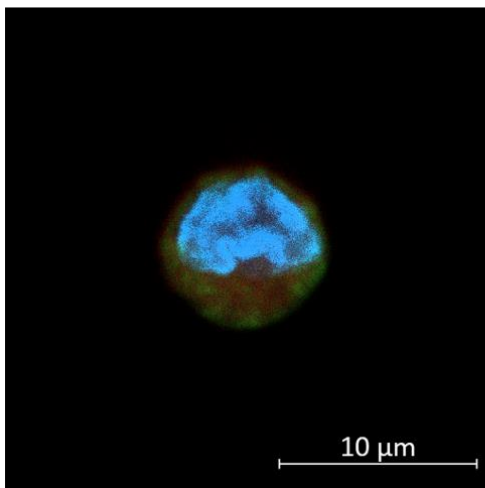
Zu sehen ist ein deutliches Signal von PolySia. Da dies eine Probe von isoliertem NCAM darstellt, lässt sich somit sicher sagen, dass dieses auch polysialyliert vorliegen muss. Daneben zeigt der Signalverlust durch die Behandlung mit EndoN wieder die Spezifität des primären Antikörpers gegen PolySia. Die langen Zuckerketten führen zu einer deutlichen Größenzunahme des Proteins, verglichen mit der Probe aus Abbildung 10 B, welche durch EndoN verdaut wurde. Somit könnte es sich um NCAM 140 handeln, dessen Signal auf Grund der enorm langen Zuckerketten im Bereich von ca. 180 – 250 kDa, wie in Abbildung 11 dargestellt ist, liegt.

Zur weiteren Untersuchung von polysialyliertem NCAM auf Mastzellen wurde eine Immunfluoreszenz durchgeführt mit dem Ziel, die Zuckerkette und das Protein auf einer Zelle darzustellen. Dafür wurde die Methodik wie beschrieben angewandt, als primäre Antikörper gegen NCAM dienten ein Antikörper aus Kaninchen, welcher gegen die Aminosäuren 1 - 300 am N-terminalen Ende des Proteins gerichtet ist, sowie Anti-PolySia, um PolySia zu markieren. Als sekundäre Antikörper wurden FITC anti-Maus Antikörper und Alexa 633 anti-Kaninchen Antikörper verwendet.

A



B



C + EndoN

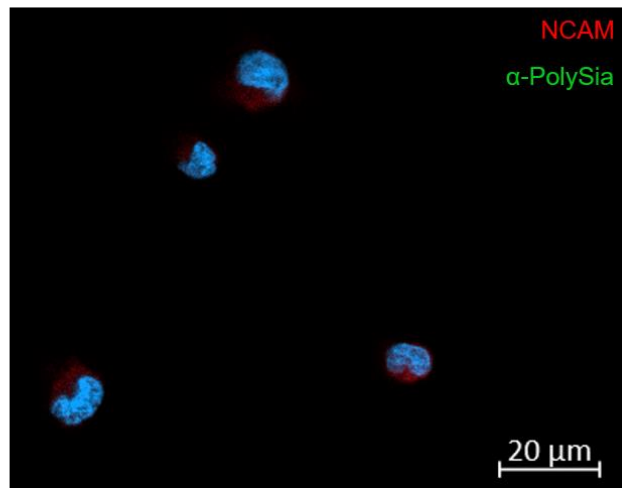


Abbildung 12. Kolokalisation von polysialyliertem NCAM₁ auf HMC₁ Zellen: Während A neben dem Mischbild für die bessere Übersicht jeden Kanal einzeln darstellt, zeigt B eine Zelle vergrößert. Diese wurde unter gleichen Bedingungen gehalten wie die Zellen in A. Abbildung C stellt die Negativkontrolle dar, bei der die Zellen zusätzlich mit EndoN behandelt wurden. In rot ist das Protein NCAM dargestellt und in grün PolySia. Zusätzlich erfolgte eine Kernfärbung mittels DAPI (blau).

Zu sehen ist in A von Abbildung 12 das Mischbild sowie die einzelnen Kanäle der Immunfluoreszenz. Das Vorhandensein von polysialyliertem NCAM auf den Zellen spiegelt sich in zahlreichen Kolo-kalisationen der Signale von PolySia (grün) und NCAM (rot) wider. Es gibt jedoch auch Bereiche, in denen nur eines der Signale und/oder ein Ungleichgewicht der Signalstärken zu sehen ist. Der untere Teil der Abbildung zeigt links der Übersichtlichkeit halber eine vergrößerte Darstellung einer einzelnen Zelle. Rechts dagegen ist das Ergebnis einer Kontrolle des Versuchs mit EndoN gezeigt. Das grüne Signal, welches PolySia darstellt, ist nach dem enzymatischem Verdau nicht mehr nachweisbar.

Da starke PolySia-Signale teils in den Bereichen der Zellen vorhanden sind, wo nahezu kein NCAM-Signal vorkommt (Abbildung 12 B) und der PNGase F Verdau nicht zum kompletten Verlust des PolySia-Signals führt (Abbildung 8), könnten noch weitere PolySia-Träger vorkommen. Um unbekannte polysialylierte Proteine zu identifizieren, wurden zunächst die Trägerproteine durch eine Affinitätspräzipitation aufgereinigt. 10% der isolierten Proben wurden jeweils separiert und per Western Blot dargestellt, um eine erfolgreiche Immunpräzipitation sicherzustellen. Solch ein Blot ist in A von Abbildung 13 exemplarisch dargestellt. Der Hauptteil der isolierten Proben wurde unter möglichst sterilen Bedingungen auf ein separates Gel aufgetragen. Nach dem Lauf wurde die eine Hälfte des Gels mittels Western Blot entwickelt (Abbildung 13 B), um den Kilodalton-Bereich zu detektieren, in dem sich das isolierte Protein befindet. Die andere Hälfte wurde zum Ausschneiden von Gelstücken im PolySia-positivem Bereich verwendet.

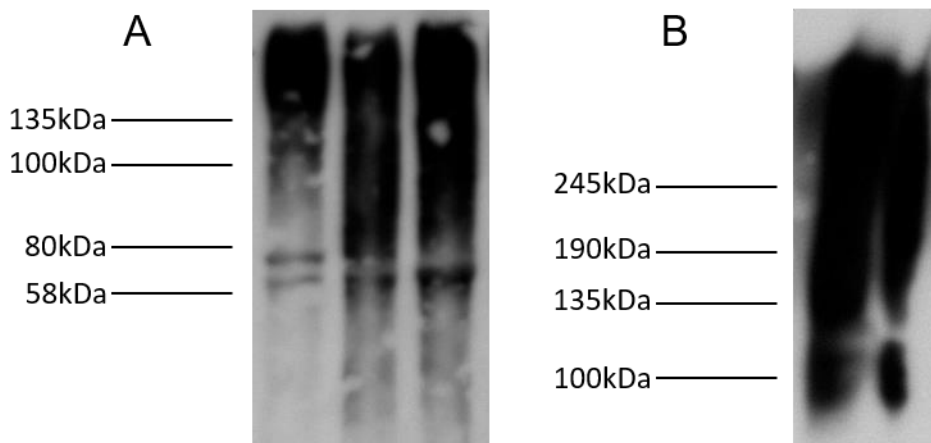


Abbildung 13. Probenvorbereitung für massenspektrometrische Untersuchungen: In A erkennt man die exemplarische Darstellung eines Western Blots von einem Teil der isolierten Proben. 10% dieser Proben wurden jeweils auf solch ein Gel aufgetragen, während der Hauptteil für die massenspektrometrische Untersuchung verwendet wurde. Abbildung B zeigt den Western Blot, welcher als Vorlage diente, um den Kilodalton-Bereich zu finden, in dem sich das isolierte Protein befindet.

Nachdem in weiteren Schritten die Proteine aus dem Gel gelöst und schlussendlich tryptisch verdaut wurden, wurden 50% der verdauten Proben lyophilisiert und für Proteomics Testmessungen an das Applikationslabor der Firma Bruker Daltonik GmbH in Bremen geschickt. Hier erfolgten die Messungen über ein ESI-LC-QTOF (Impact II) Instrument. Zur Proteinidentifizierung wurden die generierten MS und MS/MS Daten zur Datenbanksuche (Mascot) eingesetzt, wobei neben NCAM bisher kein weiteres potentiell Ziel der Polysialyltransferasen identifiziert werden konnte.

4.4) Polysialyliertes NCAM während des Degranulationsprozesses

Auf Grund der Tatsache, dass PolySia und die Mastzelltryptase einen sehr ähnlichen Lokalisationsort innerhalb einer Zelle aufweisen, stellte sich die Frage, ob PolySia ebenfalls eine Rolle im Degranulationsprozess einer Mastzelle spielt. Um diese Frage zu beantworten, wurden die HMC₁ Zellen stimuliert, sodass sie ihre Vesikel als aktiven Prozess ausschleusen. Als Stimulans wurde das Ionophor Ionomycin verwendet, welches Calcium-Ionen in eine Zelle befördert. Dadurch wiederum werden verschiedenste intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die letztendlich zur Degranulation führen.

Als Vorversuch wurde ein Dot Blot verwendet, auf welchen Überstände von HMC₁ Zellen aufgetragen wurden, welche vorher mit verschiedenen Konzentrationen von Ionomycin inkubiert worden waren. Bei allen betrug die Inkubationszeit 1 h bei 37°C mit 5% CO₂. Visualisiert wurde der Dot Blot mit Anti-PolySia und anschließender Chemolumineszenz.

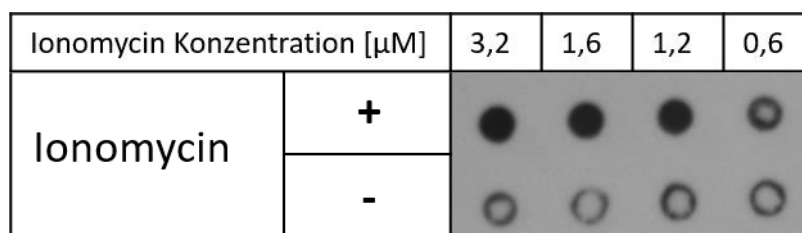


Abbildung 14. Konzentrationsreihe der Stimulation von HMC₁ Zellen mittels Ionomycin: Dargestellt sind die Überstände der stimulierten Zellen. Der Dot Blot wurde mit Anti-PolySia inkubiert. Im Vergleich sind unten die Überstände von unstimulierten Zellen aufgetragen.

Anhand der Konzentrationsreihe sieht man den Einfluss von Ionomycin auf die Zellen. Während man in der Negativ-Kontrolle Artefakte wahrnehmen kann, sieht man in den stimulierten Zellüberständen ein deutliches Signal von PolySia (Abbildung 14). Das Signal wird mit abnehmender Konzentration von Ionomycin schwächer. Um eventuelle Störfaktoren, wie die ungewollte Lyse der Zellen, zu verringern, wurde mit der niedrigsten, noch mit einem sichtbaren Effekt verbundenen, Ionomycin-Konzentration weitergearbeitet, welche somit bei 0,6 μM liegt.

EndoN	-	+	-	+
Ionomycin	+	+	-	-




Abbildung 15. Zellüberstände von stimulierten Zellen mit enzymatischem Verdau: Zellüberstand von stimulierten und nicht stimulierten Zellen. Als Negativkontrolle diente der enzymatische Verdau mit EndoN.

Die Spezifität des Immunsignals gegen PolySia wurde mit EndoN überprüft, was in Abbildung 15 veranschaulicht wird. Aufgrund des Signalverlustes in den verdauten Proben kann darauf geschlossen werden, dass es sich hierbei wirklich um polysialylierte Proteine handelt. Weiterhin ist zu sehen, dass PolySia auf Grund der Stimulation vermehrt im Überstand zu finden ist, verglichen mit der nicht stimulierten Probe. Auf Basis der Dot Blots wurden Western Blots angefertigt, welche das oben beschriebene Phänomen überprüfen sollten. Zusätzlich wurden nicht nur die Überstände betrachtet, sondern auch, ob es einen Unterschied im Gehalt von PolySia zwischen den Zelllysaten gibt. Da die Menge an Proteinen im Überstand gering war, mussten diese Proben mittels Affinitätspräzipitation konzentriert werden. Die Ergebnisse des Western Blots, welcher mit Anti-PolySia entwickelt wurde, sind in Abbildung 16 dargestellt. Zu sehen sind die Überstände der jeweils stimulierten bzw. unstimulierten Zellen (Abbildung 16 A). Wieder wurde ein EndoN-Verdau durchgeführt. Man erkennt, wie schon bei Abbildung 15, eine deutliche Zunahme des Signals von PolySia als Folge der Stimulation. Abbildung 16 B dagegen zeigt die Zelllysate der Zellen. Auf Grund der Stimulation ergibt sich eine leichte Abschwächung des Signals von PolySia. Diese Tatsache deckt sich mit der Theorie, dass es während des Stimulationsprozesses zu einem aktiven Ausschleusen von PolySia in den Mastzellen kommt.

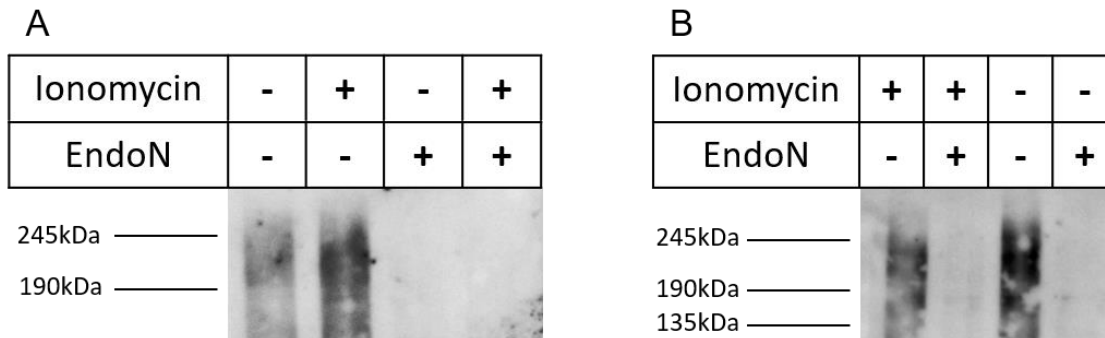
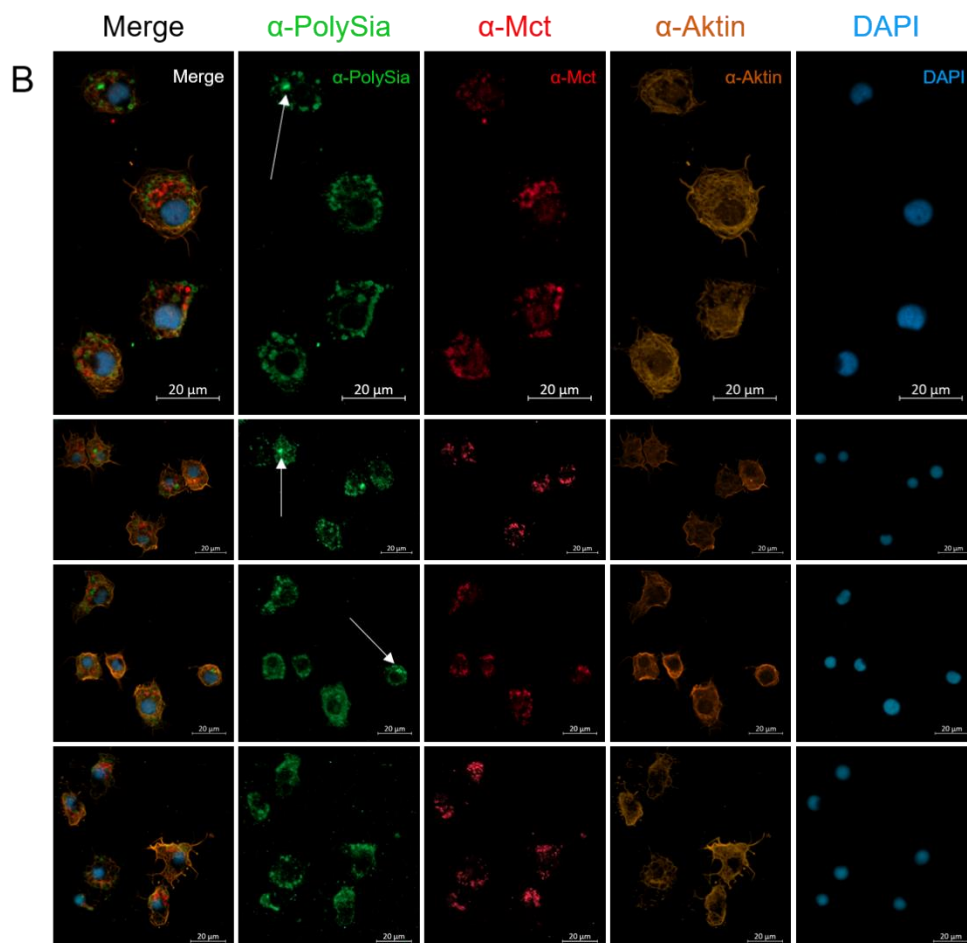
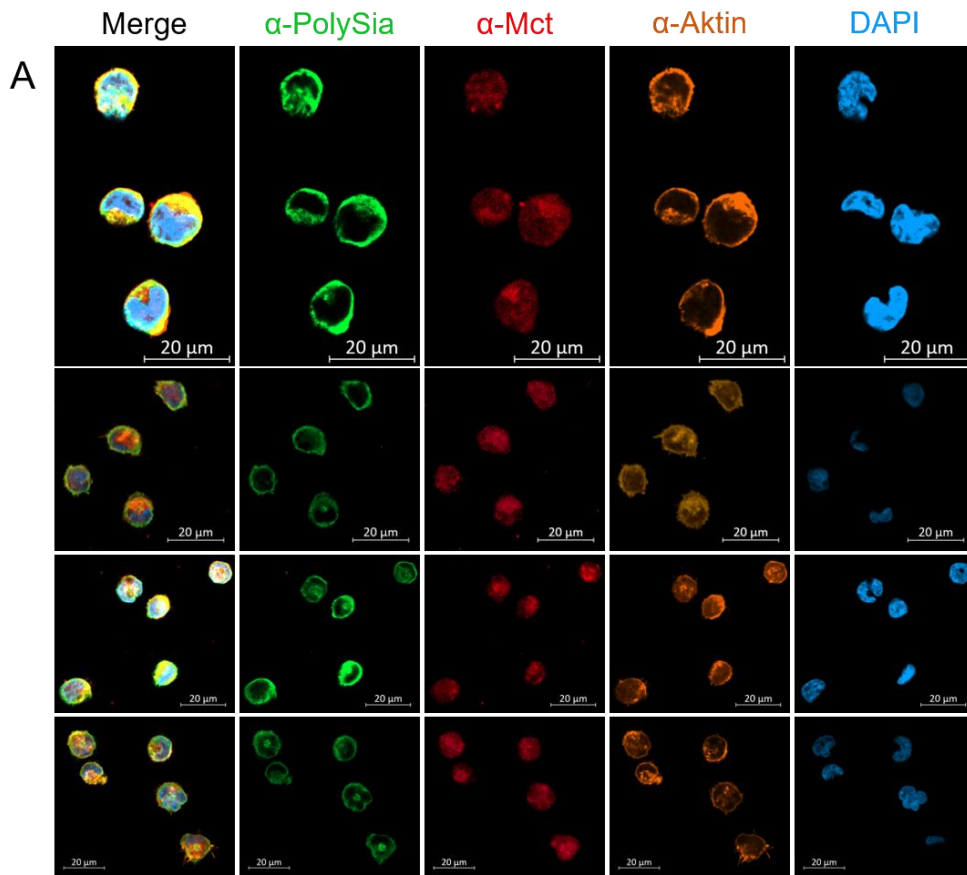


Abbildung 16. Western Blot-Analyse der Überstände und Zelllysate von stimulierten Zellen: Abbildung A zeigt die mittels IP konzentrierten Überstände von stimulierten bzw. nicht stimulierten Zellen. In B dagegen werden die dazugehörigen Zelllysate dargestellt. Die Blots wurden mit Anti-PolySia entwickelt und zur Spezifität diente der Verdau mit EndoN.

4.5) Immunfluoreszenz von stimulierten Zellen

Die oben beschriebenen Versuchsergebnisse führen zu dem Schluss, dass das polysialylierte Protein während des Degranulationsprozesses aus der Zelle hinaus transportiert wird. Diese im Western Blot erhaltenen Ergebnisse sollten weiter verifiziert und visualisiert werden. Dafür wurde die Immunfluoreszenz verwendet. Bei dieser wurde PolySia mit einem FITC-gekoppelten sekundären Antikörper markiert, sodass es in den Aufnahmen grün dargestellt wird. Die Mastzelltryptase stellt sich rot dar (Alexa fluor 633) und eine Kernfärbung fand mittels DAPI statt. Zusätzlich wurde das Zytoskelett visualisiert. Dafür wurde Phalloidin verwendet, welches ein Toxin des Knollenblätterpilzes darstellt. Es weist eine hohe Affinität zu filamentösem Aktin (f-Aktin) auf, sodass Phalloidin spezifisch dagegen bindet. Dieses wurde mit Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) gekoppelt, bei dem es sich um einen orange fluoreszierenden Farbstoff handelt. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 17 dargestellt. Die Mischbilder zeigen der Übersichtlichkeit halber die jeweils einzelnen Kanäle (vgl. A bzw. B). Während Abbildung A die Kontrolle mit den Zellen abbildet, welche keinem Stimulans ausgesetzt waren, zeigt B die stimulierten Zellen. Deutlich erkennbar ist das veränderte Zytoskelett auf Grund der Degranulation (orange). Weiterhin wird deutlich, dass im Zuge der Degranulation das Signal der Mastzelltryptase (rot) schwächer wird. Dies ist für PolySia (grün) im gleichen Ausmaß der Fall. Die Pfeile bei den stimulierten Zellen zeigen dabei auf den noch größten vorhandenen PolySia-Vorrat in der Zelle, welcher sich perinukleär befindet. Die einzelnen Zellen veranschaulichen dasselbe Phänomen, sie sind lediglich vergrößert dargestellt. Die rechte der beiden Zellen in C wurde mittels Ionomycin stimuliert, während sich die linke in ihrer Ursprungsform befindet (Abbildung 17 C).



C

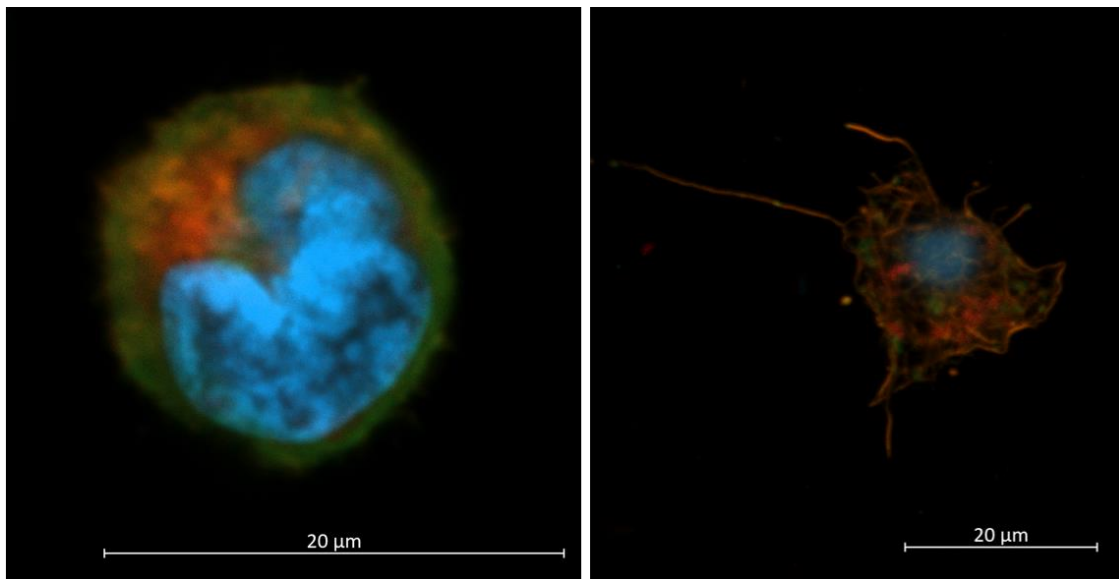
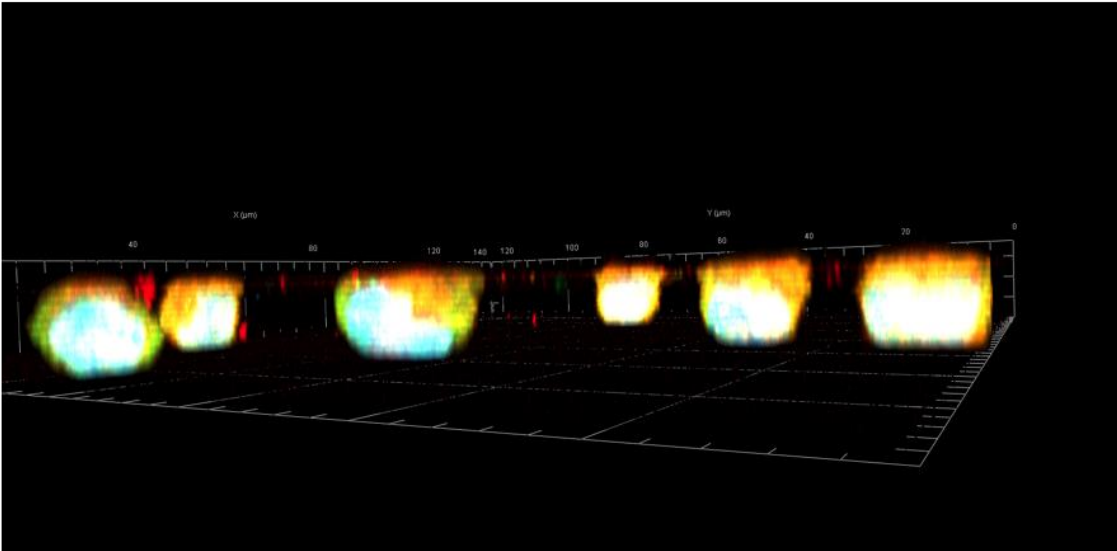


Abbildung 17. Immunfluoreszenz von unstimulierten und stimulierten Zellen: Zuerst sind Mischbilder sowie jeweils die einzelnen Farbkanäle dargestellt. Die obere Abbildung zeigt die nicht stimulierten Zellen (A), während die Zellen im darunter liegenden Bild dem Stimulans ausgesetzt wurden (B). Die Pfeile in Abbildung B zeigen auf den noch größten vorhandenen PolySia-Vorrat in der Zelle. Das Zytoskelett ist orange, PolySia grün, Mastzelltryptase (Mct) rot und Zellkerne blau dargestellt. Die einzelnen Zellen in C veranschaulichen dasselbe Phänomen und sind der Übersichtlichkeit halber lediglich vergrößert. Bei der links gezeigten Zelle in C handelt es sich um die Kontrolle, während die rechte Zelle jene darstellt, die mit Ionomycin stimuliert wurde.

Zusätzlich wurden dreidimensionale Bilder desselben Versuchsaufbaus angefertigt, um die räumliche Struktur der Zelle nach erfolgter Stimulation darzustellen. Bei der Färbung der Zellen handelt es sich um jene aus Abbildung 17.

Man erkennt auf den Bildern, dass sich das Zytoplasma bei den Zellen ohne Stimulans (A aus Abbildung 18) homogen um den Zellkern verteilt und das Zytoskelett eine geschlossene Formation beibehält. Dies verhält sich bei den stimulierten Zellen anders (Abbildung 18 B). Zu sehen ist, dass die Zelle mit Ausnahme des Zellkerns abflacht und das Zytoskelett seine Form und Konstanz verändert. Weiterhin erkennt man eine deutliche Signalabschwächung von PolySia. Während bei den unstimulierten Zellen ein gleichmäßiges grünes Signal (welches PolySia widerspiegelt) erkennbar ist, sieht man bei den stimulierten Zellen lediglich vereinzelte punktuelle Signale des Polysaccharids.

A



B

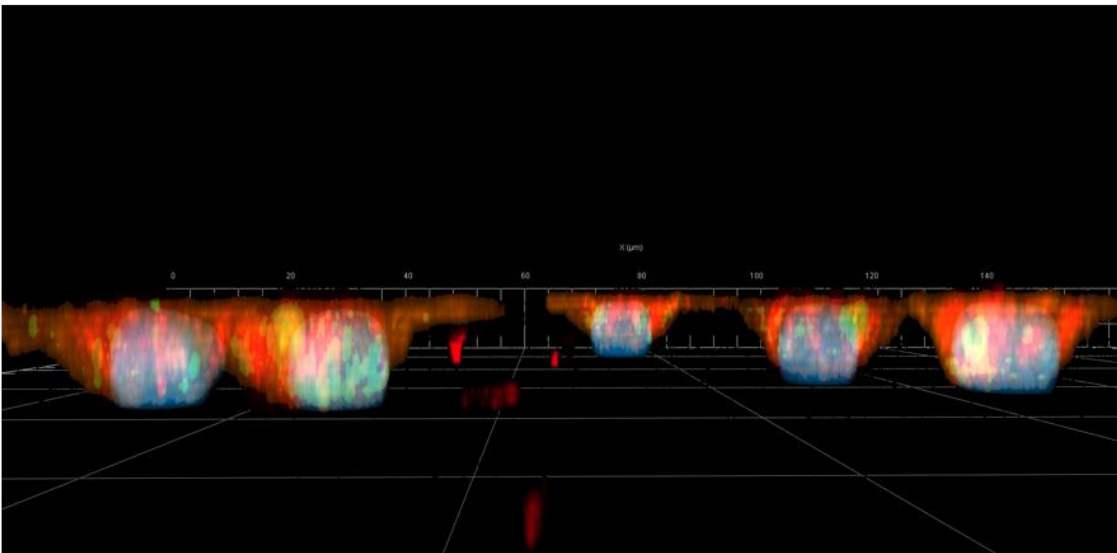


Abbildung 18. Dreidimensionale Darstellung von unstimulierten und stimulierten Zellen: Die obere Abbildung A zeigt Zellen, welche keinem Stimulans ausgesetzt gewesen waren. Die untere Abbildung dagegen zeigt die degranulierten Zellen. Ihre räumliche Struktur verändert sich dadurch massiv, auch ist ein deutlich abgeschwächtes Signal von PolySia zu erkennen.

5) Diskussion

5.1) Identifizierung von polysialyliertem NCAM auf HMC₁ Zellen

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass HMC₁ Zellen polysialyliertes NCAM exprimieren. Zur Identifizierung des Proteins wurden verschiedenste Methoden kombiniert: Zunächst wurde nachgewiesen, dass mRNA von *ncam1* in HMC₁ Zellen vorliegt. Des Weiteren wiesen die tryptischen Peptide der isolierten polysialylierten Proteine auf das Vorhandensein von NCAM hin. Eindeutig bestätigt wurde die Präsenz von polysialyliertem NCAM mittels Western Blot-Analysen sowie durch Immunfluoreszenz-Messungen. Gerade das Signal von NCAM, welches im Western Blot einen für PolySia spezifischen Schmier aufweist und nach dem Verdau mittels EndoN eine homogene Bande zeigt, was in Abbildung 10 B dargestellt wurde, veranschaulicht die Tatsache, dass polysialyliertes NCAM vorliegt. Auf Grund der unterschiedlich langen Zuckerketten hat NCAM im polysialylierten Zustand nicht mehr eine homogene molekulare Größe, sondern wird der Länge der Zuckerketten und folglich der Gesamtgröße des Proteins nach in der Gelelektrophorese aufgetrennt (Ulm et al. 2013). Nach dem enzymatischen Verdau dagegen liegt eine einzelne Bande bei ca. 140 kDa vor, was sich mit der molekularen Größe von NCAM, welche aus der Literatur bekannt ist, deckt (Hildebrandt et al. 2010). Als weiteren Beweis für das Vorliegen von polysialyliertem NCAM diente die Immunpräzipitation, bei der mittels Prot-A-Beads NCAM isoliert wurde. Der mit diesen Proben durchgeführte Western Blot gegen PolySia, welcher in Abbildung 11 aufgeführt wurde, ist eindeutig und beweisend.

Bei NCAM 140 handelt es sich um eine membrangebundene Isoform des Proteins. Die Bedeutung der Polysialylierung wurde bereits im Hinblick auf Zell-Zell-Kontakte ausgiebig erforscht. Doch daneben wurde es weiterhin auf diversen Immunzellen nachgewiesen, wobei die Funktionen des Proteins für die Zellen noch größtenteils nicht ausreichend bekannt sind. Jedoch wurde bei humanen natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) beobachtet, dass polysialyliertes NCAM einen Einfluss auf deren immunologische Funktion hat. So konnte gezeigt werden, dass NCAM die Aktivität und Zytotoxizität einer natürlichen Killerzell-Zelllinie positiv beeinflusst (Gunesch et al. 2020). Dieser Effekt wird potenziert, wenn man ST8SialV-Knockout-Mäuse betrachtet, bei denen kein PolySia gebildet wird und NCAM folglich auch keines trägt. Diese Mäuse zeigten eine erhöhte Kontaktüberempfindlichkeit und eine verringerte Kontrolle über das Tumorstadium (Drake et al. 2008). Somit inhibiert PolySia den stimulierenden Effekt von NCAM auf die natürlichen Killerzellen und verhindert so eine überstarke

Entzündungsreaktion. Ähnliche Eigenschaften könnte PolySia auch bei den humanen Mastzellen innehaben.

Die mRNA Analysen haben weiterhin aufgezeigt, dass höchstwahrscheinlich die Polysialyltransferase ST8SialV für die Polysialylierung verantwortlich ist. Bis jetzt sind nur zwei Polysialyltransferasen beim Menschen bekannt, welche in der Lage sind, PolySia zu synthetisieren (Oltmann-Norden et al. 2008). Das Agarosegel in Abbildung 9 zeigt, dass bei humanen Mastzellen die mRNA von lediglich einer davon, ST8SialV, exprimiert wird. Dies lässt die starke Vermutung zu, dass somit diese allein für die Polysialylierung auf den Zellen verantwortlich ist.

Die Frage nach der Bindungsart der Zuckerkette an sein Protein ist nicht zweifelsfrei geklärt. So lassen die Ergebnisse, welche in Abbildung 8 dargestellt wurden, verschiedene Thesen zu. Ein Einfluss der PNGase F auf die polysialylierten Proteine lässt sich auf jeden Fall ausmachen. Dies zeigen die verschiedenen Replikate desselben Versuchs. Der PolySia-spezifische Schmier ist kürzer und das Signal scheint weniger intensiv. Interessanterweise lassen sich zwei verschiedene molekulare Größen ausmachen, bei denen auch nach dem Verdau mittels PNGase F noch ein stärkeres Signal wahrzunehmen ist. Dies ist bei ca. 190 kDa und bei ca. 100 kDa vorzufinden. Auf Grund der Replikate und der dargestellten Kontrollen muss davon ausgegangen werden, dass der enzymatische Verdau weitestgehend vollständig verlief und es sich nicht um ein Zufallsprodukt handelt. Sofern alle PolySia-Ketten an N-Glykanen gebunden vorliegen würden, hätte man einen vollständigen Signalverlust erwartet, wie es bei den THP₁ Zellen zu sehen ist (Abbildung 8 B). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass nur ein Teil der PolySia-Ketten N-glykosidisch gebunden vorliegt. Sofern man NCAM betrachtet, ist dies nachvollziehbar, da bei diesem Protein bereits polysialylierte N-Glykane identifiziert wurden (Hildebrandt et al. 2010). Die einfachste Erklärung ist, dass das noch vorhandene Signal O-Glykane darstellt, auf die das Enzym PNGase F keinen Einfluss hat. So ist bekannt, dass NCAM zwei potenzielle O-Glykosylierungsstellen in den beiden Fibronectin III-ähnlichen Domänen besitzt (Ong et al. 2002). Bisher wurden aber in zahlreichen Studien lediglich polysialylierte N-Glykane an NCAM nachgewiesen (Galuska et al. 2017). Eine weitere Erklärung wäre, dass auf Grund der komplexen räumlichen Struktur von polysialyliertem NCAM das Enzym nicht richtig binden konnte, sodass der Verdau unvollständig verlief. Doch da es sich bei den THP₁ Zellen ebenfalls um polysialyliertes NCAM handelt, ist letztere Möglichkeit unwahrscheinlich. Analysiert man weiterhin die beiden Signalmaxima, so kommt man zu einem interessanten Schluss: Das obere Signal, welches folglich ein größeres Protein darstellt, kann man sehr gut mit dem Vorhandensein von polysialyliertem NCAM erklären. So ist das Protein

in seiner membrangebundenen Form mindestens 140 kDa groß und durch das Hinzufügen der PolySia-Ketten entsteht ein größeres Protein. Das untere Signal dagegen scheint selbst primär ohne jegliche Glykosylierung zu klein, um es NCAM zuordnen zu können. Dies führt zwangsläufig zu der These, dass HMC₁ Zellen mehr als ein polysialyliertes Protein aufweisen. Die massenspektrometrische Untersuchung liefert Fragmente, aus denen mittels eines Vergleichs mit einer Datenbank mögliche Proteine identifiziert werden. Diese Analyse gibt somit lediglich eine Wahrscheinlichkeit an und beinhaltet immer die Möglichkeit, dass bei zwei verschiedenen Proteinen eines übersehen wird. Falls eines der beiden Proteine in deutlich größeren Mengen, verglichen mit dem zweiten Protein, vorliegt, wird dieser Umstand noch verstärkt. Ein Beispiel für diese Tatsache ist, dass, obwohl polysialyliertes NCAM schon 1980 (Jorgensen und Bock 1974) entdeckt wurde, es knapp 30 Jahre dauerte (Curreli et al. 2007), bis weitere polysialylierte Proteine wie Neuopilin 2 ausfindig gemacht wurden. Dies beruht nicht zuletzt darauf, dass NCAM in einem so viel größeren Verhältnis vorliegt, dass es andere polysialylierte Proteine „maskiert“ und deren Detektion somit erschwert. Ein weiteres Indiz für das Vorhandensein von mehr als einem polysialyliertem Protein liefert der Vergleich der PolySia-Banden in den verschiedenen Ergebnissen der Western Blot-Analysen. Während sich das Signal von isoliertem polysialyliertem NCAM (Abbildung 11) im hochmolekularem Bereich (ca. 180 – 250 kDa) befindet und der für polysialylierte Proteine typische Schmier eher kurz ist, ist die PolySia-Bande des gesamten Zelllysats (Abbildung 6) deutlich länger. Diese deckt einen Kilodalton-Bereich von unter 58 kDa bis über 190 kDa ab. Somit könnte es sich bei dem Signal, welches sich eher im kleineren Kilodalton-Bereich befindet, um ein weiteres polysialyliertes Protein handeln. Doch Inwieweit nun die PolySia-Ketten O-glykosidisch an NCAM gebunden vorliegen, oder ob es sich um ein weiteres polysialyliertes Protein handelt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

5.2) Einfluss von PolySia auf den Degranulationsprozess

Wie dargestellt werden konnte, hat die Stimulation der Mastzelllinie einen Einfluss auf PolySia in der Zelle. Das vermehrt vorhandene PolySia im Überstand, visualisiert durch die verstärkte Bande im Western Blot in Abbildung 16 A, deutet auf ein aktives Ausschleusen des Polymers während der Degranulation hin. Analog dazu konnte eine Signalabschwächung des Zelllysats festgestellt werden (Abbildung 16 B). Dieser zwar vorhandene, aber doch in seiner Ausprägung eher schwache Unterschied könnte auf Grund der relativ „milden“ Stimulation entstehen. Verglichen mit Protokollen ähnlicher

Versuche aus der Literatur, handelt es sich bei 0,6 μM Ionomycin für 1 h sowohl von der Zeit als auch von der Konzentration her um einen eher geringen Wert, da meist mehr als 1 μM eingesetzt wurde (Gross und Theoharides 2019; Matsui et al. 2018). Man erkennt auch anhand der Konzentrationsreihe in Abbildung 14, dass eine höhere Konzentration einen vermeintlich stärkeren Einfluss auf PolySia ausübt. Trotzdem wurde die Konzentration mit 0,6 μM gewählt, da ein Effekt, die Sekretion von PolySia, auszumachen war und gleichzeitig, durch eine möglichst niedrig gewählte Konzentration bedingt, Störvariablen, wie zum Beispiel die Lyse der Zelle, minimiert wurden. Die Tatsache, dass sich im Überstand der unstimulierten Zellen ebenfalls ein Signal von PolySia ausmachen lässt (vgl. Abbildung 15 und 16), könnte sich dadurch erklären, dass die Zellen, bevor sie in ein Hungermedium gegeben werden, sich auf Grund des Nährmediums und des zugegebenen Serums teilweise in einem aktivierten Zustand befinden. In Serum befinden sich nicht zuletzt verschiedenste Interleukine, welche einen aktivierenden Einfluss auf die Zellen ausüben. Auch wenn durch mehrmaliges Waschen das Serum bestmöglich entfernt wird, und somit dieser Stimulus entfernt wird, reagieren Zellen zum Teil träge auf das sich ändernde Milieu. Demzufolge könnten ebenfalls einige Zellen, welche nicht dem Ionophor Ionomycin ausgesetzt waren, im aktiven Zustand sein und PolySia ausschütten; wenn auch in einem kleineren Ausmaß was sich in dem schwächeren Signal in Abbildung 15 und 16 widerspiegelt.

Auch kann man den mittels Western Blot beschriebenen Effekt bei der Immunfluoreszenz nachvollziehen. Anhand von Abbildung 17 und 18 ist die komplette Desintegration der Zellmembran nach der Stimulation mittels Ionomycin und die Konformationsänderung des Zytoskeletts deutlich erkennbar. Die typische Zellformation ist aufgehoben und im Rahmen der Degranulation ist ein deutlicher Signalverlust sowohl der Mastzelltryptase (rot) als auch des PolySia (grün) zu erkennen. Bei dem perinuklearen Restsignal von PolySia, welches mit den weißen Pfeilen in Abbildung 17 markiert ist, könnte es sich um den Golgi-Apparat handeln. Da PolySia in diesem synthetisiert wird, könnte es sich um eine Nachproduktion handeln, um das ausgeschüttete PolySia zu ersetzen. Doch die wohl interessanteste Frage stellt sich in Bezug auf den Nutzen der ausgestoßenen Zuckerkette. Eine mögliche Antwort darauf bietet vielleicht der Vergleich mit dem Proteoglycan Heparin. Bei Heparin handelt es sich um ein körpereigenes Glykosaminoglykan, welches ähnliche chemische Eigenschaften wie PolySia hat. Heparin besteht, genauso wie PolySia, aus einer unverzweigten Kette, welche sich aus einzelnen Saccharideinheiten zusammensetzt. Diese sind stark sulfatiert und hydroxyliert und weisen damit ebenfalls auf Grund der langen Ketten einen stark polyanionischen Charakter unter physiologischem pH-Wert auf. Somit besitzen

Heparin und PolySia einige biochemische Gemeinsamkeiten, was die These zulässt, dass man daraus auch auf gemeinsame Funktionen Rückschlüsse ziehen kann. Heparin befindet sich, wie einige andere Glykosaminoglykane auch, in den Granula von Mastzellen (Mulloy et al. 2017). In diesen ist es unter anderem für die Lagerung der darin befindlichen Proteasen und Entzündungsmediatoren verantwortlich. So konnte gezeigt werden, dass Heparin den Entzündungsmediator Histamin bindet. Dies geschieht über elektrostatische Wechselwirkung des stark anionischen Heparins und des protonierten Imidazolrings von Heparin. Dieser Vorgang wird unter dem sauren pH-Wert, welcher innerhalb der Granula vorliegt, verstärkt (Chuang et al. 2000). Doch der Einfluss des Heparins geht über die Lagerung hinaus. Dies wurde deutlich bei Mausmodellen, bei denen Enzyme, welche für die korrekte Synthese des Heparins verantwortlich sind, ausgeschaltet wurden. Die Granula der Mastzellen dieser Mäuse enthielten eine bedeutend geringere Menge an Histamin sowie spezifischen Proteasen wie der Carboxypeptidase A. Somit wurde geschlossen, dass das Proteoglykan Heparin neben der Lagerung auch für die korrekte Synthese der Entzündungsmediatoren und des Inhalts der Granula überhaupt verantwortlich ist (Humphries et al. 1999; Forsberg et al. 1999). Weiterhin ist Heparin auch für die Degranulation und die Stabilität der Entzündungsmediatoren im Extrazellularraum verantwortlich. Die Mastzell-Tryptase, welche mengenmäßig einen Hauptbestandteil der Proteasen in den Granula von Mastzellen darstellt, bildet in ihrer aktiven Form ein Tetramer. Dieses ist unter physiologischem pH und bei 37°C höchst instabil und zerfällt innerhalb weniger Minuten (Schechter et al. 1993). Deshalb liegt es in einem Verhältnis von 1:1 mit stark negativen Proteoglykanen, wie es Heparin ist, ausgeschüttet vor. Heparin stabilisiert die tetramere Form und ist somit entscheidend für die Aktivität der Tryptase (Schwartz und Bradford 1986). Doch während der Degranulation werden deutlich mehr Proteoglykane ausgeschüttet als lediglich diese, welche einen Komplex mit den Enzymen darstellen. Diese „freie“ Form, die ca. 80% bildet, hat ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität der Tryptase. Es wird vermutet, dass die langen negativen Ketten ein dreidimensionales Konstrukt bilden und damit zum einen die gebundenen Komplexe stabilisieren, sodass die Tryptase langsamer von ihrem Proteoglykan dissoziiert, und zum anderen durch ihre räumliche Größe und ihre starken elektrostatischen Anziehungskräfte die Entzündungsmediatoren in der nahen Umgebung „festhalten“ und so deren lokale Konzentration erhöhen. Damit wird gewährleistet, dass es zu einer begrenzten Entzündungsreaktion kommt und nicht zu einer systemischen (Lindstedt et al. 1998).

All diese beschriebenen Eigenschaften könnte das ausgeschüttete PolySia auf Grund seiner zu Heparin ähnlichen biochemischen Eigenschaften innehaben. Es ist genauso wie Heparin stark negativ geladen, besitzt auf Grund der langen Ketten große dreidimensionale Produkte, und es konnte in anderen Bereichen des Körpers gezeigt werden, dass es auf Grund seiner Struktur lokale Konzentrationen von Stoffen erhöht. Als weiteres Beispiel für die Ähnlichkeit dieser beiden Polysaccharide konnte für beide separat gezeigt werden, dass sie die Zytotoxizität von extrazellulären Histonen, welche durch die NETose oder im Rahmen einer Sepsis vermehrt anfallen, inhibieren (Wildhagen et al. 2014; Zlatina et al. 2018).

Eine andere These über die Funktion des ausgeschütteten PolySia beinhaltet die Regulation der gesamten Mastzell-Degranulation. Wie eingangs beschrieben, besitzen humane Mastzellen diverse Rezeptoren, welche die Degranulation modulieren und erst eine Überzahl an aktivierenden Einflüssen führt zu einem Ausschütten der Granula. Dagegen gibt es auch Rezeptoren, welche die Degranulation inhibieren. Ein solcher ist Siglec 8. Dieser Rezeptor, welcher allerdings eine schwache Affinität zu PolySia aufweist (Crocker et al. 2007), inhibiert die IgE-vermittelte Degranulation bei Mastzellen (Yokoi et al. 2008). Das Ausschütten von PolySia könnte somit, ähnlich wie schon bei Mikroglia herausgefunden (Werneburg et al. 2016; Werneburg et al. 2015), einen negativen Feedback-Mechanismus der Zelle selbst darstellen, da Mastzellen mit Siglec 7 und 8 zwei inhibitorische Siglecs exprimieren, die α 2,8-verknüpfte Sialinsäuren binden (Crocker et al. 2007; Park und Bochner 2011). Diese Autoinhibition könnte dafür verantwortlich sein, dass einer überstarken Aktivierung und damit verbundenen Entzündungsreaktion entgegengewirkt wird. Fehler in diesem Mechanismus könnten zu einer verstärkten Aktivität der Mastzellen führen und letztendlich in allergischen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Atopie, enden.

Ob das polysialylierte Protein nun einen entscheidenden Punkt im Degranulationsprozess darstellt, indem es die Entzündungsmediatoren in ihrer aktiven Form stabilisiert oder durch einen negativen Feedback-Mechanismus diesen reguliert, oder ob es sich lediglich um ein eher nebensächliches Phänomen im Degranulationsprozess handelt, müssen weitere Untersuchungen in diesem Bereich zeigen. Doch sofern man dem Vergleich mit anderen Immunzellen folgt, könnte dem ausgeschütteten PolySia eine bedeutende Rolle zukommen.

6) Zusammenfassung

Bei der Polysialinsäure (PolySia) handelt es sich um ein langkettiges unverzweigtes Homopolymer, welches aus α 2,8-verknüpften Sialinsäureresten besteht. Auf Grund des polyanionischen Charakters der Zuckerkette ist PolySia an verschiedensten Prozessen innerhalb einer Zelle und eines Organismus beteiligt. Die wohl bekannteste und am besten untersuchte Aufgabe beruht auf der Inhibition von Zell-Zell-Kontakten über elektrostatische Wechselwirkungen. Dabei ist vor allem das Adhäsionsprotein NCAM zu nennen, welches den Hauptträger von PolySia im menschlichen Organismus darstellt. Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, welche fundamentale Bedeutung die Inhibition von NCAM bei der Entwicklung des Gehirns innehat. Doch zeigten weitere Studien, dass PolySia in vielfältiger Weise auch das Immunsystem moduliert. Um auf die Bedeutung von PolySia für eine Zelle zu schließen, ist es von großer Bedeutung zu wissen, an welches Protein die Zuckerkette gebunden vorliegt. In diesem Zusammenhang wurde deshalb das PolySia-tragende Protein auf humanen Mastzellen in dieser Arbeit identifiziert und dabei der Einfluss der Zuckerkette auf diese Zellen untersucht. Dafür nutzte man eine humane Mastzelllinie (HMC₁), welche in ihrer Morphologie und in ihrem Verhalten als solches den ursprünglichen Mastzellen stark ähnelt.

Primär konnte mit Hilfe einer Kombination von verschiedenen biochemischen Methoden, wie z.B. mittels der Kombination aus Immunpräzipitation und Western Blot gezeigt werden, dass es sich bei dem polysialylierten Protein auf HMC₁ Zellen um NCAM handelt. Darüber hinaus werden aber noch weitere Proteine polysialyliert sein, da das PolySia-NCAM-Signal in einem Bereich von 250 – 135 kDa liegt, aber auch unterhalb von 135 kDa noch PolySia detektierbar ist. Interessanterweise zeigt innerhalb der Zelle PolySia ein ähnliches Verteilungsmuster wie die Mastzelltryptase, was mittels Immunfluoreszenz gezeigt wurde. Aus diesem Grund wurde die Lokalisation von PolySia im mit Ionomycin induzierten Degranulationsprozess untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass PolySia nach der Stimulation ausgeschleust wird. Welchen Zweck die Sekretion von PolySia dient, ist bisher noch unbekannt. Denkbar wäre aber die lokale Begrenzung der durch die Degranulation hervorgerufenen Entzündungsreaktion. Dieser Effekt wurde schon für das lineare Polysaccharid Heparin gezeigt, welches ebenfalls in den Granula der Mastzellen vorliegt und einen sehr ähnlichen biochemischen Charakter wie PolySia aufweist.

7) Abstract

Polysialic acid (polySia) is a long unbranched homopolymer consisting of α 2,8-linked sialic acid residues. Due to the polyanionic character of the sugar chain, polySia is involved in various processes within a cell and an organism. Probably the best known and best studied task is based on the inhibition of cell-to-cell contacts via electrostatic interactions. The adhesion protein NCAM, which is the main carrier of polySia in the human organism, should be mentioned in particular. In the past, it has been shown that the inhibition of NCAM is of fundamental importance in the development of the brain. However, further studies have shown that polySia also modulates the immune system in many ways. In order to draw conclusions about the importance of polySia for a cell, it is essential to know to which protein the sugar chain is bound. In this context, the polySia-bearing protein on human mast cells was therefore identified in this work and the influence of the sugar chain on these cells was investigated. A human mast cell line (HMC₁) was used, which in its morphology and behaviour is very similar to the original mast cells.

Primarily, a combination of different biochemical methods, such as immunoprecipitation and Western blot, was used to show that the polysialylated protein on HMC₁ cells is NCAM. In addition, other proteins will also be polysialylated, since the polySia-NCAM signal is in the range of 250 - 135 kDa, while polySia can also be detected below 135 kDa. Interestingly, polySia shows a similar distribution pattern within the cell as the mast cell tryptase, which was shown through immunofluorescence. Therefore, the localization of polySia in the ionomycin-induced degranulation process was investigated. It was found that polySia is released after stimulation, yet the purpose of the secretion of polySia is still unknown. One possibility would be the local limitation of the inflammatory reaction caused by the degranulation. This effect has already been shown for the linear polysaccharide heparin, which is also present in the granules of the mast cells and has a very similar biochemical character as PolySia.

8) Abkürzungsverzeichnis

DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	Glycolylneuraminsäure
PolySia	Polysialinsäure
mAK 735	Anti PolySia
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
ST8SialI	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2
ST8SialIV	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
CCR7	Cystein-Cystein-Chemokin-Rezeptor 7
CCL 19 bzw. 21	Chemokine Cystein-Cystein-Ligand 19 bzw. 21
LPS	Lipopolysaccharid
NET	neutrophil extracellular trap
Siglec 8	Sialinsäure-bindende Immunglobulin-ähnliche Lectin 8
mAK	monoklonaler Antikörper
EndoN	Endoneuraminidase N
PNGase F	Peptid-N-Glykosidase F
WB	Western Blot
IF	Immunfluoreszenz
DB	Dot Blot
HRP	horseradish-peroxidase
HMC ₁	Human mastcell ₁
DMSO	Dimethylsulfoxid
PBS	Phosphat buffered saline
BSA	Bovine serum albumine
NaCl	Natriumchlorid
DTT	Dithiothreitol
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tween	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
APS	Ammoniumpersulfat

TFA	Trifluoressigsäure
PVDF	Polyvinylidenflourid
TEMED	N,N,N`N` - Tetramethylethylendiamin
MS	Massenspektrometrie
dH ₂ O	einfach destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser

9) Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Die beim Menschen, wie bei allen Säugetieren, am häufigsten vorkommenden Sialinsäuren:	3
Abbildung 2. Aufbau von Polysialinsäure (PolySia):	4
Abbildung 3. Vereinfachte Darstellung zweier Funktionen von polysialylierten Proteinen:.....	5
Abbildung 4. Polysialylierung von NCAM:.....	8
Abbildung 5. Schematische Darstellung von (polysialyliertem) NCAM:.....	9
Abbildung 6. Visualisierung von polysialylierten Proteinen auf HMC ₁ und THP ₁ Zellen mittels Western Blot:.....	42
Abbildung 7. Immunfluoreszenz von HMC ₁ Zellen:.....	44
Abbildung 8. Enzymatischer Verdau von Zelllysaten mit anschließendem Western Blot:.....	46
Abbildung 9. 2%iges Agarosegel der RNA-Analyse mit anschließender qPCR:.....	48
Abbildung 10. Nachweis von polysialyliertem NCAM auf humanen Mastzellen:	50
Abbildung 11. Isoliertes NCAM ₁ mit anschließender Western Blot-Analyse:.....	51
Abbildung 12. Kolokalisation von polysialyliertem NCAM ₁ auf HMC ₁ Zellen:	52
Abbildung 13. Probenvorbereitung für massenspektrometrische Untersuchungen:	53
Abbildung 14. Konzentrationsreihe der Stimulation von HMC ₁ Zellen mittels Ionomycin:.....	54
Abbildung 15. Zellüberstände von stimulierten Zellen mit enzymatischem Verdau:	55
Abbildung 16. Western Blot-Analyse der Überstände und Zelllysate von stimulierten Zellen:	56
Abbildung 17. Immunfluoreszenz von unstimulierten und stimulierten Zellen:	58
Abbildung 18. Dreidimensionale Darstellung von unstimulierten und stimulierten Zellen:	59

10) Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Gensequenzen der für diese Dissertation benutzen Primer	40
--	----

11) Literaturverzeichnis

- Albach, C.; Damoc, E.; Denzinger, T.; Schachner, M.; Przybylski, M.; Schmitz, B. (2004): Identification of N-glycosylation sites of the murine neural cell adhesion molecule NCAM by MALDI-TOF and MALDI-FTICR mass spectrometry. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 378 (4), S. 1129–1135. DOI: 10.1007/s00216-003-2383-2.
- Alghamdi, A. S.; Foster, D. N. (2005): Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. In: *Biology of reproduction* 73 (6), S. 1174–1181. DOI: 10.1095/biolreprod.105.045666.
- Al-Saraireh, Y. M. J.; Sutherland, M.; Springett, B. R.; Freiburger, F.; Ribeiro Morais, Goreti; L., Paul M. et al. (2013): Pharmacological inhibition of polysialyltransferase ST8Siall modulates tumour cell migration. In: *PLoS one* 8 (8), e73366. DOI: 10.1371/journal.pone.0073366.
- Bhide, G. P.; Fernandes, N. R. J.; Colley, K. J. (2016): Sequence Requirements for Neuropilin-2 Recognition by ST8SialV and Polysialylation of Its O-Glycans. In: *The Journal of biological chemistry* 291 (18), S. 9444–9457. DOI: 10.1074/jbc.M116.714329.
- Bonfanti, L. (2006): PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. In: *Progress in neurobiology* 80 (3), S. 129–164. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2006.08.003.
- Bornhöfft, K. F.; Goldammer, T.; Rebl, A.; Galuska, S. P. (2018): Siglecs: A journey through the evolution of sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins. In: *Developmental and comparative immunology* 86, S. 219–231. DOI: 10.1016/j.dci.2018.05.008.
- Brinkmann, V.; Reichard, U.; Goosmann, C.; Fauler, B.; Uhlemann, Y.; Weiss, D. 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.
- Bullen, J. J.; Rogers, H. J.; Leigh, L. (1972): Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants. In: *British medical journal* 1 (5792), S. 69–75. DOI: 10.1136/bmj.1.5792.69.
- Caudrillier, A.; Kessenbrock, K.; Gilliss, B. M.; Nguyen, J. X.; Marques, M. B.; Monestier, Marc et al. (2012): Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (7), S. 2661–2671. DOI: 10.1172/JCI61303.

- Chuang, W. L.; Christ, M. D.; Peng, J.; Rabenstein, D. L. (2000): An NMR and molecular modeling study of the site-specific binding of histamine by heparin, chemically modified heparin, and heparin-derived oligosaccharides. In: *Biochemistry* 39 (13), S. 3542–3555. DOI: 10.1021/bi9926025.
- Close, B. E.; Colley, K. J. (1998): In vivo autopolysialylation and localization of the polysialyltransferases PST and STX. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (51), S. 34586–34593. DOI: 10.1074/jbc.273.51.34586.
- Colbourne, J. K.; Pfrender, M. E.; Gilbert, D.; Thomas, W. K.; Tucker, A.; Oakley, T. H. et al. (2011): The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. In: *Science (New York, N.Y.)* 331 (6017), S. 555–561. DOI: 10.1126/science.1197761.
- Cremer, H.; Lange, R.; Christoph, A.; Plomann, M.; Vopper, G.; Roes, J. et al. (1994): Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. In: *Nature* 367 (6462), S. 455–459. DOI: 10.1038/367455a0.
- Cress, B. F.; Englaender, J. A.; He, W.; Kasper, D.; Linhardt, R. J.; Koffas, M. A. G. (2014): Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. In: *FEMS microbiology reviews* 38 (4), S. 660–697. DOI: 10.1111/1574-6976.12056.
- Crocker, P. R.; Paulson, J. C.; Varki, A. (2007): Siglecs and their roles in the immune system. In: *Nature reviews. Immunology* 7 (4), S. 255–266. DOI: 10.1038/nri2056.
- Curreli, S.; Arany, Z.; Gerardy-Schahn, R.; Mann, D.; Stamatou, N. M. (2007): Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (42), S. 30346–30356. DOI: 10.1074/jbc.M702965200.
- Draber, P.; Halova, I.; Polakovicova, I.; Kawakami, T. (2016): Signal transduction and chemotaxis in mast cells. In: *European journal of pharmacology* 778, S. 11–23. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.02.057.
- Drake, P. M.; Nathan, J. K.; Stock, C. M.; Chang, P. V.; Muench, M. O.; Nakata, D. et al. (2008): Polysialic acid, a glycan with highly restricted expression, is found on human and murine leukocytes and modulates immune responses. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181 (10), S. 6850–6858. DOI: 10.4049/jimmunol.181.10.6850.
- Elkashaf, S. M.; Allison, S. J.; Sadiq, M.; Basheer, H. A.; Ribeiro Morais, G.; Loadman, P. M. et al. (2016): Polysialic acid sustains cancer cell survival and migratory capacity in a hypoxic environment. In: *Scientific reports* 6, 33026. DOI: 10.1038/srep33026.
- Ermert, D.; Urban, C. F.; Laube, B.; Goosmann, C.; Zychlinsky, A.; Brinkmann, V. (2009): Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. In: *Journal of innate immunity* 1 (3), S. 181–193. DOI: 10.1159/000205281.

- Falconer, R. A.; Errington, R. J.; Shnyder, S. D.; Smith, P. J.; Patterson, L. H. (2012): Polysialyltransferase: a new target in metastatic cancer. In: *Current cancer drug targets* 12 (8), S. 925–939. DOI: 10.2174/156800912803251225.
- Forsberg, E.; Pejler, G.; Ringvall, M.; Lunderius, C.; Tomasini-Johansson, B.; Kusche-Gullberg, M. et al. (1999): Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. In: *Nature* 400 (6746), S. 773–776. DOI: 10.1038/23488.
- Förster, R.; Davalos-Misslitz, A.; Rot, A. (2008): CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. In: *Nature reviews. Immunology* 8 (5), S. 362–371. DOI: 10.1038/nri2297.
- Fuchs, T. A.; Brill, A.; Wagner, D. 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.
- Furuno, T.; Ito, A.; Koma, Y.; Watabe, K.; Yokozaki, H.; Bienenstock, J. et al. (2005): The spermatogenic Ig superfamily/synaptic cell adhesion molecule mast-cell adhesion molecule promotes interaction with nerves. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (11), S. 6934–6942. DOI: 10.4049/jimmunol.174.11.6934.
- Galuska, C. E.; Lütteke, T.; Galuska, S. P. (2017): Is Polysialylated NCAM Not Only a Regulator during Brain Development But also during the Formation of Other Organs? In: *Biology* 6 (2), 27. DOI: 10.3390/biology6020027.
- Galuska, S. P.; Geyer, R.; Gerardy-Schahn, R.; Mühlenhoff, M.; Geyer, H. (2008): Enzyme-dependent variations in the polysialylation of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in vivo. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (1), S. 17–28. DOI: 10.1074/jbc.M707024200.
- Galuska, S. P.; Oltmann-Norden, I.; Geyer, H.; Weinhold, B.; Kuchelmeister, K.; Hildebrandt, H. et al. (2006): Polysialic acid profiles of mice expressing variant allelic combinations of the polysialyltransferases ST8Siall and ST8SialV. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (42), S. 31605–31615. DOI: 10.1074/jbc.M606516200.
- Gangwar, R. S.; Friedman, S.; Seaf, M.; Levi-Schaffer, F. (2016): Mast cells and eosinophils in allergy: Close friends or just neighbors. In: *European journal of pharmacology* 778, S. 77–83. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.10.036.
- Gross, A. R.; Theoharides, T. C. (2019): Chondroitin sulfate inhibits secretion of TNF and CXCL8 from human mast cells stimulated by IL-33. In: *BioFactors (Oxford, England)* 45 (1), S. 49–61. DOI: 10.1002/biof.1464.
- Gunesch, J. T.; Dixon, A. L.; Ebrahim, T.; Berrien-Elliott, M. M.; Tatineni, S.; Kumar, T. et al. (2020): CD56 regulates human NK cell cytotoxicity through Pyk2. In: *eLife* 9, e57346. DOI: 10.7554/eLife.57346.

- Gurish, M. F.; Boyce, J. A. (2006): Mast cells: ontogeny, homing, and recruitment of a unique innate effector cell. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 117 (6), S. 1285–1291. DOI: 10.1016/j.jaci.2006.04.017.
- Hakkim, A.; Fürnrohr, B. G.; Amann, K.; Laube, B.; Abed, U. A.; Brinkmann, V. et al. (2010): Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (21), S. 9813–9818. DOI: 10.1073/pnas.0909927107.
- Hane, M.; Kitajima, K.; Sato, C. (2016): Effects of intronic single nucleotide polymorphisms (iSNPs) of a polysialyltransferase, ST8SIA2 gene found in psychiatric disorders on its gene products. In: *Biochemical and biophysical research communications* 478 (3), S. 1123–1129. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.08.079.
- Harduin-Lepers, A.; Vallejo-Ruiz, V.; Krzewinski-Recchi, M.; Samyn-Petit, B.; Julien, S.; Delannoy, P. (2001): The human sialyltransferase family. In: *Biochimie* 83 (8), S. 727–737. DOI: 10.1016/S0300-9084(01)01301-3.
- Harvima, I. T.; Levi-Schaffer, F.; Draber, P.; Friedman, S.; Polakovicova, I.; Gibbs, B. F. et al. (2014): Molecular targets on mast cells and basophils for novel therapies. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 134 (3), S. 530–544. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.03.007.
- Hildebrandt, H.; Mühlenhoff, M.; Gerardy-Schahn, R. (2010): Polysialylation of NCAM. In: *Advances in experimental medicine and biology* 663, S. 95–109. DOI: 10.1007/978-1-4419-1170-4_6.
- Huang, H.; Evankovich, J.; Yan, W.; Nace, G.; Zhang, L.; Ross, M. et al. (2011): Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll-like receptor 9 in mice. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 54 (3), S. 999–1008. DOI: 10.1002/hep.24501.
- Humphries, D. E.; Wong, G. W.; Friend, D. S.; Gurish, M. F.; Qiu, W. T.; Huang, C. et al. (1999): Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. In: *Nature* 400 (6746), S. 769–772. DOI: 10.1038/23481.
- Iwasaki, A.; Medzhitov, R. (2004): Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. In: *Nature immunology* 5 (10), S. 987–995. DOI: 10.1038/ni1112.
- Jeanneau, C.; Chazalet, V.; Augé, C.; Soumpasis, D. M.; Harduin-Lepers, A.; Delannoy, P. et al. (2004): Structure-function analysis of the human sialyltransferase ST3Gal I: role of n-glycosylation and a novel conserved sialylmotif. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (14), S. 13461–13468. DOI: 10.1074/jbc.M311764200.
- Johnson, C. P.; Fujimoto, I.; Rutishauser, U.; Leckband, D. E. (2005): Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (1), S. 137–145. DOI: 10.1074/jbc.M410216200.

- Jorgensen, O. S.; Bock, E. (1974): Brain specific synaptosomal membrane proteins demonstrated by crossed immunoelectrophoresis. In: *Journal of neurochemistry* 23 (4), S. 879–880. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1974.tb04419.x.
- Kameda, K.; Shimada, H.; Ishikawa, T.; Takimoto, A.; Momiyama, N.; Hasegawa, S. et al. (1999): Expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in pancreatic cancer neural invasive lesion. In: *Cancer Letters* 137 (2), S. 201–207. DOI: 10.1016/S0304-3835(98)00359-0.
- Kiermaier, E.; Moussion, C.; Veldkamp, C. T.; Gerardy-Schahn, R.; Vries, I. de; Williams, L. 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.
- Kikly, K. K.; Bochner, B. S.; Freeman, S. D.; Tan, K. B.; Gallagher, K. T.; D'alessio, K. J. et al. (2000): Identification of SAF-2, a novel siglec expressed on eosinophils, mast cells, and basophils. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 105 (6 Pt 1), S. 1093–1100. DOI: 10.1067/mai.2000.107127.
- Kolkova, K. (2010): Biosynthesis of NCAM. In: *Advances in experimental medicine and biology* 663, S. 213–225. DOI: 10.1007/978-1-4419-1170-4_14.
- Kühnle, A.; Galuska, C. E.; Zlatina, K.; Galuska, S. P. (2019a): The Bovine Antimicrobial Peptide Lactoferricin Interacts with Polysialic Acid without Loss of Its Antimicrobial Activity against *Escherichia coli*. In: *Animals : an open access journal from MDPI* 10 (1), 1. DOI: 10.3390/ani10010001.
- Kühnle, A.; Lütteke, T.; Bornhöfft, K. F.; Galuska, S. P. (2019b): Polysialic Acid Modulates the Binding of External Lactoferrin in Neutrophil Extracellular Traps. In: *Biology* 8 (2), 20. DOI: 10.3390/biology8020020.
- Kühnle, A.; Veelken, R.; Galuska, C. E.; Saftenberger, M.; Verleih, M.; Schuppe, H. et al. (2019c): Polysialic acid interacts with lactoferrin and supports its activity to inhibit the release of neutrophil extracellular traps. In: *Carbohydrate polymers* 208, S. 32–41. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.12.033.
- Lander, E. S. (2011): Initial impact of the sequencing of the human genome. In: *Nature* 470 (7333), S. 187–197. DOI: 10.1038/nature09792.
- Lindstedt, K. A.; Kokkonen, J. O.; Kovanen, P. T. (1998): Regulation of the activity of secreted human lung mast cell tryptase by mast cell proteoglycans. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1425 (3), S. 617–627. DOI: 10.1016/S0304-4165(98)00115-9.
- Livingston, B. D.; Jacobs, J. L.; Glick, M. C.; Troy, F. A. (1988): Extended polysialic acid chains (n greater than 55) in glycoproteins from human neuroblastoma cells. In: *The Journal of biological chemistry* 263 (19), S. 9443–9448. DOI:10.1016/S0021-9258(19)76560-0

- Marone, G.; Varricchi, G.; Loffredo, S.; Granata, F. (2016): Mast cells and basophils in inflammatory and tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. In: *European journal of pharmacology* 778, S. 146–151. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.03.088.
- Martersteck, C. M.; Kedersha, N. L.; Drapp, D. A.; Tsui, T. G.; Colley, K. J. (1996): Unique alpha 2, 8-polysialylated glycoproteins in breast cancer and leukemia cells. In: *Glycobiology* 6 (3), S. 289–301. DOI: 10.1093/glycob/6.3.289.
- Matsui, K.; Kanai, S.; Ikuta, M.; Horikawa, S. (2018): Mast Cells Stimulated with Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* Augment the Development of Th1 Cells. In: *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* 21 (1), S. 296–304. DOI: 10.18433/jpps29951.
- Mendiratta, S. S.; Sekulic, N.; Hernandez-Guzman, F. G.; Close, B. E.; Lavie, A.; Colley, Karen J. (2006): A novel alpha-helix in the first fibronectin type III repeat of the neural cell adhesion molecule is critical for N-glycan polysialylation. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (47), S. 36052–36059. DOI: 10.1074/jbc.M608073200.
- Moolenaar, C. E.; Muller, E. J.; Schol, D. J.; Figdor, C. G.; Bock, E.; Bitter-Suermann, D.; Michalides, R. J. (1990): Expression of neural cell adhesion molecule-related sialoglycoprotein in small cell lung cancer and neuroblastoma cell lines H69 and CHP-212. In: *Cancer research* 50 (4), S. 1102–1106. DOI: 10.1038/bjc.1992.116
- Mori, A.; Hane, M.; Niimi, Y.; Kitajima, K.; Sato, C. (2017): Different properties of polysialic acids synthesized by the polysialyltransferases ST8SIA2 and ST8SIA4. In: *Glycobiology* 27 (9), S. 834–846. DOI: 10.1093/glycob/cwx057.
- Mühlenhoff, M.; Eckhardt, M.; Bethe, A.; Frosch, M.; Gerardy-Schahn, R. (1996): Autocatalytic polysialylation of polysialyltransferase-1. In: *The EMBO Journal* 15 (24), S. 6943–6950. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb01086.x
- Mühlenhoff, M.; Oltmann-Norden, I.; Weinhold, B.; Hildebrandt, H.; Gerardy-Schahn, R. (2009): Brain development needs sugar: the role of polysialic acid in controlling NCAM functions. In: *Biological chemistry* 390 (7), S. 567–574. DOI: 10.1515/BC.2009.078.
- Mühlenhoff, M.; Rollenhagen, M.; Werneburg, S.; Gerardy-Schahn, R.; Hildebrandt, H. (2013): Polysialic acid: versatile modification of NCAM, SynCAM 1 and neuropilin-2. In: *Neurochemical research* 38 (6), S. 1134–1143. DOI: 10.1007/s11064-013-0979-2.
- Mulloy, B.; Lever, R.; Page, C. P. (2017): Mast cell glycosaminoglycans. In: *Glycoconjugate journal* 34 (3), S. 351–361. DOI: 10.1007/s10719-016-9749-0.
- Nakata, D.; Zhang, L.; Troy, F. A. (2006): Molecular basis for polysialylation: a novel polybasic polysialyltransferase domain (PSTD) of 32 amino acids unique to the alpha 2,8-polysialyltransferases is essential for polysialylation. In: *Glycoconjugate journal* 23 (5-6), S. 423–436. DOI: 10.1007/s10719-006-6356-5.

- Neufeld, G. (2002): The Neuropilins Multifunctional Semaphorin and VEGF Receptors that Modulate Axon Guidance and Angiogenesis. In: *Trends in Cardiovascular Medicine* 12 (1), S. 13–19. DOI: 10.1016/S1050-1738(01)00140-2.
- Nguyen, C.; Mattei, M. G.; Mattei, J. F.; Santoni, M. J.; Goridis, C.; Jordan, B. R. (1986): Localization of the human NCAM gene to band q23 of chromosome 11: the third gene coding for a cell interaction molecule mapped to the distal portion of the long arm of chromosome 11. In: *The Journal of cell biology* 102 (3), S. 711–715. DOI: 10.1083/jcb.102.3.711.
- Okubo, K.; Kamiya, M.; Urano, Y.; Nishi, H.; Herter, J. M.; Mayadas, T. et al. (2016): Lactoferrin Suppresses Neutrophil Extracellular Traps Release in Inflammation. In: *EBioMedicine* 10, S. 204–215. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.07.012.
- Oltmann-Norden, I.; Galuska, S. P.; Hildebrandt, H.; Geyer, R.; Gerardy-Schahn, R.; Geyer, H.; Mühlenhoff, M. (2008): Impact of the polysialyltransferases ST8SialI and ST8SialIV on polysialic acid synthesis during postnatal mouse brain development. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (3), S. 1463–1471. DOI: 10.1074/jbc.M708463200.
- Ong, E.; Suzuki, M.; Belot, F.; Yeh, J.; Franceschini, I.; Angata, K. et al. (2002): Biosynthesis of HNK-1 glycans on O-linked oligosaccharides attached to the neural cell adhesion molecule (NCAM): the requirement for core 2 beta 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase and the muscle-specific domain in NCAM. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (20), S. 18182–18190. DOI: 10.1074/jbc.M201312200.
- Park, C. S.; Bochner, B. S. (2011): Potential targeting of siglecs, mast cell inhibitory receptors, in interstitial cystitis. In: *International neurourology journal* 15 (2), S. 61-63. DOI: 10.5213/inj.2011.15.2.61.
- Pellet-Many, C.; Frankel, P.; Jia, H.; Zachary, I. (2008): Neuropilins: structure, function and role in disease. In: *The Biochemical journal* 411 (2), S. 211–226. DOI: 10.1042/BJ20071639.
- Peng, S.; Li, C.; Wang, X.; Liu, X.; Han, C.; Jin, T. et al. (2016): Increased Toll-Like Receptors Activity and TLR Ligands in Patients with Autoimmune Thyroid Diseases. In: *Frontiers in immunology* 7, 578. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00578.
- Pinho, S. S.; Reis, C. A. (2015): Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. In: *Nature reviews. Cancer* 15 (9), S. 540–555. DOI: 10.1038/nrc3982.
- Prud'homme, G. J.; Glinka, Y. (2012): Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. In: *Oncotarget* 3 (9), S. 921–939. DOI: 10.18632/oncotarget.626.
- Prussin, C.; Metcalfe, D. D. (2006): 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 117 (2 Suppl Mini-Primer), S. S450-S456. DOI: 10.1016/j.jaci.2005.11.016.

- Randolph, G. J.; Angeli, V.; Swartz, M. A. (2005): Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. In: *Nature reviews. Immunology* 5 (8), S. 617–628. DOI: 10.1038/nri1670.
- Rey-Gallardo, A.; Delgado-Martín, C.; Gerardy-Schahn, R.; Rodríguez-Fernández, J. L.; Vega, M.A. (2011): Polysialic acid is required for neuropilin-2a/b-mediated control of CCL21-driven chemotaxis of mature dendritic cells and for their migration in vivo. In: *Glycobiology* 21 (5), S. 655–662. DOI: 10.1093/glycob/cwq216.
- Rey-Gallardo, A.; Escribano, C.; Delgado-Martín, C.; Rodríguez-Fernández, J. L.; Gerardy-Schahn, R.; Rutishauser, U. et al. (2010): Polysialylated neuropilin-2 enhances human dendritic cell migration through the basic C-terminal region of CCL21. In: *Glycobiology* 20 (9), S. 1139–1146. DOI: 10.1093/glycob/cwq078.
- Ribatti, D. (2016): Mast cells as therapeutic target in cancer. In: *European journal of pharmacology* 778, S. 152–157. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.02.056.
- Rollenhagen, M.; Buettner, F. F. R.; Reismann, M.; Jirno, A. C.; Grove, M.; Behrens, G. M. N. et al. (2013): Polysialic acid on neuropilin-2 is exclusively synthesized by the polysialyltransferase ST8SiaIV and attached to mucin-type o-glycans located between the b2 and c domain. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (32), S. 22880–22892. DOI: 10.1074/jbc.M113.463927.
- Rutishauser, U.; Thiery, J. P.; Brackenbury, R.; Sela, B. A.; Edelman, G. M. (1976): Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (2), S. 577–581. DOI: 10.1073/pnas.73.2.577.
- Saffarzadeh, M.; Juenemann, C.; Queisser, M. A.; Lochnit, G.; Barreto, G.; Galuska, S. 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.
- Sato, C.; Hane, M.; Kitajima, K. (2016): Relationship between ST8SIA2, polysialic acid and its binding molecules, and psychiatric disorders. In: *Biochimica et biophysica acta* 1860 (8), S. 1739–1752. DOI: 10.1016/j.bbagen.2016.04.015.
- Sato, C.; Kitajima, K. (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.
- Sato, C.; Kitajima, K. (2019): Sialic Acids in Neurology. In: *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* 76, S. 1–64. DOI: 10.1016/bs.accb.2018.09.003.
- Schechter, N. M.; Eng, G. Y.; McCaslin, D. R. (1993): Human skin tryptase: kinetic characterization of its spontaneous inactivation. In: *Biochemistry* 32 (10), S. 2617–2625. DOI: 10.1021/bi00061a020.
- Schwartz, L. B.; Bradford, T. R. (1986): Regulation of tryptase from human lung mast cells by heparin. Stabilization of the active tetramer. In: *The Journal of biological*

- chemistry* 261 (16), S. 7372–7379. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38401-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38401-6)
- Schwarzer, D.; Stummeyer, K.; Haselhorst, T.; Freiburger, F.; Rode, B.; Grove, M. et al. (2009): Proteolytic release of the intramolecular chaperone domain confers processivity to endosialidase F. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (14), S. 9465–9474. DOI: 10.1074/jbc.M808475200.
- Simon, P.; Bäumner, S.; Busch, O.; Röhrich, R.; Kaese, M.; Richterich, P. 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 ST8Siall. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (26), S. 18825–18833. DOI: 10.1074/jbc.M113.451112.
- Stummeyer, K.; Dickmanns, A.; Mühlenhoff, M.; Gerardy-Schahn, R.; Ficner, R. (2005): Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F. In: *Nature structural & molecular biology* 12 (1), S. 90–96. DOI: 10.1038/nsmb874.
- Tanaka, F.; Otake, Y.; Nakagawa, T.; Kawano, Y.; Miyahara, R.; Li, M. et al. (2000): Expression of polysialic acid and STX, a human polysialyltransferase, is correlated with tumor progression in non-small cell lung cancer. In: *Cancer research* 60 (11), S. 3072–3080. Download from cancerres.aacrjournals.org, published in June 2000
- Tanaka, F.; Otake, Y.; Nakagawa, T.; Kawano, Y.; Miyahara, R.; Li, M. et al. (2001): Prognostic significance of polysialic acid expression in resected non-small cell lung cancer. In: *Cancer research* 61 (4), S. 1666–1670. Download from cancerres.aacrjournals.org, published in February 2001
- Turnbull, J. E.; Field, R. A. (2007): Emerging glycomics technologies. In: *Nature chemical biology* 3 (2), S. 74–77. DOI: 10.1038/nchembio0207-74.
- Ulm, C.; Saffarzadeh, M.; Mahavadi, P.; Müller, S.; Prem, G.; Saboor, F. 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.
- Varbanov, H.; Dityatev, A. (2017): Regulation of extrasynaptic signaling by polysialylated NCAM: Impact for synaptic plasticity and cognitive functions. In: *Molecular and cellular neurosciences* 81, S. 12–21. DOI: 10.1016/j.mcn.2016.11.005.
- Weinhold, B.; Seidenfaden, R.; Röckle, I.; Mühlenhoff, M.; Schertzinger, F.; Conzelmann, S. 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, S.; Buettner, F. F. R.; Erben, L.; Mathews, M.; Neumann, H.; Mühlenhoff, M.; Hildebrandt, H. (2016): Polysialylation and lipopolysaccharide-induced

- shedding of E-selectin ligand-1 and neuropilin-2 by microglia and THP-1 macrophages. In: *Glia* 64 (8), S. 1314–1330. DOI: 10.1002/glia.23004.
- Werneburg, S.; Mühlenhoff, M.; Stangel, M.; Hildebrandt, H. (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.
- Whitfield, C. (2006): Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. In: *Annual review of biochemistry* 75, S. 39–68. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142545.
- Wildhagen, K. C. A. A.; García de Frutos, P.; Reutelingsperger, C. P.; Schrijver, R.; Aresté, C.; Ortega-Gómez, A. et al. (2014): Nonanticoagulant heparin prevents histone-mediated cytotoxicity in vitro and improves survival in sepsis. In: *Blood* 123 (7), S. 1098–1101. DOI: 10.1182/blood-2013-07-514984.
- Xu, J.; Zhang, X.; Pelayo, R.; Monestier, M.; Ammollo, C. T.; Semeraro, F. 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.
- Yokoi, H.; Choi, O. H.; Hubbard, W.; Lee, H.-S.; Canning, B. J.; Lee, H. H. et al. (2008): Inhibition of FcεRI-dependent mediator release and calcium flux from human mast cells by sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 8 engagement. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 121 (2), 499-505.e1. DOI: 10.1016/j.jaci.2007.10.004.
- Yu, R. K.; Ledeen, R. (1969): Configuration of the ketosidic bond of sialic acid. In: *The Journal of biological chemistry* 244 (5), S. 1306–1313.
- Yu, Y.; Blokhuis, B. R.; Garssen, J.; Redegeld, F. A. (2016): Non-IgE mediated mast cell activation. In: *European journal of pharmacology* 778, S. 33–43. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.07.017.
- Zlatina, K.; Galuska, S. 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, K.; Lütke, T.; Galuska, S. P. (2017): Individual Impact of Distinct Polysialic Acid Chain Lengths on the Cytotoxicity of Histone H1, H2A, H2B, H3 and H4. In: *Polymers* 9 (12), 720. DOI: 10.3390/polym9120720.
- Zlatina, K.; Saftenberger, M.; Kühnle, A.; Galuska, C. E.; Gärtner, U.; Rebl, A. et al. (2018): Polysialic Acid in Human Plasma Can Compensate the Cytotoxicity of Histones. In: *International journal of molecular sciences* 19 (6), 1679. DOI: 10.3390/ijms19061679.

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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

13) Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, ohne die diese Dissertation nicht zu Stande gekommen wäre. **Primär gilt der Dank allen**, die ich in der Abteilung Reproduktionsmedizin im Leibniz-Institut in Dummerstorf kennen lernen durfte.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. Sebastian Galuska sowie Dr. Christina Galuska bedanken. Mit der lockeren Art und dem unbegrenzten Optimismus schaffen sie es, dass man als Jungmediziner nicht an der wissenschaftlichen Arbeit im Labor verzweifelt. Die ständige Erreichbarkeit mit guten Ratschlägen und Hilfeleistungen ist alles andere als selbstverständlich.

Weiterhin möchte ich mich bei Gesine Krüger bedanken. Von Beginn an half sie wo sie nur konnte und war das Herzstück der Labortätigkeit. Ohne ihr Zutun wäre diese Dissertation kaum vorstellbar. Weiterhin wusste sie durch ihre herzliche und auch gleichzeitig direkte Art, in manch frustrierten Momenten im Labor die Stimmung zu heben. Und selbst wenn mal keine fachliche Hilfe nötig war, sorgte sie sich noch um Leib und Wohl ihrer „Muckies“. Zusätzlich möchte ich Petra Reckling danken, deren fachliche Kompetenzen im Umgang mit der Immunfluoreszenz und der Immunhistologie lediglich von ihren Backkünsten übertroffen wurden. Für die Unterstützung bei den gentechnischen Versuchen möchte ich mich auch bei Ursula Antkewitz bedanken.

Nicht zu vergessen, danke ich den anderen Doktoranden Kim Bornhöfft, Andrea Kühnle, Kristina Zlatina und Marzia Venuto. Als Labor-Erfahrene wussten sie mir zu helfen und auch neben der Arbeit konnte man einige schöne Abende verbringen.

Weiterhin möchte ich Julia Hinterseher danken, mit ihr habe ich gemeinsam, genauso wie das ganze Studium, das „Abenteuer“ Rostock bestritten.

Zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, die mich in meinen Entscheidungen stets unterstützten und mir helfend zur Seite standen. Ohne Sie wäre ich sicherlich nicht dort, wo ich nun stehe.