„Evaluierung von Methoden zur *in situ* Charakterisierung der Polysialylierung des neuralen Zelladhäsionsmoleküls NCAM“

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

vorgelegt von Debus, Benedikt Sebastian (geb. Schäfer)
aus Fulda

Gießen 2014

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

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Lienhard Schmitz

Gutachter: Herr PD Dr. Galuska
Gutachter: Herr Prof. Dr. Oksche

Tag der Disputation: 13. April 2015

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Zelladhäsionsmoleküle 1
1.2 Oligo- und Polysialinsäuren (Oligo- und PolySia) 2
1.2.1 Struktur von Oligo- und PolySia 2
1.2.2 Vorkommen und Funktion von Di-/Oligo- und PolySia 5
1.3 Neural cell adhesion molecule (NCAM) 9
1.3.1 Vorkommen von NCAM 9
1.3.2 Struktur und Isoformen von NCAM 10
1.3.3 Funktion von polysialyliertem NCAM 12
1.4 Polysialyltransferasen 21
1.4.1 Polysialylierung von NCAM durch ST8SiaII und ST8SiaIV 21
1.5 Methoden zur Charakterisierung von Di-/Oligo- und PolySia 25
1.6 Zielsetzung der Arbeit 27
2 Material und Methoden 29
2.1 Chemikalien 29
2.2 Biologische Materialien 29
2.2.1 Zellkulturen 29
2.2.2 Tiere 29
2.3 Aufarbeitung der Hirngewebeproben 30
2.3.1 Gefriertrocknung für HPLC-Analyse 30
2.4 HPLC-Analyse 30
2.4.1 Verwendete Puffer: 30
2.4.2 Vorbereitung der Proben 31
2.4.3 DMB-Markierung 32
2.4.4 Kontrolle 32
2.4.5 Analyse 32
2.5 Verknüpfungsanalyse von Di-/Oligo – und PolySialinsäuren 34
2.5.1 Verwendete Puffer und Materialien: 34
2.5.2 DMB-Markierung von Di-/Oligo und PolySia 34
2.5.3 Trennung von Oligo-/PolySia mit der Anionen-Austauscher HPLC 35
2.5.4 Quantifizierung der Sialinsäuren 35
2.5.5 Die „*linkage*“- Analyse 36
2.5.6 Analyse von Sialinsäureketten aus Zellkulturen und Gewebeproben 37

3 Ergebnisse 38
3.1 HPLC-Analyse von Mäusehirnen 38
3.1.1 Vorversuche 38
3.1.2 Quervernetzung von DMB-Reagenz 42
3.1.3 Zeitliche Begrenzung der Formalinfixierung 43
3.1.4 Abschwächung der Formalineffekte durch Aqua dest. 44
3.1.5 Abschwächung der Formalineffekte durch Gefriertrocknung 45
3.2 Verknüpfungsanalyse 48
3.2.1 Sensitivitätssteigerung der Analysemethode 48
3.2.2 Anwendbarkeit bei biologischen Proben 50
3.2.3 Anwendbarkeit zur Ermittlung potenzieller neuer Tumormarker 52
4 Diskussion 54
4.1 HPLC-Analyse von formalinfixiertem Gewebe 54
4.2 Verknüpfungsanalyse von Oligo-/Polysialinsäuren 56
4.2.1 Anwendbarkeit der Methode an biologischen Proben 58
4.2.2 Anwendbarkeit zur Ermittlung potenzieller neuer Tumormarker 58
5 Zusammenfassung 60
6 Summary 61
7 Abkürzungsverzeichnis 62
8 Abbildungs-/Tabellenverzeichnis 64
8.1 Abbildungsverzeichnis 64
8.2 Tabellenverzeichnis 64
9 Literaturverzeichnis 65
10 Publikationsverzeichnis 80
11 Erklärung zur Disseration 81
12 Danksagung 82
13 Lebenslauf 83

1 Einleitung

1.1 Zelladhäsionsmoleküle

Bei Zelladhäsionsmolekülen handelt es sich um eine Klasse von Proteinen auf der Oberfläche von Zellen, die Bindungen sowohl zwischen benachbarten Zellen (Zell-Zell-Adhäsion) als auch zwischen Zellen und Bestandteilen der extrazellulären Matrix (Zell-Matrix-Adhäsion) vermitteln. So dienen sie dem Zusammenhalt von Geweben und ermöglichen eine Kommunikation von Zellen untereinander (Bosman 1993). Zell-Adhäsionsmoleküle werden funktionell und strukturell von den Zell-Verbindungsmolekülen, die feste interzelluläre Brücken bilden (z.B. *Tight-junctions*) und den Substrat-Adhäsionsmolekülen, Proteine der extrazellulären Matrix bzw. Basalmembran (z.B. Proteoglycane, Kollagene), abgegrenzt Selbst können die Zelladhäsionsmoleküle in vier Familien unterteilt werden (Bosman 1993):

- Selektine
- Cadherine
- Integrine
- Moleküle der Immunglobulinsuperfamilie (IgSF)

Selektine sind Lektin-artige Rezeptoren (Springer 1990; Rosen 1993), die zum Beispiel auf Leukozyten (L-Selektine) (Gallatin et al. 1983; Lewinsohn et al. 1987), Thrombozyten (P-Selektine) (Hsu-Lin et al. 1984; McEver et al. 1984) und Endothelzellen (E-Selektine) (Bevilacqua et al. 1987; Bevilacqua 1993) exprimiert werden. Sie sind vor allem für einen, im Rahmen von Entzündungsreaktionen und *Lymphozytenhoming* stattfindenden, ersten Kontakt der Lymphozyten mit dem Endothel verantwortlich (Lewinsohn et al. 1987; McEver et al. 1991; Springer 1995; Vestweber and Blanks 1999).

Cadherine sind Calciumionen abhängige Rezeptoren (Yoshida and Takeichi 1982; Gallin et al. 1983), die beispielsweise in spezialisierten Membranbereichen (Zonula adherens) vorkommen und an der Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten, Aufrechterhaltung der Zellpolarität und embryonalen Morphogenese beteiligt sind (Halbleib and Nelson 2006).

Integrine, die praktisch auf allen Zellen exprimiert werden, spielen vor allem eine Rolle während der Embryonalentwicklung (Zellwachstum und -differenzierung) (Danen and Sonnenberg 2003), bei Immunantworten (Haskill et al. 1988) und der Wundheilung (Cheresh 1991).

Die Moleküle der Immunglobulinsuperfamilie, eine große Gruppe von Proteinen auf Zelloberflächen und löslichen Proteinen, die in Erkennungs-, Adhäsions-, und Interaktionsprozessen von Zellen involviert sind, werden auf der Grundlage einer bei allen zugehörigen Proteinen vorkommenden Immunglobulin-ähnlichen Faltungsdomäne klassifiziert. Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM, einer der bekanntesten Vertreter der Immunglobulinsuperfamilie (Williams and Barclay 1988), wird später im Kapitel 1.3 ausführlich besprochen.
Viele Adhäsionsmoleküle sind mit Elementen des Cytoskeletts und/oder mit intrazellulären Signalmolekülen, wie Proteinkinasen und Phosphatasen, assoziiert, was sie als Signalvermittler fungieren lässt und die rein mechanisch-dynamische Komponente ergänzt.

1.2 Oligo- und Polysialinsäuren (Oligo- und PolySia)

1.2.1 Struktur von Oligo- und PolySia

Die Sialinsäuren sind α-Ketosäuren mit einem C9-Grundgerüst, einer Carboxylgruppe in C1-Position und einer Ketogruppe in C2-Position. Zu den Sialinsäuren werden über 50 verschiedene Formen gezählt (Schauer et al. 1996; Angata and Varki 2002). Am häufigsten anzutreffen sind N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), N-Glykolylneuraminsäure (Neu5Gc) und Deaminoneuraminsäure (KDN), deren 5-C durch eine Acetoamid-, Hydroxyacetoamid-, oder Hydroxylgruppe substituiert ist (Abbildung 1).
Durch Substitution der Hydroxylgruppen in C4-, C7-, C8- und C9-Position mit Acetyl-, Lactoyl-, Methyl-, Sulfonyl- oder Phosphonylresten entsteht eine breit gefächerte Strukturvielfalt (Angata and Varki 2002; Schauer 2004).
Sialinsäuren spielen bei der Stabilisierung von Proteinen, Zelldifferenzierung, Kontrolle der Halbwertszeit von zirkulierenden Glykoproteinen und Zellen, wie auch bei Zell-Zell bzw. Zell-Matrix Interaktionen und der Signalübertragung eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund kommen Sialinsäuren in den meisten Glykolipiden und Glykoproteinen als terminale Monosialylreste der Glykane vor (Green et al. 1995; Kelm et al. 1997; Schauer 2000; Sato 2004; Schauer 2004; Ohtsubo and Marth 2006; Varki and Angata 2006; Crocker et al. 2007; Varki and Varki 2007; Varki 2007).

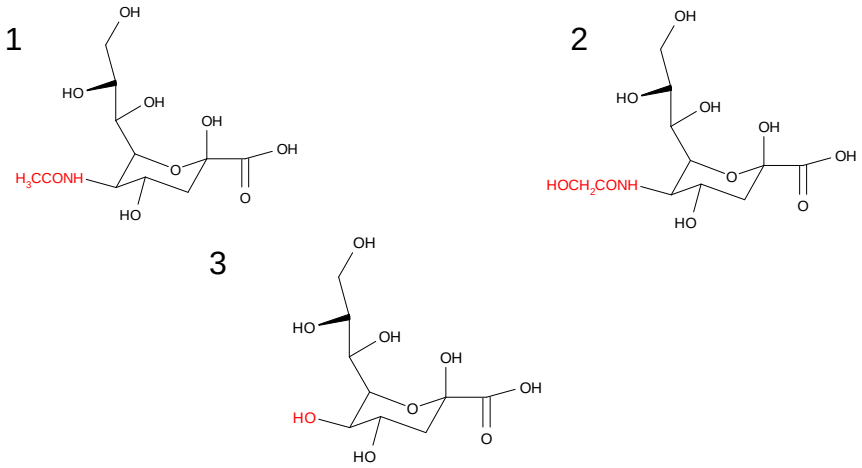
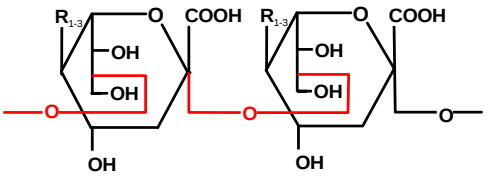


Abbildung 1. Strukturen der drei häufigsten Sialinsäuren (Galuska 2008).
Dargestellt sind die Strukturen der drei häufigsten Sialinsäuren: (1) N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), (2) N-Glykolylneuraminsäure (Neu5Gc) und (3) Deaminoneuraminsäure (KDN) (Angata and Varki 2002; Schauer 2004).

Es kommt auch zur Di-, Oligo- oder Polysialylierung von Glykokonjugaten (Sato 2004). Die Polymere aus Sialinsäuren unterscheiden sich in der Kettenlänge mit 2 (DiSia), 3-7 (OligoSia) und ≥ 8 (PolySia) Sialinsäureresten (Sato 1999). Der Polymerisierungsgrad (DP) von Polysialinsäureketten reicht natürlicherweise von 8 bis zu 200 Sialinsäureresten. Hinzu kommen die Art der Verknüpfung zwischen den Sialinsäureresten, die Sialinsäurespezies (Abbildung 2) sowie mögliche Sulfatierungen (Ijuin et al. 1996; Miyata et al. 2004) oder O-Acetylierungen (Hallenbeck et al. 1987; Sato et al. 1993) an C7-, C8- und C9-Position.
^{1}H und ^{13}C-NMR Spektroskopien zeigen, dass PolySia-Ketten eine helikale Konformation einnehmen, bei der die Caboxylgruppen zum Inneren der Helix zeigen, während die N-acetyl-Gruppen nach außen gerichtet sind, was bei PolyNeu5Ac und PolyNeu5Gc nachgewiesen wurde (Brisson et al. 1992; Baumann et al. 1993).
Im Gegensatz dazu haben Analysen von α2,8-verknüpften Di- und OligoSia- Strukturen ergeben (Michon et al. 1987; Brisson et al. 1992; Evans et al. 1995), dass Neu5Ac Reste andere Konformationen einnahmen als die internen Neu5Ac Reste von PolySia-Ketten.

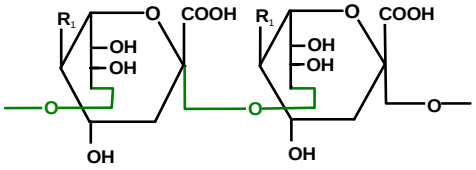


1

R_1:-$HNCOCH_3$, Neu5Ac

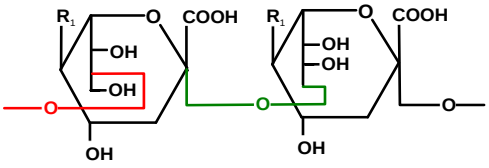
R_2:-$HNCOCH_2OH$, Neu5Gc

R_3:-OH, KDN



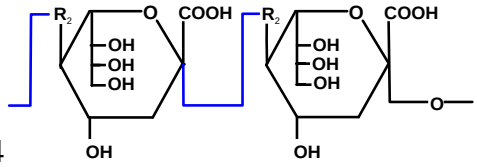
2

R_1:-$HNCOCH_3$, Neu5Ac



3

R_1:-$HNCOCH_3$, Neu5Ac



4

R_2:-$HNCOCH_2$OH, Neu5Gc

Abbildung 2. Verknüpfungen von Sialinsäure Oligo-/Polymeren (Galuska 2008).
Dargestellt sind die bisher beschriebenen Verknüpfungen von Sialinsäure Oligo- und Polymeren: (1) α2,8-Verknüpfung (Inoue et al. 1980; Vimr et al. 1984; Kanamori et al. 1990; Troy 1992; Sato et al. 1993), (2) α2,9-Verknüpfung (Bhattacharjee et al. 1975; Miyata et al. 2006), (3) abwechselnde α2,8-/α2,9-Verknüpfung (Chao et al. 1999; Shen et al. 1999) und (4) α2,5-O-Glykolylverknüpfung (Kitazume et al. 1996).

Die *in vivo* vorzufindende strukturelle Vielfalt wird noch zusätzlich durch die Laktonisierung von Oligo- und PolySia erhöht (Riboni et al. 1986; Kielczynski et al. 1994). Bei der Laktonisierung kommt es zur Veresterung der Carboxylgruppe mit einer Hydroxylgruppe der benachbarten Sialinsäure. Es ensteht ein sechsgliedriger Ring. Da die Carboxylgruppe bei der Laktonisierung maskiert wird, kann so eine schnelle Regulation der Gesamtanzahl an Carboxylgruppen der PolySia-Kette erreicht werden, was jedoch ohne eine Veränderung der Kettenlänge des Oligo- oder Polymers geschieht. Die Regulation der Laktonisierung *in vivo* ist unbekannt. Diese könnte jedoch wie *in vitro* durch ein saures Milieu hervorgerufen werden bzw. einer enzymatischen Reaktion unterliegen (Varki 1992; Zhang and Lee 1999).

1.2.2 Vorkommen und Funktion von Di-/Oligo- und PolySia

Sialinsäuren spielen eine wichtige Rolle in Ligand-Rezeptor-Bindungen, Zell-Zell- und Zell-Extrazellulärmatrix-Interaktionen während der Befruchtung, Embryogenese und Zelldifferenzierung (Schauer et al. 1996; Schauer 2004).
Unterteilt werden können Di-/Oligo- und PolySia-tragende Glycoproteine in zwei Gruppen, was auf Grundlage der Expression von Mono- und PolySia-Resten geschieht, die, wie bereits erläutert, anhand der Zahl verknüpfter Sialinsäuren definiert werden (Sato 1999).
Zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt sind Glykokonjugate in Säugern, welche di- und oligosialylierte Strukturen tragen. Bei Gangliosiden mit zwei oder drei Sialinsäureresten ist deren Vorkommen als strukturelle Einheit bereits bekannt (Sato 2004). Im Gehirn adulter Mäuse sind CD 166 (Sato et al. 2002) und Synaptophysin (Zhang et al. 1997) disialyliert. Gleiches gilt für die im Rinderserum enthaltenen Glykoproteine Fetuin, α_2-Makroglobulin (Kitajima et al. 1999) und adipoQ (adiponectin), ein Adipozytokin, welches Auswirkungen auf den Fettstoffwechsel hat und an der Pathogenese von Diabetes mellitus und Artheriosklerose beteiligt ist (Sato et al. 2001). CD166, ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie, existiert hauptsächlich in Neuronen und dient dort als Zelladhäsionsmolekül. Über O-verknüpfte Disialinsäurereste ist CD166 am Neuritenwachstum bei Neuroblastomzellen der Maus (Sato et al. 2002) und weiterhin möglicherweise an der T-Zell-Aktivierung bei Mäusen beteiligt (Nohara et al. 1998). Von denen im Rinderserum detektierten Molekülen ist nur ein gewisser Prozentsatz disialyliert und damit spezifisch markiert, was möglicherweise von entwicklungsbedingten bzw. physiologischen Veränderungen abhängt. Über Zusammenhänge mit den sich ändernden Konzentrationen von α_2-Makroglobulin und adipoQ während Entzündungsreaktionen (Gehring et al. 1987; Hu et al. 1996) und der posttranslationalen Disialylierung wird spekuliert (Sato 2004).
Zu den oligosialylierten Strukturen gehört die α_5-Untereinheit eines $\alpha_5ß_1$-Integrins, das u.a. als Rezeptor für Fibronektin dient. Es ist bisher auf Melanomzellen, Fibroblasten und Leukämiezellen des Menschen in dieser oligosialylierten Form nachgewiesen worden (Nadanaka et al. 2001). Entfernt man die Oligosialinsäure, wird die Adhäsion an Fibronektin inhibiert und auch die Bindungskapazität eines die Fibronektin-Bindungsdomäne des Integrins erkennenden Antikörpers wird abgeschwächt

(Nadanaka et al. 2001). Offensichtlich stabilisiert die Oligosialinsäure die für eine Fibronektinbindung nötige Konformation des Integrins (Nadanaka et al. 2001).
Im Gehirn von Schweinen, wie bei anderen Säugern auch, ist die adulte Form von NCAM oligo- und disialyliert, während im embryonalen Gehirn NCAM massiv polysialyliert ist. Im embryonalen Gehirn sind außerdem disialylierte Glykoproteine (nicht NCAM) im Vergleich zum adulten Hirn verstärkt nachweisbar. Dies impliziert die mögliche funktionelle Wichtigkeit, für Zell-Zell- oder Zell-Liganden-Interaktionen. Es gibt bislang noch keine Ergebnisse bezüglich spezifisch beeinflusster Interaktionen durch die disialylierten Glykoproteine, wie es für die Ganglioside (komplexe Glykolipide) bei der Oberflächenexpression von Antigenen, Signaltransduktion, Zelldifferenzierung und Zelladhäsion bereits der Fall ist (Nagai and Iwamori 1995; Sharon and Lis 1997; Sato 2004). Experimente mit verschiedenen Zelllinien zeigen eine veränderte Expression von Di- und OligoSia während der Differenzierung der Zellen, so dass eine wichtige und teilweise unterschiedliche Rolle vor, während und nach der Differenzierung angenommen werden muss (Sato 1999).
Zu den identifizierten Glykokonjugaten, die polysialyliert sind, gehört die Glykokalix neuroinvasiver Bakterien (Robbins et al. 1974), wobei die Beteiligung von Sialinsäuren an der Hirninvasion in Erwägung gezogen wird. Des weiteren werden das *neural cell adhesion molecule* (NCAM) (Finne 1982), SynCAM1 (Galuska et al. 2010), ST8SiaII im Ejakulat von Säugern (Simon et al. 2013), ein spannungsgesteuerter Natriumkanal bei Aalen (James and Agnew 1987), Flagellasialin des Flagellums von Seeigelsperma (Miyata et al. 2004), Polysialoglycoprotein (PSGP) auf Fischeiern (Inoue and Iwasaki 1978) und das CD36 der Muttermilch (Yabe et al. 2003) durch Polysialinsäurereste modifiziert.
Neisseria meningitidis, ein neuroinvasives Bakterium, trägt auf seiner Oberfläche α2,8-verknüpfte PolySia und kann so dem Zugriff des Immunsystems durch Tarnung entkommen. Möglich wird dies durch die im Nervengewebe der Säugetiere ebenfalls vorkommenden Polymere aus α2,8-verknüpfter Sialinsäure (Vimr and Lichtensteiger 2002; Comstock and Kasper 2006). Ähnlich verhält es sich bei dem Bakterium *Escherichia coli K1* (E.coli), welches sich ebenfalls durch an seiner Oberfläche exprimierte α2,8-verknüpfte PolySia schützt. Nachteilig wirkt sich hier jedoch die, mit der Expression von PolySia einhergehende, erhöhte Anfälligkeit für Bakteriophagen aus. Phagen sind mit Hilfe einer Endoneuraminidase (EndoN), welche PolySia-Bindungsdomänen besitzt, in der Lage die α2,8-verknüpfte PolySia des Bakteriums zu

erkennen und dann die schützende Glykokalyx abzubauen (Stummeyer et al. 2004; Haselhorst et al. 2006).

PolySia kommt im Nervengewebe von Säugetieren überwiegend an N-Glycanen von NCAM vor (Finne 1982; Finne and Makela 1985), wobei Kettenlängen von > 50 Zuckerresten nachgewiesen wurden (Inoue and Inoue 2001; Inoue and Inoue 2001; Inoue and Inoue 2003; Nakata and Troy 2005). Darauf wird später in Kapitel 1.5.2 intensiver eingegangen.

Bereits 1994 gelang, nach Ausschaltung der Expression von NCAM in postnatalen Mäusehirnen, weiterhin der Nachweis von PolySia (Cremer et al. 1994), gebunden an einen unbekannten Träger. Galuska et al. identifizierten mit SynCAM 1 ein weiteres polysialyliertes Glykoprotein im Gehirn von Mäusen (Galuska et al. 2010). Es handelt sich um ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie (Biederer et al. 2002), welches generell neben NCAM, während der Reifung des Gehirns, polysialyliert wird (Galuska et al. 2010). SynCAM1 vermittelt im Gehirn über homophile sowie heterophile Interaktionen mit SynCAM2 die Ausbildung von Synapsen und anschließend die Festigung der Verbindung (Biederer et al. 2002; Sara et al. 2005). SynCAM 1 wird an der ersten Ig-Domäne polysialyliert (Galuska et al. 2010), welche essentiell für die Trans-Interaktion zwischen SynCAM-Molekülen ist (Fogel et al. 2007). Auch bei SynCAM führt die Polysialylierung zur kompletten Inhibition der Trans-Interaktion zwischen SynCAM-Molekülen, welche nach enzymatischer Entfernung von PolySia komplett reversibel ist (Galuska et al. 2010). Durch immunhistologische Untersuchungen konnten NG2-Zellen als Träger des polysialylierten SynCAM identifiziert werden (Galuska et al. 2010). NG2- Zellen sind multipotente Polydendrozyten (Nishiyama et al. 2009; Trotter et al. 2010), die sich in Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone zu differenzieren vermögen und eine Rolle bei Myelinisierungsvorgängen spielen (Nishiyama et al. 2009; Trotter et al. 2010). SynCAM, als starker Induktor von synaptischer Differenzierung (Biederer et al. 2002), könnte also eine Funktion bei der Ausbildung von Synapsen zwischen Neuronen und NG2-Zellen haben und in der polysialylierten Form sogar direkten Einfluss auf den Informationsfluss zwischen den Zellen ausüben. Die Öffnungszeiten der in die neurale Signalübertragng bei NG2-Zellen involvierten Glutamatrezeptoren werden durch PolySia durch direkte Interaktion potenziert (Vaithianathan et al. 2004).

Bei Seeigelsperma moduliert PolySia die Membranspannung sowie den intrazellulären Kalziumspiegel (Miyata et al. 2007). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit der PolySia-Spezies verschiedene Einflussmöglichkeiten existieren. Im

Fall von α2,9-verknüpften-Neu5Ac Polymeren sind dies die Spermienbeweglichkeit und der intrazelluläre Kalziumgehalt, bei α2,5-O-glykolyl-verknüpfter PolySia eine Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes, mit der Folge einer verstärkten Akrosomenreaktion (Miyata et al. 2007). Untersuchungen an Spermatozoen von Säugern enthüllten die Präsenz von α2,8-verknüpfter PolySia mit Kettenlängen über 40 Zuckerresten (Simon et al. 2013). Als Träger von PolySia konnten NCAM und die Polysialyltranferase ST8SiaII identifiziert werden (Simon et al. 2013). Ein Beleg dafür, dass eine Polysialyltransferase an sich nicht nur unter künstlichen Bedingungen (auto)polysialyliert werden kann (Muhlenhoff et al. 1996; Close and Colley 1998; Close et al. 2000; Close et al. 2001), sondern dass diese posttranslationale Modifikation auch unter physiologischen Bedingungen abläuft. Immunhistochemische Untersuchungen ergaben zudem die Lokalisation von PolySia in der postakrosomalen Region, wohingegen die akrosomale Region und das Schwanzstück als nahezu PolySia-negativ imponierten. Weitere Analysen ergaben, dass auch bei Ratten- und Bullenspermien, also speziesübergreifend, polysialylierte Glykokonjugate im postakrosomalen Bereich vorhanden sind (Simon et al. 2013). Der Ursprung der polysialylierten Glykoproteine wurde im Nebenhodenkopf als Bestandteil von Epididymosomen (Saez et al. 2003; Aitken et al. 2007; Marengo 2008) vermutet, die während der Passage des Nebenhodens in die Spermatozoenmembran integriert werden und unter anderem Adhäsionsproteine zur Bindung an die *Zona pellucida* der Eizelle enthalten.

Bei Polysialoglycoprotein (PSGP) auf Fischeiern ist interessant zu erwähnen, dass die PolySia Ketten eine wesentlich größere strukturelle Vielfalt im Vergleich mit denen von NCAM aufweisen (Sato et al. 1993). Diese Vielfalt ist dem Anschein nach an Gattung und Art gebunden, dient spezifischen Erkennungsmechanismen zwischen Spermien und Eiern und sorgt später, in frühen Entwicklungsstadien, für mechanischen bzw. antimikrobiellen Schutz der Embryonen (Inoue 1992).

Im Falle von CD 36 aus humaner Muttermilch, dessen Funktion darin noch nicht bekannt ist, zeigt die Expression von PolySia einen Monat nach der Entbindung ein Maximum (Yabe et al. 2003). Es wird gemutmaßt, dass in Abhängigkeit von der Länge der Sialinsäureketten diese die Bindungseigenschaften von CD 36 beeinflussen. Des weiteren könnten die Polysialinsäuren aus der Milch der Mutter, zusätzlich zur eigenen Synthese des Neugeborenen, als Quelle für den Aufbau des Nervensystems verwendet werden (Yabe et al. 2003; Sato 2004).

Zwei Mitglieder der Neuropilin Familie, NRP-1 und NRP-2, sind bekannt für die Erleichterung der Axonführung des sich entwickelnden Nervensystems (Chen et al. 1997; He and Tessier-Lavigne 1997; Kolodkin et al. 1997; Giger et al. 2000) und werden auch im Endothel der Blutgefäße exprimiert, wo sie Proliferation, Migration und Angiogenese beeinflussen (Soker et al. 1998; Favier et al. 2006). Kürzlich wurde polysialyliertes NRP-2 auch auf der Oberfläche von reifenden dentritischen Zellen des Menschen nachgewiesen. Entfernt man PolySia von NRP-2, fördert dies die Interaktion von dentritischen Zellen und Lymphozyten. Folge davon ist die Stimulation der weißen Blutkörperchen.
Ähnlich der antiadhäsiven Funktion der negativ geladenen Polysialinsäure auf NCAM, könnte PolySia auf NRP-2 den sich differenzierenden dentritischen Zellen ihre Migration zu Lymphknoten und -organen erleichtern, indem unzweckmäßige Interaktionen mit z.B. Gefäßendothelialzellen verhindert werden. Im Zielorgan könnte PolySia-NRP-2 das Ausmaß der Interaktion von T-Lymphozyten mit dentritischen Zellen modulieren (Curreli et al. 2007). Es können sowohl Oligosaccharide polysialyliert werden, die über die Säureamidgruppe von Asparagin (N-Glykane), als auch über die Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin (O-Glykane) an das Protein geknüpft sind. Beispiele hierfür sind die polysialylierten O-Glykane des CD 36 der Muttermilch (Yabe et al. 2003) und NCAM, bei welchen N-Glycane durch Anhang von Neu5Ac-Ketten in ihren Eigenschaften beeinflusst werden (Finne 1982).

1.3 Neural cell adhesion molecule (NCAM)

1.3.1 Vorkommen von NCAM

1977 wurde NCAM erstmals aus embryonalem Hühnergewebe isoliert (Thiery et al. 1977). Bereits während der Embryonalperiode wird NCAM im Blastoderm sowie später in Ekto- und Mesodermderivaten (z.B. Neuralplatte, Neuralrohr und Endothel) exprimiert. Mit anderen Zelladhäsionsmolekülen ist es während dieser Phase entscheidend an der Zellgruppenformierung und neuronalen Entwicklung beteiligt (Edelman 1985). Bei fortschreitender Entwicklung wird die NCAM-Expression im größten Teil der Gewebe reduziert und ist im ausgewachsenen Organismus hauptsächlich im Nervensystem vorhanden. Ausnahmen hiervon sind einige nicht neuronale Zellen, wie natürliche Killerzellen (CD 56, eine NCAM Isoform),

Skelettmuskelzellen, Fibroblasten des *Nervus ischiadicus,* β-Zellen des Pankreas sowie endokrine Gewebe, die auch NCAM im adulten Stadium exprimieren.
Im zentralen Nervensystem wird NCAM auf der Zelloberfläche von Neuronen, Gliazellen und Astrozyten exprimiert (Keilhauer et al. 1985). Im peripheren Nervensystem ist NCAM auf Neuronen und Schwann-Zellen nachweisbar. Bisher konnten im Gehirn, im Liquor cerebrospinalis und dem Blut auch lösliche Formen von NCAM nachgewiesen werden, die in den Extrazellulärraum abgegeben wurden, oder Moleküle, die aus transmembranären Isoformen durch extrazelluläre Spaltung hervorgehen. Auf eine Sekretion weisen gefundene intakte transmembranäre Formen hin (Krog et al. 1992; Olsen et al. 1993).
Welche Funktion lösliches NCAM spielt, ist noch unklar. Vermutet werden eine Beteiligung bei der De-Adhäsion von Zellen und bei Bindung an die extrazelluläre Matrix eine Funktion als Substrat für NCAM exprimierende Zellen (Krog et al. 1992). *In vitro*- Versuche konnten nachweisen, dass lösliches NCAM auf Vorläuferzellen des Hippocampus einen proliferationshemmenden, aber differenzierungsfördernden Effekt aufweist (Shin et al. 2002) und Schwannzellen zur Migration stimuliert werden (Thomaidou et al. 2001).

1.3.2 Struktur und Isoformen von NCAM

NCAM ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) zugeordnet wird (Brackenbury et al. 1977; Thiery et al. 1977; Rutishauser et al. 1988; Walsh and Doherty 1997). NCAM-140 und NCAM-180, zwei Transmembranproteine, und das mit einem Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) in der Zellmembran verankerte NCAM-120 sind die drei hauptsächlich exprimierten NCAM-Isoformen, die alle durch alternatives Spleißen der prä-mRNA eines einzelnen NCAM-Gens enstehen (Cunningham et al. 1987; Owens et al. 1987; Goridis and Brunet 1992). Jede der drei Isoformen hat einen aus fünf Ig-ähnlichen, sowie zwei Fibronektin Typ-III homologen Domänen zusammengesetzten extrazellulären Anteil, von denen die Ig-ähnlichen Domänen III-V und auch die erste Fibronektin Typ-III homologe Domäne glykosyliert sind. Die einzelnen Ig-ähnlichen Domänen und die erste Fibronektin Typ-III homologe Domäne unterscheiden sich hinsichtlich der Zahl und Art der Glykosylierungsstellen.Die erste Fibronektin Typ-III homologe Domäne besitzt mindestens drei O-Glykosylierungsstellen (Mendiratta et al. 2006) und die Ig-ähnlichen

Domänen III, IV und V insgesamt sechs N-Glykosylierungsstellen (Liedtke et al. 2001; von Der Ohe et al. 2002; Wuhrer et al. 2003; Albach et al. 2004).
Komplexe N-Glykane der N-Glykosylierungsstellen fünf und sechs (Nelson et al. 1995; Angata et al. 1998; Liedtke et al. 2001; Wuhrer et al. 2003), wo eine Polysialylierung bei allen drei NCAM-Isoformen möglich ist (He et al. 1987; Kojima et al. 1997; Franceschini et al. 2001), befinden sich in der Ig-ähnlichen Domäne V (Abbildung 3).

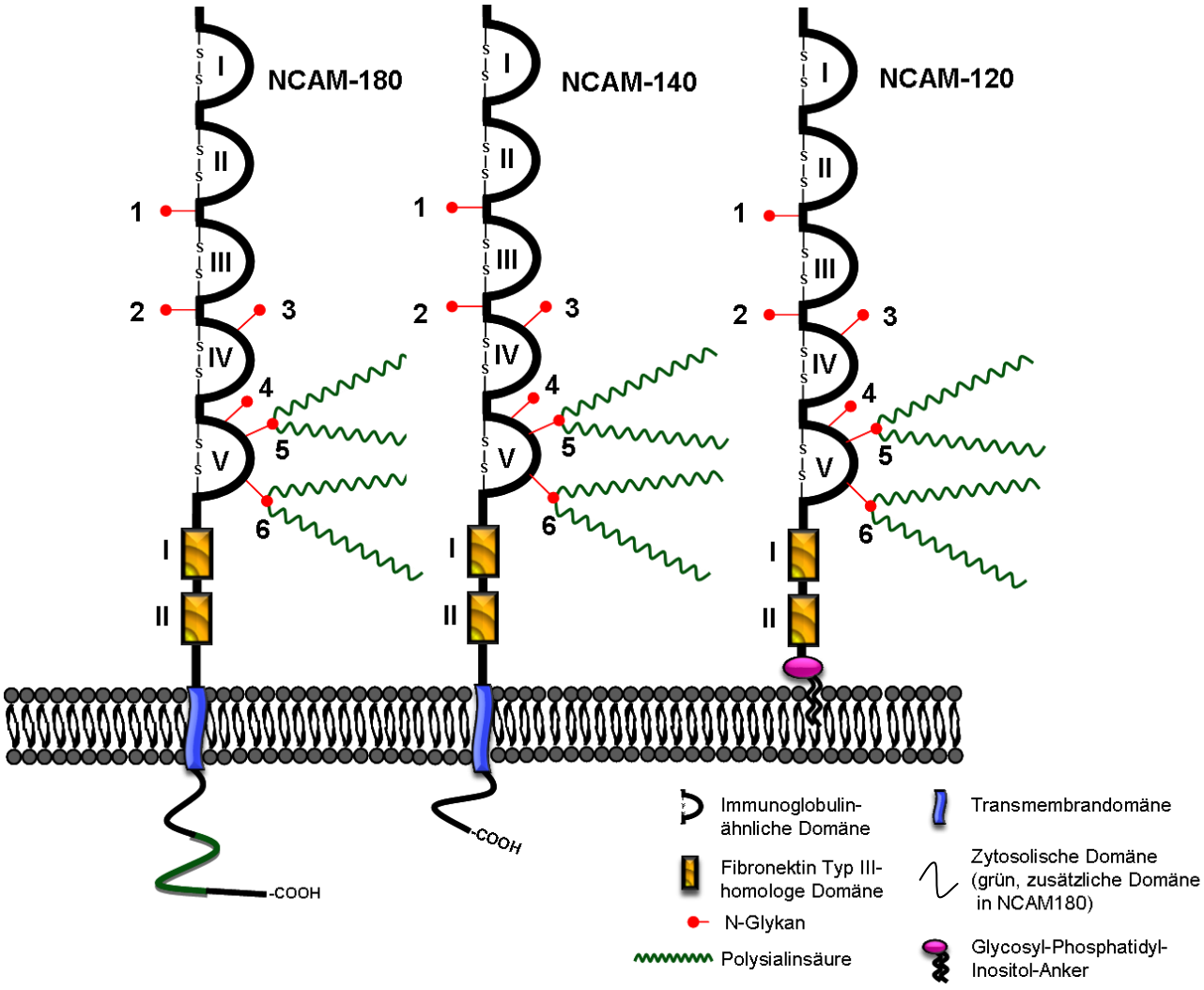


Abbildung 3. Hauptisoformen von poylsialyliertem NCAM (Galuska 2008).
Es sind die drei Hauptisoformen von polysialyliertem NCAM dargestellt. (Darstellung abgewandelt nach Kleene R., *et al.* (Kleene and Schachner 2004)).

1.3.3 Funktion von polysialyliertem NCAM

Eine homophile Bindung zwischen zwei NCAM-Molekülen ist möglich (Rao et al. 1992; Rao et al. 1993), wobei die Ig-ähnlichen Domänen der beiden Moleküle miteinander interagieren. Es wurden verschiedene Interaktionsmöglichkeiten beschrieben. Eine Stabilisierung der Interaktionen kann sowohl durch heterophile Wechselwirkungen (Wechselwirkungen zwischen zwei unterschiedlichen Ig-Domänen) als auch homophile Wechselwirkungen (Wechselwirkungen zwischen zwei identischen Ig-Domänen) erreicht werden (Zhou et al. 1993; Ranheim et al. 1996; Kasper et al. 2000; Atkins et al. 2001; Soroka et al. 2003). Es wird angenommen, dass in Abhängigkeit vom Polysialylierungsgrad des NCAM-Moleküls zwischen den verschiedenen Interaktionsmöglichkeiten gewechselt werden kann. Der Extremfall ist die völlige Unterbindung der homophilen Bindung durch massive NCAM-Polysialylierung (Bruses and Rutishauser 2001; Johnson et al. 2005) (Abbildung 4).
Durch diese Modifikation der Bindungseigenschaften vergrößert sich der interzelluläre Spalt auf mehr als 10 nm. Es resultiert daraus weiterhin eine Störung der durch andere Zelladhäsionsmoleküle (z.B. Cadherine) vermittelten Interaktion der Zelloberflächen (Fujimoto et al. 2001; Yabe et al. 2003; Johnson et al. 2005).
Die Verminderung oder gar Verhinderung stabiler Zell-Zell-Kontakte, sonst vermittelt durch NCAM und andere Zelloberflächenmoleküle, unterstreicht die Wichtigkeit der NCAM-Polysialylierung gerade im Hinblick auf die neonatale Entwicklung. Hierbei sind in erhöhtem Maße Zellwanderung, *axonaler outgrowth* und Plastizität von Synapsen erforderlich, worauf später im Vergleich embryonaler und adulter Gehirne ausführlich eingegangen wird (Muller et al. 1996; Kiss and Rougon 1997; Bonfanti 2006).
NCAM ist auch an der Ausbildung der Markscheiden um die Axone beteiligt. PolySia inhibiert hier als negativer Regulator die erforderliche homophile NCAM-NCAM-Interaktion zwischen dem Axon und der Myelinscheide, was die Myelinisierung erschwert (Charles et al. 2000; Charles et al. 2002; Fewou et al. 2007; Jakovcevski et al. 2007). So verwundert es nicht, dass der Zeitpunkt für den größten PolySia Verlust im Gehirn mit dem Beginn der Myelinisierung koinzidiert (Uzman et al. 1958; Matthieu et al. 1973). In reifen Neuronen, die sich interzellulär permanent durch Synapsen verschaltet haben, wird der Polysialylierungsgrad herunterreguliert (Bruses et al. 2001; Bonfanti 2006). Unpolysialyliertes NCAM stimuliert Neuritenwachstum in geringerem Maße, als dies PolySia-NCAM vermag (Doherty et al. 1990), was nicht schlüssig erscheint, da eine homophile NCAM-Interaktion für die Stimulation eines NCAM-

vermittelten Neuritenwachstums und entsprechende Signaltransduktion erforderlich ist. Versuche mit hochpolysialyliertem NCAM aus Rattenhirn konnten aber zeigen, dass Zellen gerade daran binden (Storms et al. 1994) und so Neuritenwachstum gefördert wird. In diesem Zusammenhang ist wichtig, dass PolySia heterophile Interaktionen von NCAM mit anderen Liganden auch verstärken kann, indem es die homophilen NCAM-NCAM Wechselwirkungen stört bzw. sogar ganz aufhebt (Hinsby et al. 2004).

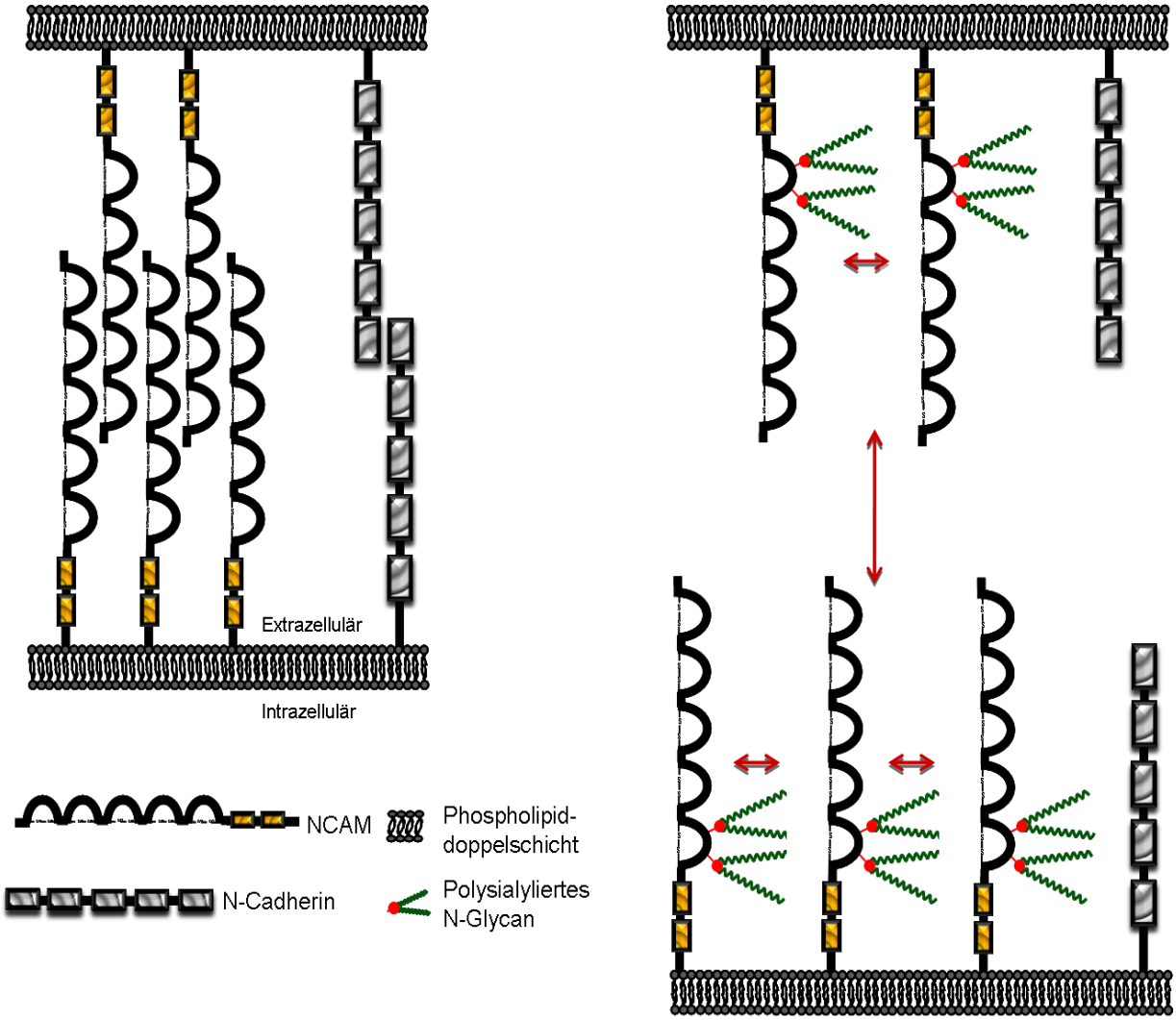


Abbildung 4. Regulation der NCAM-NCAM Wechselwirkung (Galuska 2008).
Dargestellt ist die mögliche Regulation der NCAM-NCAM Wechselwirkung durch NCAM-Polysialylierung und daraus enstehende Veränderung der Zelladhäsion (abgewandelt nach Brusés J.L. und Rutishauser U. (Bruses and Rutishauser 2001)). Das N-Cadherin dient hier als Beispiel für den Einfluss auf andere Zelladhäsionsmoleküle.

Nicht-polysialyliertes NCAM fungiert vermutlicherweise eher als Zelladhäsionsmolekül, während polysialyliertem NCAM mehr die Funktion eines Signal- und Rezeptormoleküls zugeschrieben wird (Kiselyov et al. 2005). PolySia hat auch direkten Einfluss auf andere, vornehmlich mit der neuronalen Entwicklung vergesellschaftete Glutamatrezeptoren. Es wurden Interaktionen mit Domänen des N-Methyl-D-Aspartat Rezeptors (NMDA) und des α-Amino-3-Hydroxy-Methylisoxazole-Propionsäure-Rezeptors (AMPA) beschrieben (Vaithianathan et al. 2004; Hammond et al. 2006). Diese Rezeptoren tragen an der postsynaptischen Membran (über sekundäre Botenstoffe und Proteinveränderungen) zur Ausbildung langanhaltender Potenzierungen der synaptischen Aktivität bei, was wiederum Grundlage für Lernvorgänge ist (Muller et al. 1996). Im Falle des Kationenkanals AMPA führt die Interaktion mit PolySia zu einer Verlängerung von dessen Öffnungszeit.

Eine für Lernvorgänge wichtige Einflussmöglichkeit auf die synaptische Aktivität ist die über längere Zeit anhaltende Steigerung der Signalübertragung an Synapsen, die sogenannte *Long term potentiation* (LTP). Diese ist mit der Zunahme an exzitatorischen postsynaptischen Potentialen gleichzusetzen und experimentell durch hochfrequente elektrische Stimulation auslösbar.

NCAM-Knock-out-Mäuse zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen einen Abfall der *Long term potentiation* in der CA1-Region des Hippocampus (Muller et al. 1996), was auch durch enzymatische Abspaltung von PolySia in Organkulturen von Wildtyp-Mäusen oder Applikation von NCAM-Antikörpern erreicht werden kann (Ronn et al. 1995; Muller et al.1996).

Durch Zugabe von *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) zu Zellkulturen aus Hippocampusgewebe NCAM-defizienter Mäuse kann das *Long term potentation*-Defizit ausgeglichen werden (Muller et al. 2000). BDNF ist auch ausschlaggebend für das Überleben von Neuroblasten. Der Verlust von PolySia schränkt die Lebensdauer und Differenzierungsrate kortikaler Neurone massiv ein (Vutskits et al. 2001). Das lässt vermuten, dass PolySia direkt mit dem BDNF-Rezeptor interagiert, dessen Sensibilität erhöht und so die BDNF-induzierte Signalkaskade beeinflusst (Vutskits et al. 2001). PolySia könnte außerdem die diffusionsbedingte Konzentrationsabnahme bei autokrin sezerniertem BDNF verlangsamen und so eine für die Rezeptorstimulation notwendige minimale Ligandenkonzentration (Schumann et al. 1999) länger aufrechterhalten (Vutskits et al. 2001). Versuche an NCAM-Knock-out Mäusen, woraus ein Verlust an PolySia resultierte, belegen, dass die Anwesenheit von NCAM bzw. PolySia-NCAM für Mäuse nicht lebensnotwendig ist und nur ein gering veränderter Phänotyp resultiert

(Tomasiewicz et al. 1993; Cremer et al. 1994). Auffallend ist jedoch die gesamt reduzierte Hirnmasse und im Speziellen der massiv verkleinerte *Bulbus olfactorius* (Bruses and Rutishauser 2001), kombiniert mit einer Anreicherung von olfaktorischen Vorläuferzellen im Bereich des lateralen Ventrikels (Cremer et al. 1994; Ono et al. 1994; Hu et al. 1996).

Natürlicherweise würden die PolySia-positiven olfaktorischen Vorläuferzellen aus dem Gebiet des lateralen Ventrikels in Ketten dicht hintereinander in den *Bulbus olfactorius* einwandern. Diese als kooperative Strömung bezeichnete Art der Zellmigration benötigt keine Leitstrukturen wie radiale Gliafasern oder Axone, da die Zellen sich gegenseitig als Leitstruktur dienen (Lois et al. 1994; Bruses and Rutishauser 2001). Es wird vermutet, dass polysialyliertes NCAM hier die Regulation der Adhäsion und De-Adhäsion der Zellen übernimmt, die für eine solche Art der Zellwanderung nötig wäre (Ono et al.1994).

Ist die Zielregion erreicht, wird die Kettenformation aufgegeben, die Neurone trennen und differenzieren sich. Für diese Vorgänge ist wiederum keine PolySia notwendig (Hu et al. 1996). Erfolgt eine enzymatische Entferung von PolySia, führt auch dies zu einer geringeren Masse des *Bulbus olfactorius* (Ono et al. 1994), was darauf schliessen lässt, dass PolySia-NCAM und nicht nur NCAM alleine eine entscheidende Bedeutung bei diesen Migrationsprozessen zukommt. Eine weitere feinstrukturelle Auffälligkeit bei NCAM-Knock-out-Mäusen zeigt sich bei im *Gyrus dentatus* des *Hippocampus* entspringenden Moosfasern. Es konnten sowohl eine Abnahme von deren Dichte als auch Defaszikulierungen beobachtet werden (Cremer et al. 1997). Da diese feingeweblichen Unterschiede auch bei nachfolgend beschriebenen Versuchen zu beobachten waren, dient PolySia hier wohl nicht der Modifikation von NCAM, sondern hat andere, die Zellinteraktion beeinflussende Eigenschaften (Weinhold et al. 2005).

Mäuse, bei denen eine Deletion der Polysialyltransferasegene von ST8SiaII und ST8SiaIV durchgeführt wurde, das NCAM-Gen aber intakt blieb, zeigen neben oben genannten Veränderungen noch spezifische Auffälligkeiten. Diese umfassen neben einer Agenesie und Hypoplasie von Nervenbahnen, der hohen Inzidenz mit Ausbildung eines Hydrozephalus auch eine Wachstumsverzögerung und vorzeitigen Tod der Tiere. Geschuldet wird dies wohl einem NCAM-Funktionsgewinn durch die jetzt fehlende Polysialylierung, da bei einer zusätzlichen NCAM-Gendeletion nur die zuvor erwähnten, wohl rein PolySia-abhängigen Defekte auftreten (Weinhold et al. 2005). Dies belegt, welch gewichtige Wirkung die durch Polysialylierung gewährleistete Inhibierung der NCAM-Funktion *in vivo* hat.

Der Fakt, dass Mäuse denen UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine (Schlüsselenzym der Neusynthese von Sialinsäuren) fehlt, bereits als Embryonen versterben, unterstreicht nochmals die funktionelle Wichtigkeit der Sialinsäuren generell (Schwarzkopf et al. 2002).

Wie bereits kurz angesprochen, zeigen sich hohe Konzentrationen von polysialyliertem NCAM während der Embryonalentwicklung. In dieser Phase finden auf höchstem Level Prozesse der Neurogenese, Zellmigration, *axonalem outgrowth* und hoher synaptischer Plastizität in den meisten Teilen des sich entwickelnden Gehirns statt (Rutishauser et al. 1996; Gascon et al. 2007). Die Situation ändert sich im adulten Gehirn. Hier weisen besonders in Lern- und Gedächtnisprozesse involvierte Areale (Becker et al. 1996; O'Connell et al. 1997; Eckhardt et al. 2000; Bendel et al. 2005; Venero et al. 2006), wie auch Bereiche, in denen neuronale Regeneration stattfindet (De Stefano et al. 2001; Hayashi et al. 2001; Iwai et al. 2001), erhöhte Konzentrationen an polysialyliertem NCAM auf.

Die Einbeziehung von PolySia-NCAM in Lernprozesse belegen Verhaltensstudien, bei denen ein Anstieg der Expression bei Ratten nachweisbar ist, die auf Gerüche trainiert wurden und raumbezogene Aufgaben erfüllen mussten (Doyle et al. 1992). Eine Blockade der Lernvorgänge konnte mit Hilfe von in den Hippocampus applizierten NCAM-Antikörpern erreicht werden (Doyle et al. 1992).

Der Aspekt, dass PolySia-NCAM auch an der neuronalen Regeneration beteiligt ist, soll im Folgenden verdeutlicht werden. PolySia-NCAM ist allgemein ein Marker für neuronale Plastizität und Regeneration (Durbec et al. 2001; Kiss et al. 2001; Nguyen et al. 2003), was an der hohen Expression im Hippocampusgewebe gesehen werden kann, welches auch im adulten Gehirn zur Neurogenese und Regeneration von Neuronen befähigt ist (Seki and Arai 1993). Dies kann auch an Arbeiten nachvollzogen werden, bei denen Läsionen des *Gyrus dentatus* (Teil des *Hippocampus*) zu einer erhöhten Expression von PolySia-NCAM führten (Miller et al. 1994; Styren et al. 1994).

Studien des Hippocampusgewebes von an einer Überdosis verstorbenen Heroinsüchtigen zeigen, dass auch von außen zugeführte Noxen eine Auswirkung auf die Expression von PolySia-NCAM haben (Weber et al. 2006). So konnte ein erhöhter Gehalt an PolySia-NCAM auf Neuronen und Gliazellen, im Vergleich zur Kontrollgruppe, nachgewiesen werden. Die Zellzahl blieb jeweils gleich. Dies spricht für einen Versuch, die vom Heroinabusus herrührenden Schäden zu reparieren (Weber et al. 2006), was auch mit der beschriebenen Rolle von PolySia-NCAM für neuronale

Plastizität und Regeneration des adulten Gehirns korreliert. (Cremer et al. 1994; Cremer et al. 1998; Benson et al. 2000; Kiss et al. 2001; Barral-Moran et al. 2003).
Induzierte Expression von PolySia fördert die Gewebeheilung, da zerstörte oder beschädigte Zellen besser ausgetauscht werden können und ein Milieu geschaffen wird, in dem sensible axonale Verbindungen neu enstehen und Neurone neu vernetzt werden können (El Maarouf et al. 2006). Eine mit dem Lebensalter von Ratten rückläufige Reexpression von PolySia-NCAM zeigt sich im Verlauf der Regeneration geschädigter Motoneurone von denervierten Muskelzellen (Olsen et al. 1995).
Nervenzellen auf PolySia-beschichteten Platten zu züchten, welche dann zwischen getrennte Nerven implantiert werden, um so eine Reanastomosierung zu erreichen, ist im Hinblick auf die medizinische Therapie mit Erwartungen verbunden (Haile et al. 2007; Rutishauser et al. 2007; Stark et al. 2007).
Dass eine unkontrolliert hohe oder stark verminderte Polysialylierung von NCAM auch pathologische Auswirkungen haben kann, zeigt der Zusammenhang mit Morbus Alzheimer, bei dem hohe Konzentrationen vorgefunden werden, oder aber Schizophrenie mit stark gedrosselter Expression von PolySia-NCAM (Barbeau et al. 1995; Mikkonen et al. 2001). Interessanterweise wird bei Morbus Alzheimer der Verlust an neuronalen Verbindungen von einer gesteigerten Expression von PolySia-NCAM begleitet (Mikkonen et al. 1999).
Multiple Sklerose, eine Erkrankung, die durch ihren schubweisen Verlauf mit multifokaler Demyelinisierung charakterisiert ist, geht mit einer Re-Expression von PolySia-NCAM einher. Stattfindende Remyelinisierungen sind meist unvollständig, was auf das erneute Vorhandensein von PolySia-NCAM auf demyelinisierten Axonen zurückzuführen sein könnte (Charles et al. 2002).
Auch bei der Pathogenese von neoplastischer Metastasierung kommt PolySia-NCAM eine Bedeutung zu, da bei hoch malignen neuroendokrinen Tumoren eine Korrelation zwischen dem Gehalt an polysialyliertem NCAM und dem Metastasierungspotenzial besteht (Roth et al. 1988; Figarella-Branger et al. 1990; Moolenaar et al. 1990; Gluer et al. 1998; Gluer et al. 1998; Daniel et al. 2000; Daniel et al. 2001; Cheung et al. 2006). Folge der Polysialylierung ist die Störung bzw. Aufhebung von Zell-Zell-Kontakten, woraus eine verringerte Adhäsion resultiert und sich einzelne Zellen aus dem Zellverband lösen können.
Des weiteren tritt eine Art *„Immune escape“*-Phänomen auf, da PolySia wahrscheinlich tumorspezifische Antigene maskiert und den Zugriff der körpereigenen Abwehr unterbindet. Die zur Tarnung verwendeten körpereigenen Strukturen könnten als neuer

innovativer Therapieansatz genutzt werden, um speziell polysialylierte maligne Zellen für das Immunsystem sichtbar zu machen und abzutöten. Hierauf soll, im nächsten Abschnitt, noch näher eingegangen werden.

Wie bereits erwähnt, ist PolySia, abgesehen von Hirnregionen mit persistierender neuronaler Plastizität, im vollständig entwickelten Orgnismus nahezu abwesend.

PolySia wird erneut bei verschiedenen soliden Tumoren reexprimiert, unter anderem beim Neuroblastom, Glioblastoma multiforme, Astrozytomen, Rhabdomyosarkom, nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (*NSCLC*), kleinzelligem Lungenkarzinom (*SCLC*), als auch bei Myelomen und bei akuter myeloischer Leukämie (Patel et al. 1989; Bourne et al. 1991; Ikushima et al. 1991; Kibbelaar et al. 1991; Mechtersheimer et al. 1991; Molenaar et al. 1998; Tassone et al. 2004; Suzuki et al. 2005; Korja et al. 2009; Amoureux et al. 2010), bei denen es an NCAM gebunden ist. In diesen Geweben ist es nach Differenzierung und vor maligner Entartung in nur geringem Maße vorhanden (Lipinski et al. 1987; Figarella-Branger et al. 1990; Moolenaar et al. 1990; Gluer et al. 1998; Tanaka et al. 2000; Korja et al. 2009) und scheint gerade bei soliden Tumoren das Metastasierungsverhalten und die Zellmigration zu beeinflussen (Moolenaar et al. 1990; Tanaka et al. 2000; Daniel et al. 2001; Cheung et al. 2006; Korja et al. 2009; Amoureux et al. 2010). Des weiteren ist der Nachweis von PolySia mit schlechter klinischer Prognose assoziiert und korreliert mit aggressivem Wachstum und von allem Invasivität des Tumors (Falconer et al. 2012). Dies bestätigen Versuche an Patienten mit Gliomen, bei denen gezeigt werden konnte, dass PolySia häufiger bei diffus wachsenden Astrozytomen gefunden wurde, welche sich ausgedehnt ausbreiten (Suzuki et al. 2005). C6-Gliomzellen, die mit Polysialintranferase (ST8SiaII oder ST8SiaIV) transfiziert wurden und jetzt in der Lage waren, PolySia zu exprimieren, zeigten in erhöhtem Maße Invasion in den Corpus callosum nach Inokulation der Zellen ins Gehirn (Suzuki et al. 2005). Wurde PolySia jedoch von Neuroblastomzellen *in vitro* entfernt, konnte eine signifikante Verminderung der Proliferationsrate bei Neuroblastomzellen beobachtet werden (Hildebrandt et al. 1998; Seidenfaden et al. 2003; Korja et al. 2009).

Weiterhin ist beschrieben, dass PolySia die Mobilität von *SCLC* Zellen steigert und ihnen ein Ablösen aus dem Tumorzellverband ermöglicht (Scheidegger et al. 1994).

Beim *NSCLC* korrelierte die PolySia Expression sowohl mit einer nodalen als auch Fernmetastasierung, nicht jedoch mit der lokalen Ausdehnung des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms. Dies unterstreicht wiederum die Polysialylierung als Erleichterung

für Metastasierung (Tanaka et al. 2000). In einer späteren retrospektiven Arbeit konnte für die PolySia-positiven Lungentumore eine schlechtere Prognose sowie 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten herausgearbeitet werden. Als wichtiger Aspekt wird hier auch der mögliche Einfluss auf bestehende Therapiealgorithmen erwähnt, da selbst für *p-stage 1* und PolySia-positive *NSCLC* eine zusätzliche adjuvante Therapie vorgeschlagen (Tanaka et al. 2001) wird.

Bei an Glioblastoma multiforme leidenden Patienten, ist der Nachweis von PolySia-NCAM als ein unabhängiger negativer Prädiktor für das Überleben herausgearbeitet worden. PolySia-NCAM kann als neuer Biomarker für die Prognoseinschätzung herangezogen werden. Eine weitere klinische Einsatzmöglichkeit wäre die Beurteilung des Therapieansprechens (Amoureux et al. 2010). Neue Ansätze verfolgen eine Impfung von Patienten, welche an kleinzelligen Lungentumoren leiden, mit an Hämocyanin konjugierter PolySia, um so eine Immunantwort und konsekutiv durch Antikörperinteraktion Tumorzelllyse zu erreichen (Lee et al. 2004). Eine andere therapeutische Option wäre die selektive Hemmung der die PolySia-NCAM Biosynthese katalysierenden Polysialintransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV (unter 1.4 näher beschrieben), um die Tumorinvasion und Metastasierung zu begrenzen. Versuche an Tumorzellen nach *knock-down* der Polysialintransferasen zeigen, dass Vorgänge, die mit Tumorzelldisseminierung assoziiert sind, verhindert werden (Falconer et al. 2012). Vorherrschende Polysialintransferase in Tumoren ist ST8SiaII. Arbeiten von Yousef et al. zeigen, dass es mittels Cytidin Monophosphat, einem kompetitiven Inhibitor von ST8SiaII, zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der PolySia-Expression auf Tumorzellen und Verminderung von deren Migration kommt (Yousef et al. 2013); ein weiteres medikamentös beeinflussbares Ziel, um dem kritischen Mechanismus der Tumorzelldissemination bei metastasierenden Karzinomen entgegenzuwirken.

Wenn auch die NCAM-Expression nicht nur auf Tumorzellen begrenzt ist, ist die höhere Expression doch im Rahmen einer NCAM-Antikörpertherapie zur Tumorbekämpfung (hier benutzt bei Lungentumoren) interessant (Korja et al. 2009). Es gibt bereits Experimente mit humanisierten Varianten des monokonalen Mäuse anti-NCAM-Antikörpers, genannt huN901-DM1 (Roguska 1994), die die Idee einer Nutzung von Anti-NCAM Antikörpern unterstützen (Tassone et al. 2004; Ishitsuka et al. 2008).

Säugerzellen haben *in vitro* und *in vivo* die Fähigkeit, sowohl das natürlich vorkommende N-Acetylmannosamin in Neu5Ac als auch künstlich synthetisierte Vorläufermoleküle (N-Popyl- und N-Butylmannosamin) umzuwandeln (Keppler et al.

2001; Prescher et al. 2004; Gagiannis et al. 2007). So hergestellte N-Popyl- und N-Butylneuraminsäure wird wie Neu5Ac zur Polysialinsäuresynthese eingesetzt, woraus ein Heteropolymer aus natürlichen und artifiziellen Sialinsäuren resultiert (Charter et al. 2000; Liu et al. 2000; Mahal et al. 2001; Pon et al. 2007). Verwendet man diese Heteropolymere als körperfremde Antigene, können diese mit Hilfe spezifisch hergestellter Antikörper erkannt und demaskiert werden. So kann eine spezifische Immunreaktion gegen Tumorzellen induziert werden. Da jedoch die Reihenfolge der Sialinsäuren in der Kette keinem bestimmten Muster folgt, ist bei Einsatz künstlicher und natürlicher Sialinsäurederivate eine theoretisch unendliche Anzahl von verschiedenen Abfolgen möglich (King et al. 2007). Wird jetzt die Präsenz und Quantität der entstandenen Homo- und Heteropolymere mit Hilfe von Antikörpern bestimmt, können Artefakte, welche aus unterschiedlichen Affinitäten der Antikörper gegenüber den variierenden Epitopen (abgewandelte Reihenfolgen der natürlichen und künstlichen Sialinsäuren) resultieren, nicht ausgeschlossen werden. Zur exakten Bestimmung der Position und Zahl der eingebauten artifiziellen Neuraminsäurederviate wurde noch keine Methode etabliert. Vor allem alveoläre Epithelzellen exprimieren während der Reifung der Lunge polysialyliertes NCAM (Lackie et al. 1994). Ein Nachweis nach der Geburt fehlte bislang. Im Gewebe adulter humaner, entsprechend voll entwickelter Lungen konnte aktuell die transmembranäre Isoform NCAM-140 als polysialyliertes Glykoprotein identifiziert werden (Ulm et al. 2013). Hierbei zeigten sich Kettenlängen mit mehr als 45 Sialinsäureresten (Ulm et al. 2013).

Bei an chronisch obstruktiver Lungenkrankheit (COPD) leidenden Patienten, wiesen die untersuchten Proben erhöhte Mengen an PolySia auf, was gleichzeitig mit gesteigerter mRNA-Konzentration von NCAM und der Polysialyltransferase ST8SiaII korrelierte (Ulm et al. 2013). Der Nachweis der Isoform NCAM-110 an COPD-Lungenlysaten konnte mit der; bei dieser mit chronischen inflammatorischen Prozessen einhergehenden Erkrankung, dauerhaft erhöhten IL-1ß Konzentration in Zusammenhang gebracht werden (Rusznak et al. 2000; Doz et al. 2008; Churg et al. 2012). Zellkulturversuche hierzu ergaben nach Stimulation der Zellen mit IL-1ß oder Lipopolysaccharid eine Sekretion von polysialyliertem NCAM-110 in den Kulturüberstand (Ulm et al. 2013). Die Freisetzung von polysialyliertem NCAM-110 durch inflammatorische Mediatoren legt die Beteiligung des Glykoproteins an immunologischen Prozessen der Lunge nahe. Studien ergaben einen Einfluss von PolySia auf den unter dem Begriff NET (*neurophil extracellular traps*) (Brinkmann et al. 2004) bekannt gewordenen Abwehrmechanismus gegen Pathogene. Bei diesem

Mechanismus wird ein aus DNA und Histonen, kombiniert mit einer fibrillären Matrix, bestehendes antimikrobielles Netz freigesetzt, dessen Zytotoxizität jedoch nachteilig nicht nur auf Pathogene begrenzt ist, sondern sich ebenso gegen körpereigene Zellen wendet (Fuchs et al. 2011; Saffarzadeh et al. 2012).

Diese ungerichtete Zytotoxizität belegen unter anderem Krankheiten wie tiefe Venenthrombose, zystische Fibrose, Sepsis, Lupus erythematodes und transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI), die mit erhöhter Bildung von NET/extrazellulär pathologischen Konzentrationen von Nukleosomen und Histonen in Verbindung gebracht werden (Marcos et al. 2010; Brill et al. 2012; Caudrillier et al. 2012; Fuchs et al. 2012; Knight et al. 2012). Zellen, die zuvor mit IL-1ß oder Lipopolysaccharid stimuliert worden waren, also vermehrt polysialyliertes NCAM-110 sezernierten, wiesen eine signifikant erhöhte Resistenz gegenüber den zytotoxischen Histonen auf (Ulm et al. 2013), die bei nicht stimulierten Zellen unvermindert bestand (Saffarzadeh et al. 2012). Der protektive Effekt konnte durch enzymatischen Verdau der Polysialinsäuren mittels EndoneuramininaseN (EndoN) zunichte gemacht werden, was auf einen PolySia abhängigen Mechanismus schließen lässt (Ulm et al. 2013). Potenziert werden konnte der zytoprotektive Effekt nach Zugabe von ManAc (Vorläufer von Neu5Ac) zum Zellkulturmedium, mit konsekutiver Steigerung der PolySia-Menge pro NCAM-Molekül, da der Polysialylierungsgrad von NCAM von der intrazellulären Neu5Ac-Konzentration abhängt (Bork et al. 2005; Ulm et al. 2013).

Eine ähnliche protektive Funktion könnten polysialylierte Glykoproteine im Ejakulat aufweisen, da nach Insemination im weiblichen Genitaltrakt NET gebildet und Spermien gebunden werden (Alghamdi et al. 2005). Ein Einsatz wäre im Rahmen der Reproduktionsmedizin denkbar, um die Anzahl vitaler befruchtungsfähiger Spermien zu erhöhen. Auch können therapeutische Ansätze verfolgt werden, um bei oben genannten Erkrankungen, den im Übermaß vorhandenen zytotoxischen Nukleosomen und Histonen mit Erhöhung der PolySia-Konzentration entgegenzuwirken (Galuska 2013).

1.4 Polysialyltransferasen

1.4.1 Polysialylierung von NCAM durch ST8SiaII und ST8SiaIV

Sowohl ST8SiaII als auch ST8SiaIV können NCAM polysialylieren (Eckhardt et al. 1995; Yoshida et al. 1995; Muhlenhoff et al. 1996; Nakayama et al. 1996). Es konnte

nachgewiesen werden, dass in PolySia-positiven Hirnarealen immer mindestens eines der beiden Enzyme präsent war (Seki and Arai 1993; Kurosawa et al. 1997; Phillips et al. 1997; Wood et al. 1997; Hildebrandt et al. 1998; Ong et al. 1998). In Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium des Gewebes kann das Verhältnis von ST8SiaII zu ST8SiaIV deutlich variieren (Angata et al. 1997; Ong et al. 1998). ST8SiaII herrscht während der Entwicklungsphase des Gehirns vor, die Expression wird nach der Geburt gedrosselt und es kann dann im adulten Gewebe ST8SiaIV in höherer Konzentration gefunden werden.

ST8SiaIV wird zwar auch während der Embryonal- und Postnatalperiode gebildet, aber die Drosselung der Expression von ST8SiaIV ist im Vergleich zu der von ST8SiaII geringer ausgeprägt, woraus die höhere Konzentration im adulten Gewebe resultiert.

Erklärt wird diese Beobachtung durch die unterschiedliche und voneinander unabhängige Genexpression von ST8SiaII und ST8SiaIV, was aus der unterschiedlichen regionalen Verteilung, der Allellokalisation auf verschiedenen Chromosomen und Unterschieden in der Promotorregionsequenz geschlossen werden kann (Yoshida et al. 1996; Eckhardt et al. 1998; Takashima et al. 1998; Seidenfaden et al. 2000).

Die Entfernung der mit polysialylierten N-Glykanen besetzten Ig-ähnlichen Domäne V von NCAM und auch die Entfernung der ersten Fibronektin Typ III-homologen Domäne bzw. Ig-ähnlichen Domäne IV führten zu einer Unfähigkeit von ST8SiaII und ST8SiaIV NCAM zu polysialylieren. Das spricht für eine entscheidende Rolle der Protein-Protein-Interaktion zwischen NCAM und der Polysialyltransferase für einen stabilen Enzym-Akzeptor-Komplex (Abbildung 5) (Nelson et al. 1995; Angata 2002; Close et al. 2003).

Als Interaktionsposition konnten drei saure Aminosäuren innerhalb der ersten Fibronektin Typ III-homologen Domäne identifiziert werden (Mendiratta et al. 2005).

Nur eine Reduktion der Polysialylierung wurde durch Austausch der sauren gegen neutrale Aminosäuren erreicht, was als Hinweis für weitere, den Komplex stabilisierende Interaktionsbereiche gedeutet wurde. Diese Bereiche könnten in der ersten Fibronektin Typ III-homologen Domäne oder auch in der Ig-ähnlichen Domäne IV lokalisiert sein.

Die Aminosäuresequenzen von NCAM und die der Polysialyltransferasen weisen keine homologen Bereiche auf, dennoch sind sowohl ST8SiaII als auch ST8SiaIV *in vitro* in der Lage NCAM und auch sich selber zu autopolysialylieren (Close et al. 1998). Neuere Studien an Spermatozoen von Säugern (Simon et al. 2013) beweisen erstmals, dass im Falle von ST8SiaII eine Polysialyltransferase nicht nur unter artifiziellen

Bedinungen *in vitro* oder *in cellulo* polysialyliert werden kann (Muhlenhoff et al. 1996; Close and Colley 1998; Close et al. 2000; Close et al. 2001; Simon et al. 2013).
Diese posttranslationale Modifikation findet auch unter physiologischen Bedingungen statt und ist somit auch möglicherweise *in vivo* von Bedeutung (Galuska 2013).

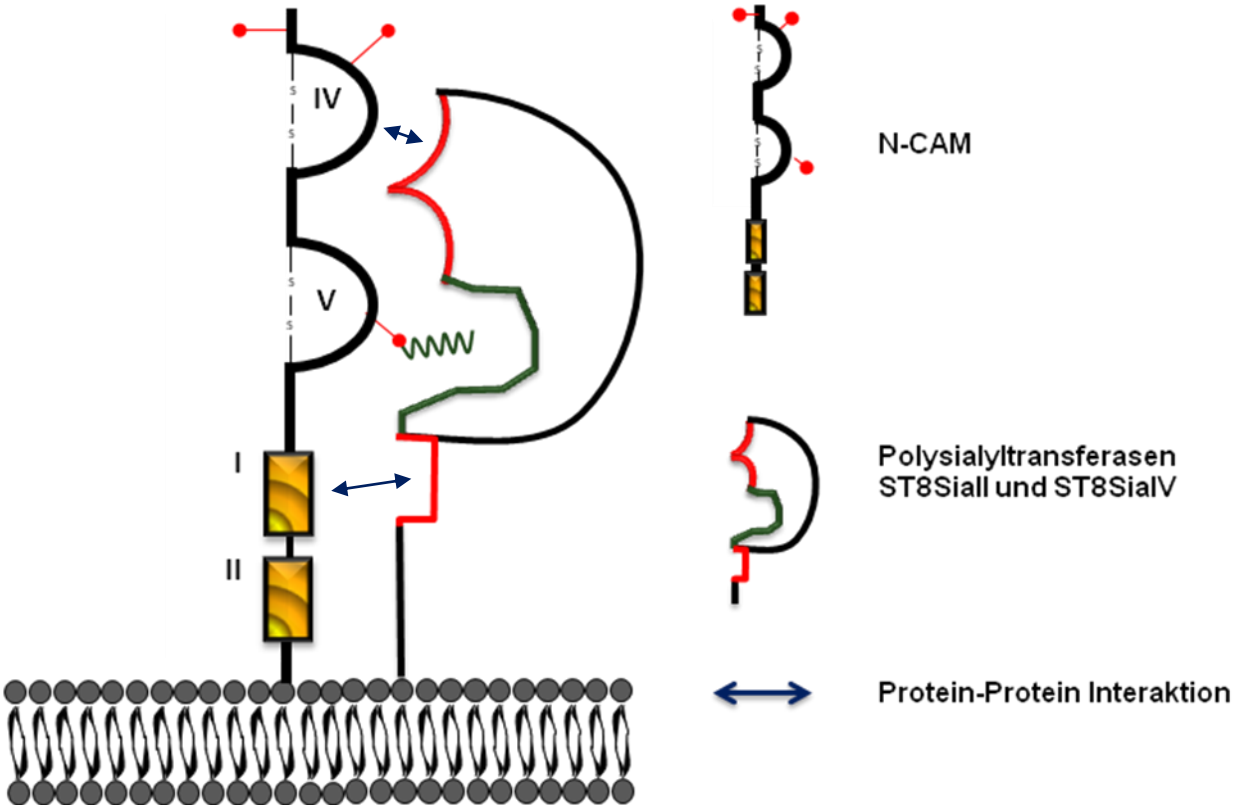


Abbildung 5. Interaktion der Polysialyltransferasen mit NCAM.
Dargestellt ist die Interaktion der Polysialyltransferasen mit NCAM. Die Protein-Protein-Interaktionen von ST8SiaII und ST8SiaIV mit der ersten Fibronektin Typ III-homologen Domäne und der Ig-ähnlichen Domäne IV sind mit blauen Pfeilen dargestellt (abgewandelt nach Angata K., *et al.*) aus (Angata et al. 2004).

Welche Kettenlängen und wie viele PolySia-Ketten pro N-Glykan, im Falle von NCAM, synthetisiert werden können zeigen *in vitro* Studien, bei denen für ST8SiaIV Kettenlängen mit bis zu ~60 Sialinsäureresten und für ST8SiaII PolySia-Ketten mit bis zu ~40 Sialinsäuren detektiert wurden. Im Hinblick auf die Gesamtanzahl der synthetisierten PolySia-Ketten und den Anteil an langen Ketten dominiert ST8SiaIV (Angata et al. 1998). ST8SiaIV war in der Lage, die von ST8SiaII synthetisierten PolySia-Ketten zu verlängern, was ST8SiaII umgekehrt nicht vermag (Angata et al.

2002), und auch von ST8SiaIII oligosialylierte N-Glykane von NCAM stark zu verlängern, was für eine Kooperation der beiden Polysialyltransferasen spricht (Angata et al. 1998) ST8SiaII nur in geringem Ausmaß möglich war (Angata et al. 1998).

Die Anwesenheit beider Enzyme erhöht den Polysialylierungsgrad von NCAM, was für. Damit könnte die höhere Expression der beiden Enzyme während der embryonalen und perinatalen Phase erklärt werden, in der die höchsten Konzentrationen an PolySia-NCAM nachgewiesen werden (Angata et al. 2003).
Aktuellere *in vivo* Untersuchungen von ST8SiaII und ST8SiaIV ergaben neue und teilweise andere, jedoch auch oben aufgeführte Ergebnisse unterstützende Daten. So konnten Galuska et. al. mit Versuchen an Mäusegehirnen, die sich in der Zahl der funktionsfähigen Polysialyltransferase-Allele unterschieden, eine Abweichung der Gesamtmenge an PolySia, der Kettenlängenverteilung (kurz, mittel, lang), dem Verhältnis von PolySia-NCAM zu nonPolySia-NCAM und der Menge an PolySia pro NCAM-Molekül darstellen (Galuska et al. 2006). Es zeigt sich, dass in ST8SiaII-Knock-out-Gehirnen die Gesamtmenge an PolySia um 39% reduziert ist und bis zu 45% von NCAM nicht polysialyliert wird, bei nur einem funktionsfähigen ST8SiaII-Allel jedoch eine NCAM Polysialylierung von > 90% erreicht wird. Bei ST8SiaIV-Knock-out Gehirnen bleibt die Gesamtmenge an PolySia gleich und auch die Rate an polysialyliertem NCAM variiert nicht (Galuska et al. 2006). ST8SiaII hat demnach eine höhere Polysialylierungskapazität, was auch gut zu der Tatsache passt, dass ST8SiaII in dem sich entwickelnden Gehirn vorherrscht, wo bekanntermaßen viel PolySia synthetisiert wird. Im adulten Gehirn ist wiederum ST8SiaIV das dominante Enzym, wobei die Expression von PolySia-NCAM dort jedoch auf wenige Hirnareale beschränkt ist (Angata et al. 1997; Hildebrandt et al. 1998; Ong et al. 1998). Die Ergebnisse lassen auch die Fähigkeit der Polysialyltransferasen erkennen, bis zu einem bestimmten Ausmaß den Verlust der anderen kompensieren zu können, wobei ST8SiaII mehr auszugleichen vermag (Galuska et al. 2006).
Diese Erkenntnis deckt sich auch mit dem nur mild veränderten Phänotyp bei Mäusen, denen ein Gen für eine Polysialyltransferase fehlt (Eckhardt et al. 2000; Angata et al. 2004). Weitere Arbeiten zeigen Unterschiede zwischen *in vivo* und *in vitro* Situationen. Während *in vitro* ST8SiaIV längere PolySia-Ketten und möglicherweise auch eine höhere Kettenzahl als ST8SiaII synthetisiert (Kitazume-Kawaguchi et al. 2001; Angata et al. 2002), wichen *in vivo* die PolySia-Ketten in der Art voneinander ab, dass ST8SiaIV alleine einen höheren Prozentsatz an kurzkettigen PolySia-Ketten produziert

und Hirne nur mit ST8SiaII einen geringeren Gehalt an Ketten mit > 35 Sialinsäureresten haben. Die größte gefundene Kette war mit etwa 90 Sialinsäureresten jedoch bei beiden Polysialintransferasen gleich (Galuska 2008).
Übereinstimmungen finden sich in Bezug auf die bevorzugte Glykosylierungsstelle, da beide Polysialintransferasen auch *in vivo* eine höhere Affinität zur sechsten N-Glykosylierungsstelle aufweisen, was sich in in einer größeren Menge transferierter Sialinsäurereste ausdrückt. Zudem wurde ein synergistischer Effekt der beiden Enzyme bestätigt, da an der fünften N-Glykosylierungsstelle bei Anwesenheit beider Transferasen ein höherer Gehalt an längeren PolySia-Ketten resultiert, als wenn ein Enzym alleine agiert (Galuska 2008).

1.5 Methoden zur Charakterisierung von Di-/Oligo- und PolySia

Zum qualitativen und quantitativen Nachweis sowie zur strukturellen Charakterisierung von Di-/Oligo- und PolySia fand neben Antikörpern vor allem die milde 1,2-Diamino-4,5-Methylenedioxybenzene Markierung (Inoue et al. 2003) Anwendung.
DMB, ein α-Ketosäuren spezifisches Reagenz (Hara et al. 1987), dient der Fluoreszenzmarkierung und nachfolgender Auftrennung in der HPLC mit Fluoreszenzdetektion. Bei dieser analytischen Methode werden unter schwach sauren Bedingungen die Oligo- und PolySia-Ketten vom Glykokonjugat abgespalten (Hydrolyse) und dann am reduzierenden Ende, welches erst durch die Abspaltung frei wird, mit DMB markiert (Abbildung 6).
So sichtbar gemachte Ketten können nach Anzahl der Sialinsäuren mittels Anionenaustauscherchromatographie aufgetrennt werden. Somit kann sowohl die Kettenlänge bestimmt und eine Quantifizierung ermöglicht als auch der Nachweis für das bloße Vorhandensein von Oligo- und PolySia erbracht werden (Inoue et al. 2001). Eine weitere Option ist die Detektion verschiedener PolySia-Komponenten, welche mit Hilfe von definierten Standards anhand unterschiedlicher Retentionszeiten voneinander abgegrenzt werden können (Lin et al. 1999).
Nachteilig wirken sich die sauren Bedingungen aus, die sowohl für die Abspaltung als auch die Fluoreszenzmarkierung erforderlich sind, da zum Einen PolySia laktonisieren kann und es zum Anderen zur Spaltung interner Verknüpfungen kommen kann, woraus eine Kettenverkürzung resultieren würde.

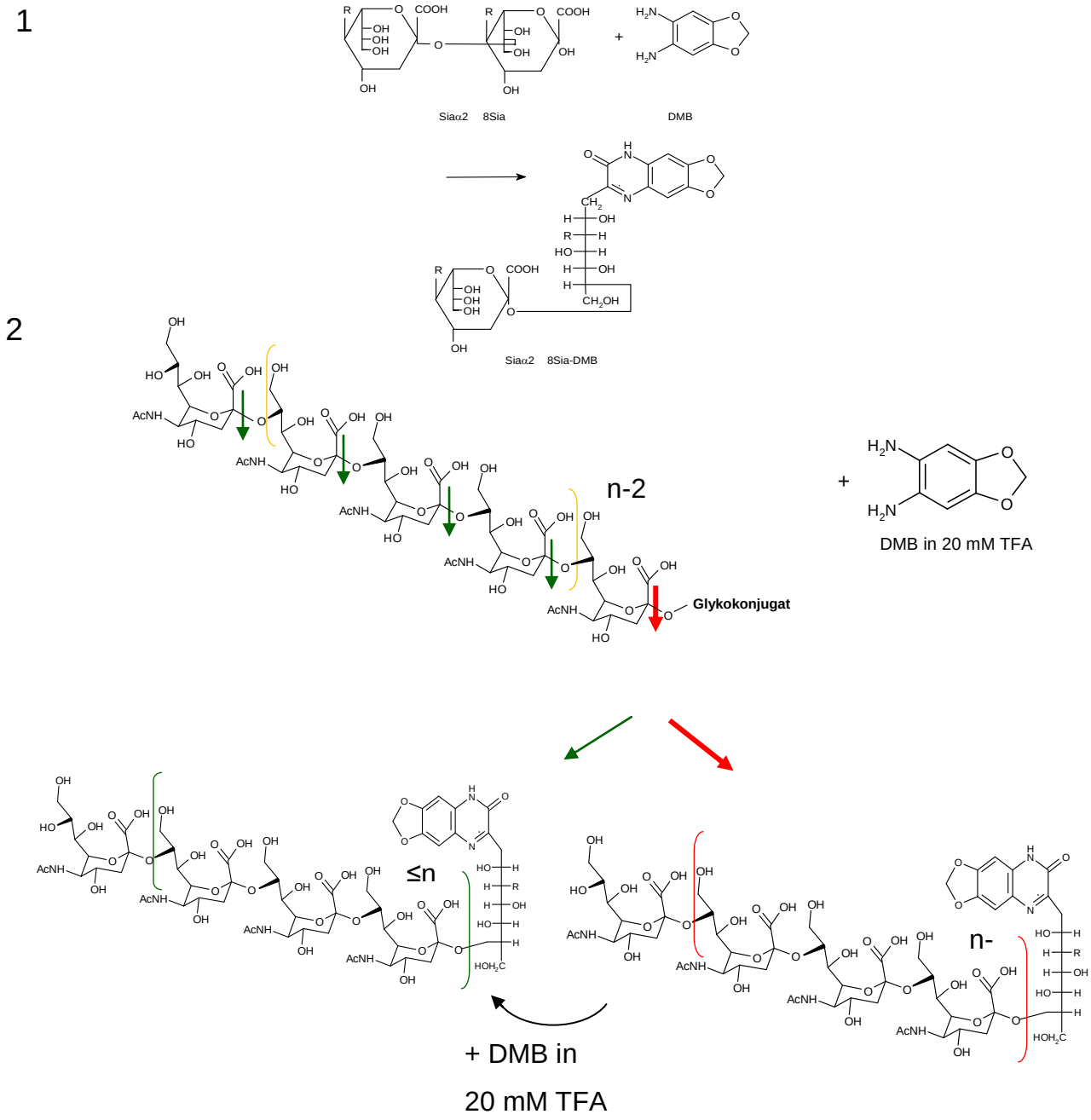


Abbildung 6. Schema der DMB-Markierung.

Dargestellt ist die (1) DMB-Derivatisierung (2) DMB-Markierung von Glykokonjugat gebundener Oligo- und PolySia. Die dickeren roten Pfeile (2) deuten auf eine präferentiell ablaufende chemische Reaktion hin, wohingegen die grünen Pfeile auf Nebenreaktionen hinweisen, die zur Kettenverkürzung führen können (abgewandelt nach Inoue S. and Inoue Y.) aus (Inoue and Inoue 2003).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Polysialylierung von NCAM verschiedener Gewebe humanen und tierischen Ursprungs war Gegenstand intensiver Forschung. Die bisherigen Ergebnisse belegen die Notwendigkeit dieser posttranslationalen Modifikation für die regelrechte Entwicklung und Regeneration des Gehirns wie auch neuronale Plastizität.

Auch bei der Pathogenese von neoplastischer Metastasierung kommt PolySia-NCAM eine Bedeutung zu, da bei malignen Tumoren eine Korrelation zwischen dem Gehalt an polysialyliertem NCAM und dem Metastasierungspotenzial besteht. Mit dieser Arbeit sollen Methoden zur *in situ* Charakterisierung der Polysialylierung des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM evaluiert werden.

Ziel war es darzustellen, ob und in welchem Umfang, mit welchem Materialaufwand und gerade auch im Hinblick auf formalinfixierte Gewebe überhaupt ein Nachweis des Polysialylierungsgrades mittels chromatographischer Methoden gelingt.

Im Rahmen der Forschung über neoplastisches Metastasierungsverhalten könnten weitere dezidierte Erkenntnisse gewonnen werden und neue Biomarker auch für verschiedene andere Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Multiple Sklerose entwickelt werden. Die Forschungsbemühungen stünden dann im Zeichen der klinischen Prognoseeinschätzung und auch Ausarbeitung neuer Therapieansätze mit möglicherweise großem Einfluss auf bestehende Therapiealgorithmen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, in p.a. Qualität von Fluka (Seelze, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Die Laborgase Argon [5,0], Helium [4.6] und Stickstoff [5.0] [Reinheitsgrad in Klammern] von Air Liquide (Düsseldorf, Deutschland) Das verwendete Wasser wurde mit einer Elix UV5 Anlage vorgereinigt und durch das Milli-Q Synthesis A10-System für analytische Zwecke rein aufgearbeitet (beide Millipore, Billerca, USA).

2.2 Biologische Materialien

2.2.1 Zellkulturen

Humane Neuroblastomzelllinien, LAN-1, LAN-5 und SH-SY5Y wurden bei 37 °C ü.N. und 10% CO2 in RPMI-Medium kultiviert, welches 10% fetales Rinderserum und 2 mM L-Glutamin enthielt. Biochrom (Berlin, Deutschland).

2.2.2 Tiere

TH-MYCN-Mäuse (strain 129X1/SvJ-Tg(*TH-MYCN*)41Waw) vom *Mouse Models of Human Cancer Consortium* (MMHCC) – *National Cancer Institute* (NCI-Frederick, USA) (Hackett et al. 2003). Die Mäuse wurden getötet, sobald ein Tumor palpabel wurde, anschließend erfolgte die Resektion der Tumore und Schockgefrierung mit flüssigem Stickstoff sowie Aufbewahrung bei minus 80 °C. Für die Analysen wurden zudem, nach gleichem Verfahren präparierte, Gehirne von Wild-Typ-Mäusen verwendet Die Gewebe wurden von der Arbeitsgruppe Gerardy-Schahn der Medizinischen Hochschule Hannover bereitgestellt.

2.3 Aufarbeitung der Hirngewebeproben

2.3.1 Gefriertrocknung für HPLC-Analyse

Das gesamte Gehirn wurde lyophilisiert. Zur Erleichterung der Gefriertrocknung wurde das Gewebe mit dem Skalpell kleingeschnitten und dabei die Skalpellklinge Nr. 21 (Feather Surgical, Osaka, Japan), nach Zuschnitt eines Areals sofort ausgetauscht. Die Proben wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann gefriergetrocknet. Lyophilisiert wurden die Proben bei 4 °C ü.N. im Christ Alpha 1-4 Gefriertrockner (Bosch Institute, Camperdown, NSW Australien) in 2 ml Eppendorf-Gefäßen (Eppendorf) und anschließend teilweise mit einem Achatmörser (Roth) kleingerieben, welcher nach jedem Arbeitsschritt mit Ethanol [70 %] gereinigt wurde. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei minus 20 °C gelagert.

2.4 HPLC-Analyse

2.4.1 Verwendete Puffer:

DMB-Puffer:

31,34 mg 0,018 M Natriumhydrosulfit $Na_2S_2O_4$ (Sigma-Aldrich)
+ 700,72 µl 1 M ß-Mercaptoethanol C_2H_6OS (Merck)
+ 30,82 µl 0,04 M TFA $C_2HF_3O_2$ (Merck)
+ 1,22 mg 0,0054M DMB -1,2-Diamino-4,5- methylenedioxybenzene (Dojindo)

Markierungspuffer:

50 µl 1 M Tris/HCl [pH7,4]
+ 500 µl Triton X- 100reduziert [10 %ig] (Sigma)
+ 4450 µl Aqua dest.

2.4.2 Vorbereitung der Proben

2.4.2.1 Vorbereitung des in flüssigem Stickstoff gefrorenen Gewebes

Chloroform-Methanol-Extraktion

Das Hirngewebe wurde über Nacht bei 4 °C im Christ Alpha 1-4 Gefriertrockner (Bosch Institute, Camperdown, NSW Australien) lyophilisiert und anschließend mit einem Glasstab kleingerieben. Danach wurden 500 µl 50 mM Tris HCl pH 8,0 zugegeben und die Proben gemixt. Es folgte die Behandlung des Ansatzes mit dem *Cell disruptor* Ultraschallstab (15-30 Stöße). Anschließend gaben wir 1000 µl Chloroform-Methanol in die Eppendorfgefäße und schwenkten diese leicht. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt bei 17380 g (RCF) in einer Universal 32 R Zentrifuge (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) für 20 min bei 4 °C, der Überstand wurde vom Pellet mit der Pipette abgesaugt und 500 µl Aqua dest. wurden zugegeben. Wiederum wurde das Material mit dem *Cell disruptor* Ultraschallstab (15-30 Stöße) bearbeitet und 1000 µl Chloroform-Methanol wurden unter leichtem Schwenken zugegeben. Der oben erwähnte Zentrifugationsschritt sowie das Absaugen des Überstandes wurden wiederholt. Hiernach fügten wir 500 µl 85% Ethanol (bei minus 20 °C gelagert) zu und unterzogen die Proben wiederum genanntem Prozedere mit dem Ultraschallstab. Zum Schluss wurden die Proben im Vakuum-Zentrifugal-Verdampfer (Jouan RC 10.22 „*Speed Vac*“) 60 min trockengezogen. Während sämtlicher Arbeitsschritte hielten wir die Eppendorfgefäße auf Eis.

2.4.2.2 Vorbereitung des formalinfixierten Gewebes

Das Mäusegehirn wurde 12 Tage in 4% Formalin konserviert. Das Gewebe wurde über Nacht bei 4 °C im Christ Alpha 1-4 Gefriertrockner (Bosch Institute, Camperdown, NSW Australien) lyophilisiert und anschließend mit einem Glasstab kleingerieben.
Bei den weiteren Versuchen unterschied sich die Vorbereitung der Proben. Es erfolgte eine Inkubation für 6 h in Aqua dest. vor erneuter Lyophilisierung. Ein weiterer Ansatz war die Inkubation der Gehirne über Nacht in Aqua dest. und nach Gefriertrocknung die Inkubation von Probe A in 5 ml 50 mM Glycin respektive Probe B in 5 ml Aqua dest. für 15 min im Ultraschallbad. Der anschließende Zentrifugationsschritt erfolgte bei 17380 g (RCF) in einer Universal 32 R Zentrifuge (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) für 20 min bei 4 °C. Der Überstand wurde abgesaugt, die Proben anschließend lyophilisiert und wiederum wurde Probe A in 15 ml 50 mM Glycin

respektive Probe B in 15 ml Aqua dest. über Nacht bei 4°C im Schüttler inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes lyophilisierten wir die Probe, rieben diese klein und wogen jeweils 5 mg zur nachfolgenden DMB-Markierung ab.

2.4.3 DMB-Markierung

Die DMB-Derivatisierung (Inoue and Inoue 2003) erfolgte durch Hinzufügen von 450 µl fertigem DMB-Puffer und 450 µl Markierungspuffer je Probe (bzw. jeweils 150 µl in anderen Versuchsansätzen) mit nachfolgender Inkubation der Proben im Schüttler (Thermomixer comfort) bei 11 °C über Nacht (bzw. für 48 h bei 4 °C in Dunkelheit). Der Reaktionsstop wurde durch Zugabe von 225 µl 1 N NaOH (Sigma-Aldrich) zu den Gewebeproben, respektive 50 µl zur Colominsäure und 60-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, herbeigeführt . Vor der Analyse wurden die Proben 30 min bei 4 °C mit 17380 g (RCF) in einer Universal 32 R Zentrifuge (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und wiederum in 0,1 µm Ultrafee-MC Durapore PVDF Filtereppis (Millipore Corporation, Amicon Bioseparations, Bedford, USA) bei 17380 g (RCF) und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Nachfolgend wurden die Proben in die Glasgefäße zur HPLC Analyse pipettiert.

2.4.4 Kontrolle

Zur Versuchkontrolle wurde bei jedem Ansatz als Standard Colominsäure (Sigma-Aldrich) derivatisiert. Dafür wurden 10 µl (0,1 µg/µl = 1µg) Colominsäure mit 100 µl DMB-Puffer und 90 µl Markierungspuffer wie unter 2.4.3 beschrieben inkubiert. Der Reaktionsstop wurde durch Zugabe von 50 µl 1 N NaOH (Sigma-Aldrich) und 60-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur herbeigeführt. Die Analyse erfolgte wie unter 2.4.5 beschrieben.

2.4.5 Analyse

Für die Analyse mittels HPLC *(high pressure liquid chromatography*) wurde eine DNA-Pac Pa-100 Säule 4 x 250 mm (Dionex, Idstein, Deutschland) verwendet. Außerdem wurden eine LKB 2245 Gradient HPLC-Pumpe (LKB, Bromma, Schweden) und ein Fluoreszensdetektor FP 1520 (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland) mit Extinktionswellenlänge 372 nm und Emissionswellenlänge 476 nm eingesetzt. Die

Injektion der Proben erfolgte mit dem Midas Spark Autosampler (Spark, Emmen, Holland).

Die Analyse erfolge unter folgenden Bedingungen/Einstellungen:

Laufmittel A:	Aqua dest.
Laufmittel B:	4 N AmAc
Fluss:	1 ml/min
Säulentemperatur:	RT
Autosampler Tray Cool:	RT
Systemprogramm:	ECW 2000 Integration Package
Emissionsdetektor-Empfindlichkeit (*Gain*):	1000
Injektionsvolumen:	40 µl
Wellenlängen:	Extinktion: 372 nm Emission: 456 nm
Druckbegasung [1bar] der Laufmittel mit Helium (Air Liquide)	

Der in Tabelle 1 aufgeführte Gradient wurde zur Messung verwendet:

Tabelle 1. Laufmittelgradient bei HPLC-Analyse

Zeit [min]	Gradient Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	100	0
5	100	0
15	90	10
20	87	13
35	83	17
55	80	20
100	74	26
115	72	28
116	0	100
125	0	100
126	100	0
140	100	0
140,1	100	0 mit Flow 0,01 ml/min

Die Vorbereitung der Proben für die Derivatisierung, Derivatisierungszeiten beziehungsweise -temperaturen, die verwendeten Laufmittelkonzentrationen, Gradienten und Injektionsvolumina wurden auf gezeigte Werte optimiert.

2.5 Verknüpfungsanalyse von Di-/Oligo – und PolySialinsäuren

2.5.1 Verwendete Puffer und Materialien:

Materialien:

- Gereinigte *Neisseria meningitides* Typ C Kapselpolysaccharid (α2,9- verknüpfte PolySia) Dade Behring (Marburg, Deutschland)
- Colominsäure (α2,8-verknüpfte Di-/Oligo-/PolySia) EY Laboratories (San Mateo, Kalifornien USA) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
- DMB (Dojindo, Kumamoto, Japan)
- Gewebeproben: - Wild-Typ-Mäusegehirne
  - *TH-MYCN*-Mäusegehirne (siehe 2.2.3)

DMB-Puffer:

500 mM 2-mercaptoethanol C_2H_6OS (Merck) + 9 mM Natriumhydrosulfit $Na_2S_2O_4$ (Sigma- Aldrich) + 20 mM TFA $C_2HF_3O_2$ (Merck)

2.5.2 DMB-Markierung von Di-/Oligo und PolySia

Die getrockneten Proben wurden mit 80 µl DMB-Reaktionspuffer bei 50 °C für eine Stunde inkubiert (Inoue and Inoue 2003; Galuska et al. 2007) . Der Reaktionsstopp wurde durch Zugabe von 20 µl 1 M NaOH herbeigeführt. Um eine komplette Delaktonisierung zu erreichen wurden die Proben vor der HPLC-Analyse noch 18 h bei Raumtemperatur gelagert. Mittels Microdialyse Einheiten mit einem Ausschlussvolumen von 2 kDA (Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) gelang vor Permethylierung durch Dialyse der Proben gegen 50 mM Ammoniumhydrogencarbonatpuffer pH 7,5 die Entfernung von überschüssigem DMB-Reagenz.

2.5.3 Trennung von Oligo-/PolySia mit der Anionen-Austauscher HPLC

Die mit DMB-markierten Oligo-/PolySia-Ketten wurden mit Hilfe eines Knauer HPLC-Systems (Berlin, Deutschland) getrennt, welches mit einer Dionex DNAPac PA-100 Säule (Idstein, Deutschland) bestückt war. MilliQ Wasser (Laufmitel A) und 4 M AmAc (Laufmittel B) wurden als Eluent bei einer Flussrate von 1ml/min verwendet. Der Fluoreszenzdetektor FP 1520 (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland) wurde auf 372 nm zur Exzitation und 456 nm zur Emission eingestellt. Der in Tabelle 2 aufgeführte lineare Gradient wurde zur Messung verwendet:

Tabelle 2. Laufmittelgradient Trennung DMB-markierte Oligo-/PolySia.

Zeit [min]	Gradient Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	100	0
15	93	7
25	86	14
40	80	20
55	76	24
115	65	35

2.5.4 Quantifizierung der Sialinsäuren

Die Oligo-/PolySia-Proben wurden in 100 µl 0,2 N TFA für 4 h bei 80 °C hydrolisiert, getrocknet, zweimal neu in Methanol gelöst und wiederum getrocknet. Anschließend erfolgte die Zugabe von 80 µl DMB-Reaktionspuffer zur Derivatisierung und Inkubation der Proben bei 56 °C für 2 h. Der Reaktionsstopp wurde mit 10 µl 0,2 M NaOH herbeigeführt (Hara et al. 1987; Hara et al. 1989; Galuska et al. 2010). Die DMB-markierten freien Sialinsäuren wurden mit einer Merck-Hitachi Superspher 100 C-18 Säule, 250 x 40 mm (Darmstadt, Deutschland) bei 40 °C mit Hilfe eines Merck-Hitachi HPLC Systems analysiert. Als Laufmittel zur Trennung wurden Methanol/Acetonitril/Wasser/TFA (4:4:92:0,1 v/v) (Laufmittel A) und Methanol/Acetonitril/Wasser/TFA (45:45:10:0,1 v/v) (Laufmittel B) verwendet. Ein linearer Gradient von 0% bis hin zu 20% Laufmittel B in 35 min bei einer Flussrate von 0,3 ml/min kam zur Anwendung. Der Fluoreszenzdetektor wurde auf 372 nm zur Exzitation und 456 nm zur Emission eingestellt.

2.5.5 Die „*linkage*“- Analyse

2.5.5.1 Vorbereitung der Proben

Getrocknete im Original belassene DMB-markierte Oligo-/PolySia-Proben, wie auch freie Neu5Ac (Sigma, Deutschland) wurden in 50 µl Dimethyl Sulfoxid (DMSO) gelöst und anschließend 90 min bei Raumtemperatur im Ultraschallbad behandelt. Es folgte die Zugabe von 50 µl Lithiummethylsylfinylcarbanion-Lösung und erneute Ultraschallbehandlung für 90 min bei Raumtemperatur (Parente et al. 1985; Geyer et al.1994). Die Methylierung erfolgte durch Addition von 50 µl Methyliodid und neuerlicher Ultraschallbehandlung für 90 min bei Raumtemperatur. Um die methylierten Proben zu extrahieren wurden 4 mL Chloroform zugesetzt und die Proben gemixt, um die Chloroformphase anschließend dreimal mit 2 ml Wasser zu waschen und unter einem Stickstoffstrahl zu trocknen. Zur Hydrolyse wurden die methylierten Sialinsäureoligo-/polymere in 200 µl 1 N methanolischer HCl gelöst und über 18 h bei 80 °C inkubiert (Finne et al. 1977; Inoue et al. 1982). Nach der Methanolyse wurden die Proben getrocknet und freie Hydroxylgruppen durch Zugabe von 100 µl Pyridin sowie 400 µl Essigsäureanhydrid acetyliert, mit anschliessender Inkubation für 18 h in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Die erneut getrockneten Proben wurden vor GC und GC/MS Analyse in Aceton gelöst. Um einen peracetylierten Sialinsäurestandard zu erhalten wurden freie Neu5Ac direkter Methanolyse und Peracetylierung unterzogen.

2.5.5.2 Trennung und Analyse

GC-Trennung von partiell O-methylierten Neuraminsäure-methylester-ß-methyl-glykosiden wurde mit einer Resteck 60 m RT x 5 MS Säule (Bad Homburg, Deutschland) und Flammenionisationsdetektierung mit Hilfe eines Agilent Varian 3400 Gaschromatographen (Santa Clara, Kalifornien, USA) vollzogen, bei einer Detektorentemperatur von 290 °C.

Tabelle 3. GC-Trennung Temperaturprogramm

Zeit [min]	Temperatur [°C]
0	130
1	130
32	290
42	290

GC/MS Analysen wurden mit einer Polaris Q Instrument (Thermo Scientific, Dreieich, Germany) durchgeführt. Die Probentrennung erfolgte mit einer Agilent VF 5MS Säule unter den in Tabelle 4 beschriebenen Bedingungen:

Tabelle 4. GC/MS Probentrennung Temperaturprogramm

Zeit [min]	Temperatur [°C]
0	50
1.88	50
4.63	160
28.63	280
30	280

Bei beiden Analyseverfahren (GC bzw. GC/MS) diente Helium als Trägergas.

2.5.6 Analyse von Sialinsäureketten aus Zellkulturen und Gewebeproben.

Neuroblastomzellen (~ 2 x10^6 Zellen), ein Mäusegehirn (Neonatalperiode Tag 1) von 80 mg Nassgewicht und Neuroblastomtumorgewebe (~ 2 x 2 x 2 mm) von *TH-MYCN* Mäusen wurden homogenisiert, entfettet und getrocknet (Galuska, Oltmann-Norden et al. 2006). Die Proben wurden in DMB-Reaktionspuffer gelöst (Neuroblastomzellen in 240 µl; das Mäusegehirn in 300 µl und das Tumorgewebe in 400 µl) und dann für 1 h bei 50 °C inkubiert.
Die Reaktion wurde auch hier durch Zugabe von entsprechend 60 µl, 75 µl und
100 µl einer 1 M NaOH gestoppt. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden grobe Bestandteile sowie unlösliches Material mittels Zentrifugation entfernt und die DMB-markierten Di-/Oligo- und PolySia-Derivate mit Hilfe der Anionenaustauscher-Chromatographie aufgetrennt (siehe 2.9.3).

3 Ergebnisse

3.1 HPLC-Analyse von Mäusehirnen

3.1.1 Vorversuche

Zur Evaluierung von Methoden zur *in situ* Charakterisierung der Polysialylierung des neuralen Zelladhäsionsmoleküls NCAM, beschäftigten wir uns zuerst mit der Durchführung einer *Hiqh pressure liquid chromatography* an zuvor stickstoffgefrorenen sowie formalinfixierten Hirngewebe. Das bereits von Galuska et al. (Galuska et al. 2006) für die Analyse von direkt nach Entnahme stickstoffgefrorener Gehirne optimierte Analyseverfahren sollte für formalinfixiertes Hirngewebe etabliert, auf seine Eignung hierfür untersucht und gegebenenfalls ergänzt oder zusätzlich erweitert werden. Für die Analyse verwendeten wir das Gehirn von am 10. postnatalen Tag getöteten Mäusen und froren dies unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff ein beziehungsweise fixierten dieses für den Zeitraum von 12 Tagen in 4% Formalinlösung. Am zuvor in Stickstoff gefrorenen Gehirn führten wir eine Chloroform-Methanol-Extraktion durch. Bei diesem Ansatz (detaillierte Beschreibung siehe 2.4.2.1) wurde das Hirngewebe gefriergetrocknet und kleingerieben, mit anschließender Zerstörung der Zellintegrität durch Behandlung mit Ultraschallwellen. Durch Zugabe von Chloroform-Methanol erreichten wir eine Entfernung der Lipide, gelöst in der oberen Phase nach Zentrifugation mit Verbleib der zu analysierenden Glykopeptide im Pellet. Dieses Vorgehen wurde wiederholt gefolgt von Reinigungsschritten und einer abschließenden Gefriertrocknung. Das formalinfixierte Hirn unterzogen wir für die Analyse einer Gefriertrockung mit anschließender Mörserung und Inkubation in Aqua dest. (detaillierte Beschreibung siehe 2.4.2.2). Weitere Proben wurden anstelle von Aqua dest. in 50 mM Glycin inkubiert oder mit Ultraschallwellen behandelt. Ziel war jeweils eine Reduzierung des Restgehaltes an Formalin. Folgende Zentrifugationsschritte mit Absaugen des Überstandes sowie Gefriertrockung sämtlicher Proben erfolgten parallel in gleichem Ausmaß. Das per Schockfrostung konservierte Gehirn nutzten wir auch zur Kontrolle bzw. zur weiteren Anpassung und Optimierung der Methode, da hierzu bereits diverse Vorversuche stabil reproduzierbare Ergebnisse geliefert hatten. Zur Fluoreszenzmarkierung der Polysialinsäureketten (Inoue and Inoue 2003) verwendeten wir DMB, ein α-Ketosäuren spezifisches Reagenz (Hara et al. 1987). Dabei werden unter schwach sauren Bedingungen die

Oligo- und PolySia-Ketten vom Glykokonjugat abgespalten (Hydrolyse) und dann am reduzierenden Ende mit DMB-markiert (Abbildung 6). So sichtbar gemachte Ketten können nach Anzahl der Sialinsäuren mittels Anionenaustauscherchromatographie aufgetrennt werden und somit sowohl die Kettenlänge bestimmt und eine Quantifizierung ermöglicht als auch der Nachweis für das bloße Vorhandensein von Oligo- und PolySia erbracht werden (Inoue et al. 2001). Als Standard diente Colominsäure, die gemeinsam mit den Proben DMB-markiert wurde (Abbildung 7).

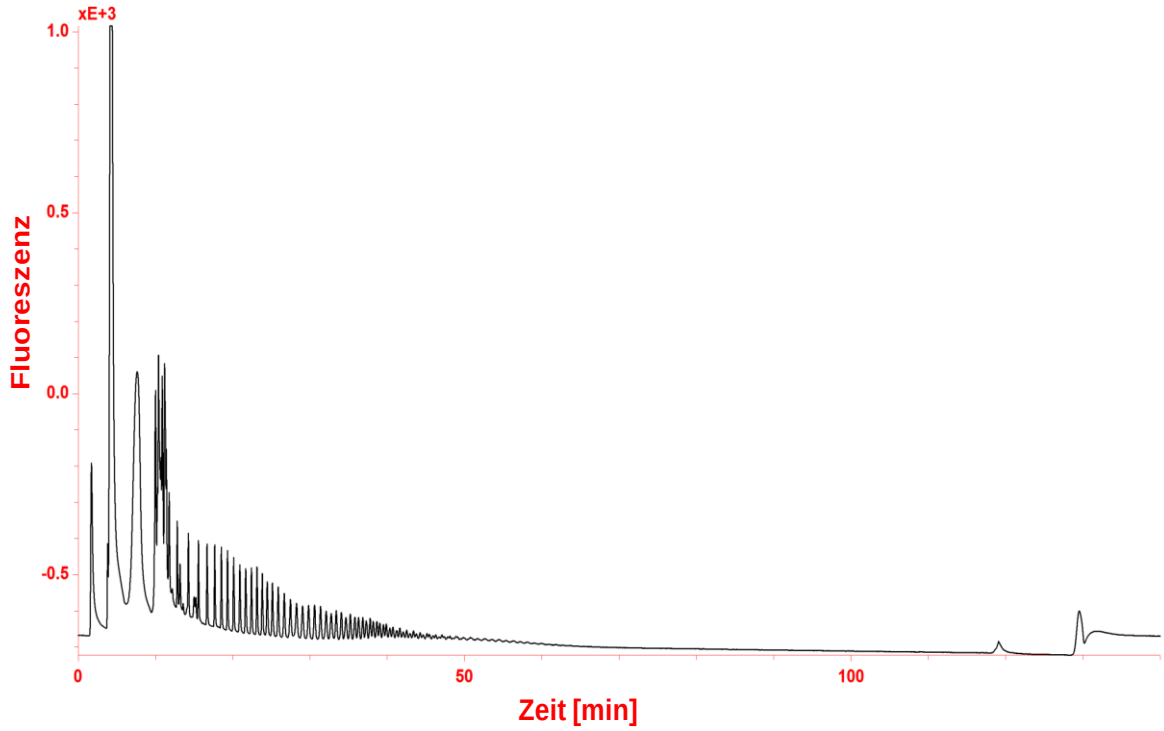


Abbildung 7. HPLC-Analyse des Standards Colominsäure.
Dargestellt ist die HPLC-Analyse von 1 µg Colominsäure als Standard. Die Colominsäure wurde direkt mit 100 µl DMB-Puffer sowie 90 µl Markierungspuffer über Nacht bei 11 °C im Schüttler inkubiert. Die mit DMB-derivatisierte Probe wurde anschließend auf einer DNA-Pac Pa-100 Anionenaustauschersäule unter den unter 2.4.5 genannten Bedingungen aufgetrennt. (Dargestellt sind, wie auch bei allen nachfolgenden Abbildungen, auf der x-Achse die Zeit in Minuten und auf der y-Achse die Fluoreszenz.)

Die erwarteten Ergebnisse erhielten wir bei dem mit dem Standard Colominsäure und dem als Referenz dienenden stickstoffgefrorenen Gehirn. Die erhaltenen Chromatogramme stimmten mit den Resultaten von Vorversuche überein, so dass wir von einer funktionierenden Analysemethode ausgehen dürfen (Galuska et al. 2006).

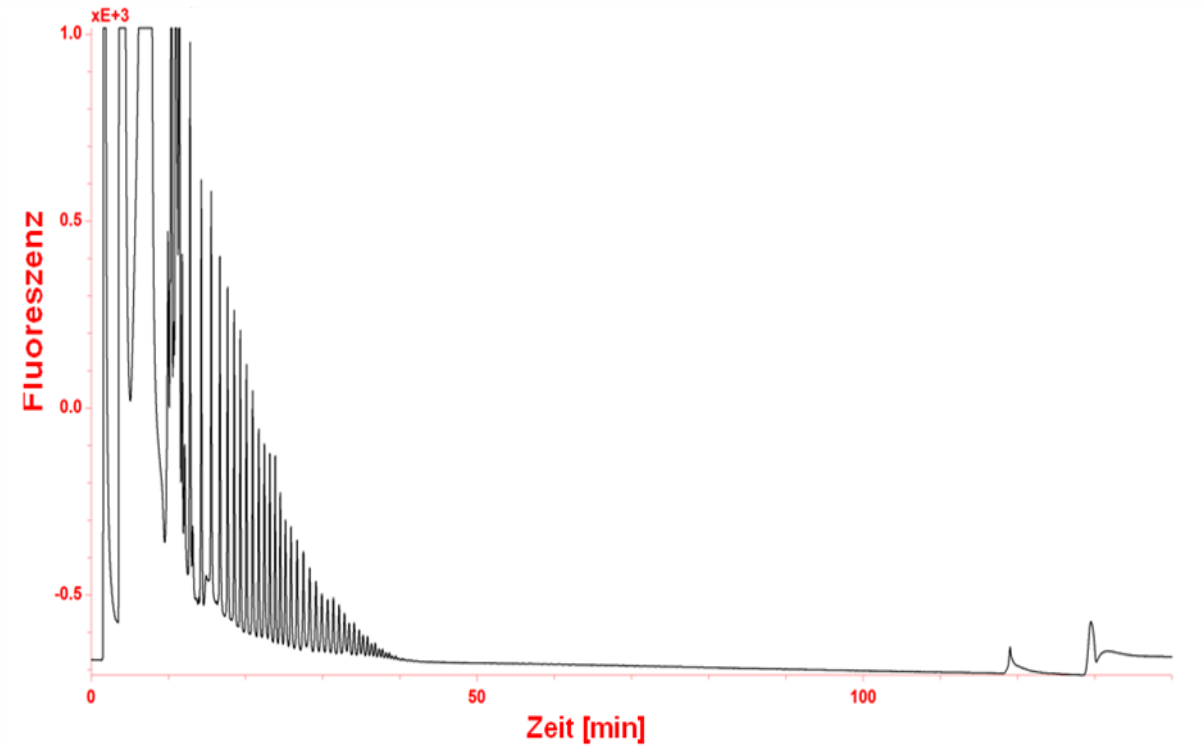


Abbildung 8. HPLC-Analyse von stickstoffgefrorenem Gehirn.
Dargestellt ist die Detektion von PolySia eines stickstoffgefrorenen Gehirns mittels HPLC-Analyse. Dem Gewebe wurden vor der DMB-Markierung, wie unter 2.4.2.1 beschrieben, durch Chloroform-Methanol Behandlung die Lipide entfernt. Die Fluroreszenzmarkierung erfolgte duch Zugabe von 450 µl DMB-Puffer sowie 450 µl Markierungspuffer und folgender Inkubation im Schüttler bei 11 °C über Nacht. DMB-markierte PolySia wurde auf einer Anionenaustauscher-säule nach Anzahl der Sialinsäuremoleküle getrennt. (Bedingungen siehe 2.4.5)

Das zuvor für den Zeitraum von 12 Tagen in Formalin konservierte und anschließend für die Analyse aufgearbeitete Gehirn (Abbildung 9) zeigte im Vergleich zu dem stickstoffkonservierten Gehirn (Abbildung 8) keine typische Peakverteilung. Es zeigten sich nur Artefakte und selbst bei starker Vergrößerung des Chromatogramms, sind keine Peaks abgrenzbar, die eine vergleichbare Angabe der Kettenlänge erlauben würden. Ein erst vermuteter Fehler bei Zugabe des DMB-Puffers bzw. dessen Reaktionsfähigkeit konnte durch mehrfache Wiederholung des Experiments und Neuansetzen des Puffers bei sehr ähnlichen Chromatogrammen ausgeschlossen werden. Als mögliche Ursache der fehlenden Einzelpeaks und Artefakte nahmen wir zum Einen an, dass Colominsäure durch Formalin quervernetzt werden könnte und zogen zum Anderen einen Funktionsverlust des Fluoreszenzpuffers in Betracht. Dieser Funktionsverlust könnte auf einer Reaktion des, noch im Gehirn enthaltenen, Formalins mit DMB basieren, da dieses zwei primäre Aminogruppen aufweist, die durch Formalin quervernetzt werden könnten (3.1.2). Um diesen vermuteten beträchtlichen Einfluss

auf unsere Analyse zu verifizieren, inkubierten wir zunächst hochaufgereinigte Colominsäure über Nacht mit Formalin (Abbildung 10) und führten diese anschließend der Analyse mittels HPLC zu (siehe auch 2.4.5).

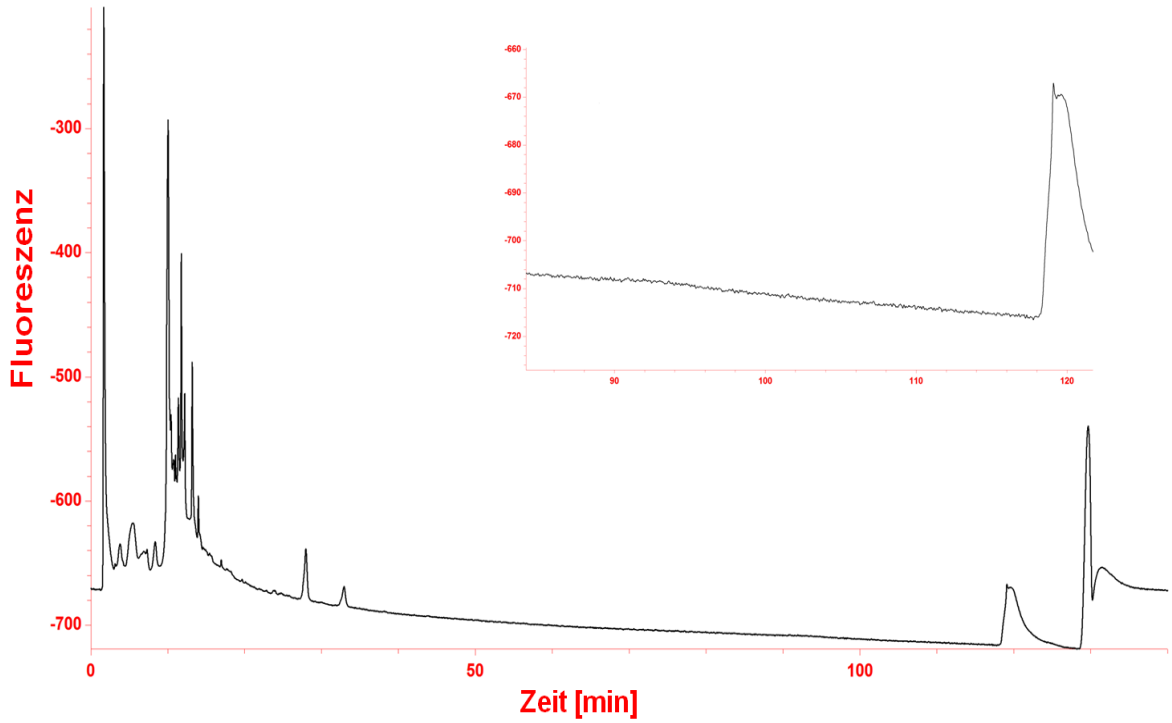


Abbildung 9. HPLC-Analyse eines formalinfixierten Gehirns.

Dargestellt ist die Detektion von PolySia eines formalinfixierten Gehirns mittels HPLC-Analyse. Das Mäusegehirn wurde präanalytisch für 12 Tage in 4% Formalin konserviert. Vor DMB-Markierung und Analyse wurde das Gewebe über Nacht bei bei 4 °C gefiergetrocknet und anschließend zerkleinert. Die Fluroreszenzmarkierung erfolgte duch Zugabe von 450 µl DMB-Puffer sowie 450 µl Markierungspuffer und folgender Inkubation im Schüttler bei 11 °C über Nacht. DMB-markierte PolySia wurde auf einer Anionenaustauschersäule nach Anzahl der Sialinsäuremoleküle getrennt. (Bedingungen siehe 2.4.5) Der Bildausschnitt zeigt die Endstrecke des Chromatogramms. Es konnten keine verwertbaren Signale detektiert werden.

3.1.2 Quervernetzung von DMB-Reagenz

Die im Vergleich von Abbildung 10 zu Abbildung 9 erhaltenen Artefakte im Chromatogramm lassen die Möglichkeit einer Quervernetzung des DMB-Reagenz durch Formalin als nachvollziehbar erscheinen.

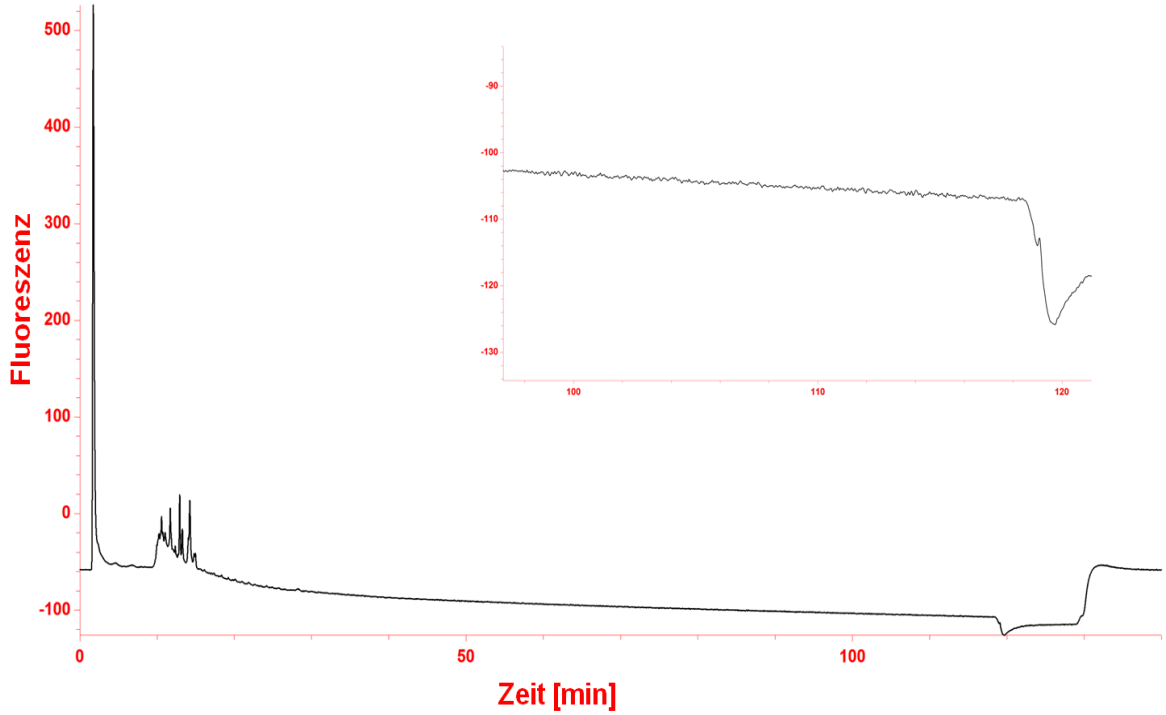


Abbildung 10. HPLC-Analyse formalinkubierter Colominsäure.
Dargestellt ist die HPLC-Analyse von Colominsäure die präanalytisch mit Formalin inkubiert wurde. Es wurden 50 µg der hochaufgereinigten Colominsäure über Nacht bei 11 °C mit 50 µl 8% Formalin inkubiert und folgend durch Zugabe von 100 µl DMB-Puffer markiert. Die mit DMB-derivatisierte Probe wurde anschließend auf einer DNA-Pac Pa-100 Säule unter den unter 2.4.5 genannten Bedingungen aufgetrennt. Der Bildausschnitt zeigt die Endstrecke des Chromatogramms. Es konnten keine verwertbaren Signale detektiert werden.

Aus diesem Grund untersuchten wir im nachfolgenden Versuchsansatz (3.1.3/3.1.4), ob zum Einen die Dauer der Formalinfixierung des Hirngewebes einen Einfluss auf die Detektierbarkeit von PolySia hat und zum Anderen eine Möglichkeit besteht, den anscheinend durch Quervernetzung stattfindenden Funktionsverlust unserer Fluoreszenzmarkierung zu umgehen.

3.1.3 Zeitliche Begrenzung der Formalinfixierung

Wir näherten uns einem Teil der Fragestellung mit deutlicher Reduzierung der Konservierungszeit in Formalin, die wir auf 48 h begrenzten (zuvor zwölf Tage). Abbildung 11 demonstriert das resultierende Chromatogramm, nach standardisierter Vorbereitung und Analyse der Proben. Die bestechende Ähnlichkeit zu den in Abbildung 9 gezeigten Resultaten, nach längerer Inkubation in Formalin, lässt an einem großen Einfluss der Inkubationszeit zweifeln. Es gelang nicht verwertbare Signale im beschriebenen Versuchsansatz zu detektieren.

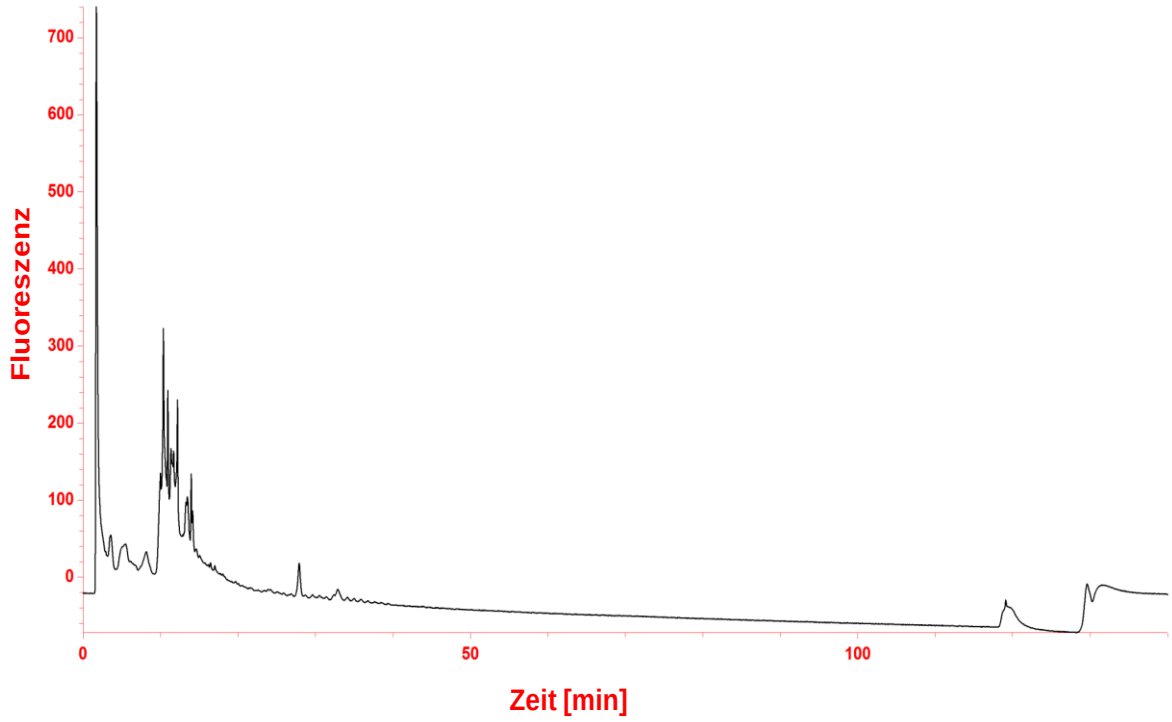


Abbildung 11. HPLC-Analyse eines 48 h formalinfixierten Gehirn.
Dargestellt ist die Detektion von PolySia eines formalinfixierten Gehirns mittels HPLC-Analyse. Das resultierende Chromatogramm nach Analyse eines, im Gegensatz zu den Vorversuchen, nach Entnahme aus dem Leichnahm für nur 48 h in 4% Formalin konservierten Mäusegehirns wird gezeigt. Die DMB-Markierung fand durch Zugabe von nur 150 µl DMB-Puffer und 150 µl Markierungspuffer mit folgender Inkubation für 48 h bei 4 °C unter Lichtabschluss statt. Das weitere Prozedere im Sinne von Reaktionsstop, Aufarbeitung und Auftrennung der DMB-markierten PolySia auf einer Anionenaustauschersäule nach Anzahl der Sialinsäuremoleküle entsprach dem bereits unter 2.4.5 illustrierten. Als Standard dienten wiederum Colominsäure sowie nach Entnahme in Stickstoff gefrorenes Hirngewebe. Die Chromatogramme des Standards und des stickstoffgefrorenen Gehirns waren von selber Qualität, wie bereits in Abbildungen 7/8 dargestellt, weshalb auf eine erneute Demonstration verzichtet wird.

3.1.4 Abschwächung der Formalineffekte durch Aqua dest.

Der Frage nach einer Möglichkeit, den wahrscheinlich durch Quervernetzung von überschüssigem Formalin stattfindenden Funktionsverlust des DMB-Reagenz abzuschwächen, gingen wir durch präanalytische Inkubation des Materials in Aqua dest. nach (Abbildung 12).

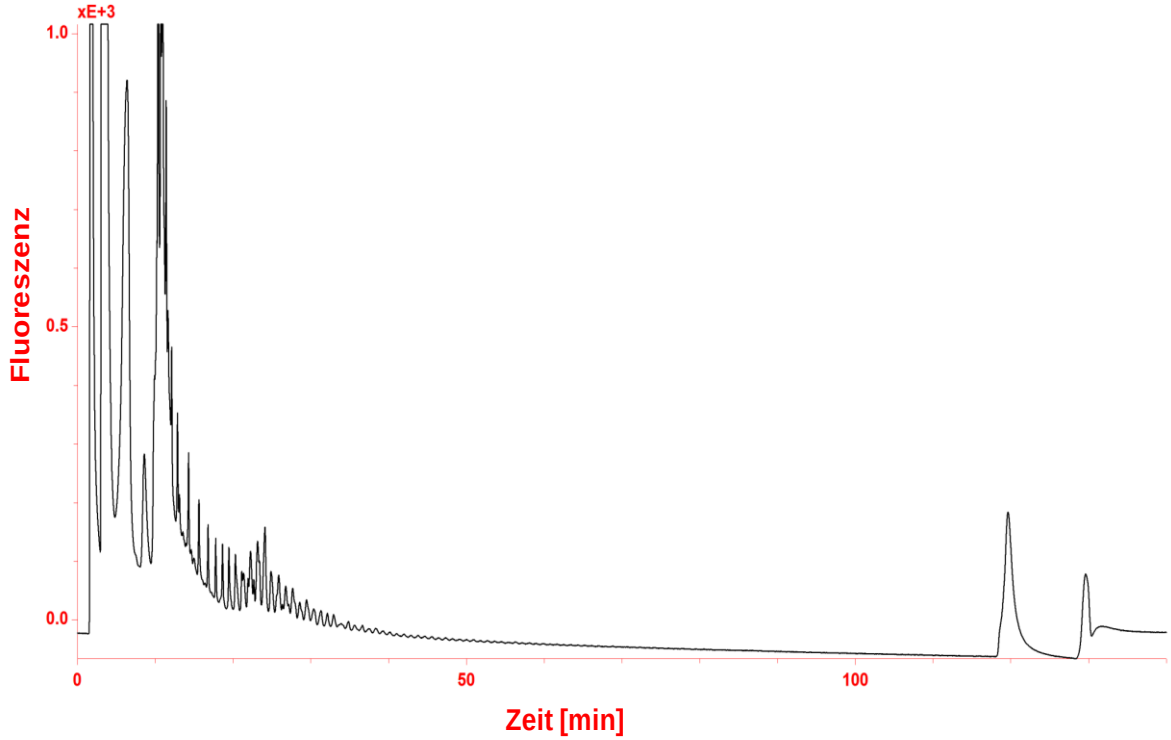


Abbildung 12. HPLC-Analyse eines Gehirns nach Aqua dest.-Inkubation.
Die Abbildung zeigt das Chromatogramm nach 6-stündiger Inkubation in Aqua dest. des für zuvor 48 h in 4% Formalin fixierten Mäusegehirns. Dieses wurde mit dem Skalpell zerkleinert, aber nicht gefriergetrocknet. Die DMB-Markierung fand durch Zugabe von nur 150 µl DMB-Puffer und 150 µl Markierungspuffer mit folgender Inkubation für 48 h bei 4 °C unter Lichtabschluss statt. Das weitere Prozedere im Sinne von Reaktionsstop, Aufarbeitung und Auftrennung der DMB-markierten PolySia auf einer Anionenaustauschersäule nach Anzahl der Sialinsäuremoleküle enstprach dem bereits unter 2.4.5 veranschaulichten. Als Standard diente wiederum Colominsäure (nicht dargestellt).

Ziel unseres Vorgehens war eine Auswaschung von im Gewebe verbliebenen, nicht gebundenen Formalin, mit folgender Reduzierung des Einflusses auf das DMB-Reagenz. Dieser Versuchsansatz brachte erste Erfolge hinsichtlich auftretender Artefakte. Abbildung 12 zeigt im Vergleich zum Gewebe ohne zusätzliche Behandlung nach Formalinfixierung (Abbildungen 9 und 11) deutliche Signale von DMB-markierten

Oligo-/PolySia-Ketten. Die Kettenlängenverteilung entspricht zwar nicht denen des stickstoffgefrorenen Gehirns, aber das Ergebnis bestätigt den vermuteten Einfluss der Formalinreste auf das Fluoreszenzreagenz DMB. Die im Vorversuch reduzierte Inkubationszeit in Formalin wurde beibehalten, eben auch die Mengen an zugegebenen DMB-Reagenz und Analyseprogramm der HPLC.
Eine weitere Möglichkeit, um restliche Formalinmoleküle nach Fixierung zu binden und damit die durch abgeschwächte Quervernetzung des DMB einhergehende verbesserte Markierung der Polysialinsäureketten zu erreichen, wäre die Zugabe von Molekülen, die primäre Aminogruppen enthalten. Wir entschlossen uns für die Zugabe von Glycin, der kleinsten und einfachsten α-Aminosäure (3.1.5).

3.1.5 Abschwächung der Formalineffekte durch Gefriertrocknung

Die im Folgenden dargestellten Versuchsergebnisse demonstrieren unser Bestreben nach einer weiteren Optimierung der analytischen Methode für formalinfixiertes Hirnmaterial. Die kurze 48-stündige Inkubationszeit in Formalin unterlag ebenso wie die Parameter zur Analyse keinen Veränderungen.

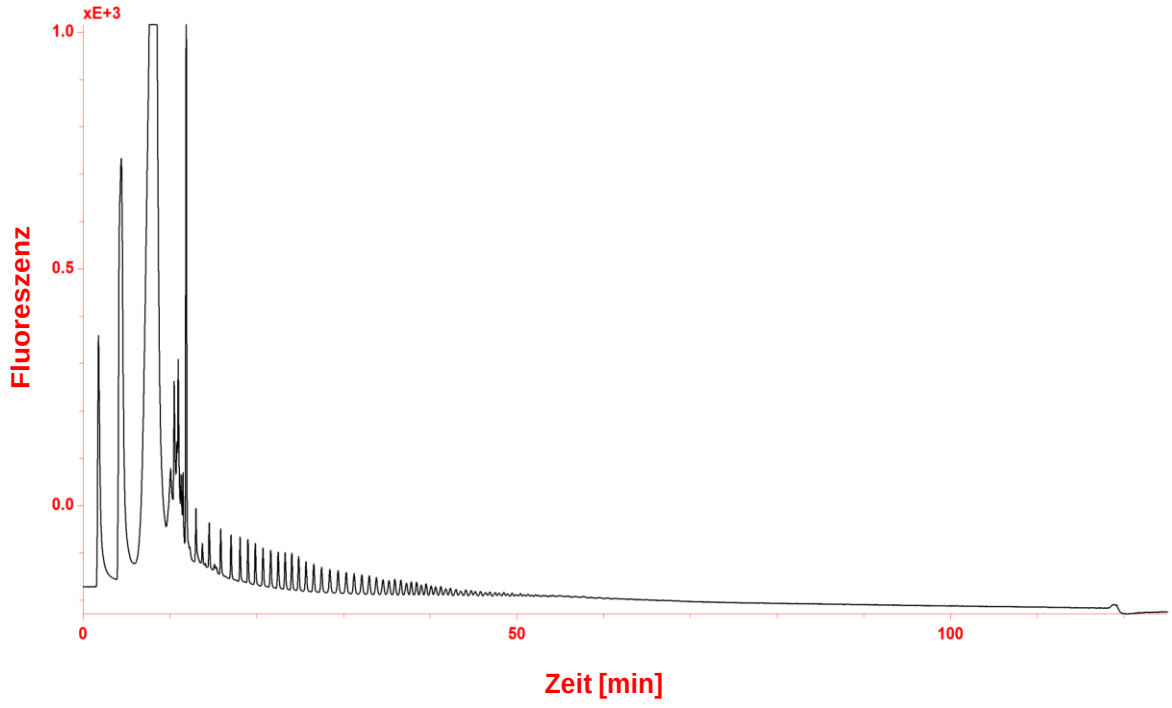


Abbildung 13. HPLC-Analyse des Standards Colominsäure.
Dargestellt ist die HPLC-Analyse von 1 µg Colominsäure als Standard. Die Colominsäure wurde direkt mit 150 µl DMB-Puffer sowie 140 µl Markierungspuffer über Nacht bei 11 °C im Schüttler inkubiert. Die mit DMB-derivatisierte Probe wurde anschließend auf einer DNA-Pac Pa-100 Anionenaustauschersäule unter den unter 2.4.5 genannten Bedingungen aufgetrennt.

Anstelle des nur mit einem Skalpell geschnittenen Gewebes, wurde das verwendete Material vor den Inkubationsphasen in Aqua dest. respektive Glycin, einer Gefriertrocknung unterzogen. Die Trocknung sollte gewährleisten, dass Formalin bereits vorab zum größten Teil abgezogen wird und das trockene Gewebe besser Aqua dest. beziehungsweise Glycinpuffer aufnehmen kann. Der Glycinpuffer wurde parallel zu Aqua dest. ausgetestet, um die Annahme zu bestätigen, dass die zusätzlichen Aminogruppen des Glycins noch vorhandene Reste von Formalin kompensieren. Des weiteren verkürzten wir die Markierungsphase mit DMB auf 14 Stunden bei erhöhter Temperatur auf 11 °C. In Abbildung 13 ist das Chromatogramm des bei jeglichen Versuchen parallel analysierten Standards Colominsäure dargestellt. Abbildungen 14 und 15 zeigen die Ergebnisse nach Inkubation des lyophilisierten Hirnmaterials in Aqua dest. und Glycin.

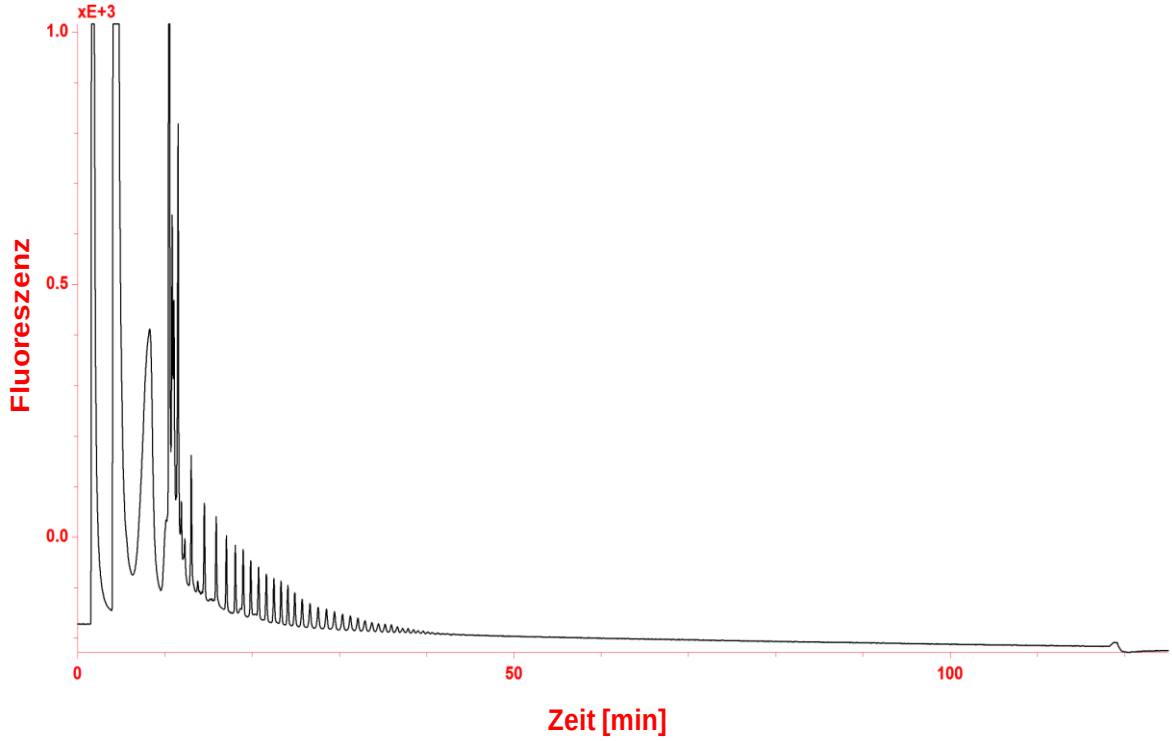


Abbildung 14. HPLC-Analyse nach Gefiertrocknung/Aqua dest.-Inkubation.
Dargestellt ist die HPLC-Analyse von 48 h in 4 % Formalin fixiertem Hirngewebe. Dieses wurde vor der Analyse über Nacht in Aqua dest. inkubiert, anschließend gefriergetrocknet und mit 5 ml Aqua dest. für 15 min im Ultraschallbad behandelt. Es folgte erneut eine Gefriertrocknung und hiernach die Inkubation in 15 ml Aqua dest über Nacht bei 4 °C im Schüttler. Die DMB-Markierung fand durch Zugabe von 150 µl DMB-Puffer sowie 150 µl Markierungspuffer über Nacht bei 11 °C im Schüttler statt. Das weitere Prozedere im Sinne von Reaktionsstop, Aufarbeitung und Auftrennung der DMB-markierten PolySia auf einer Anionenaustauschersäule nach Anzahl der Sialinsäuremoleküle enstprach dem bereits unter 2.4.5 veranschaulichten.

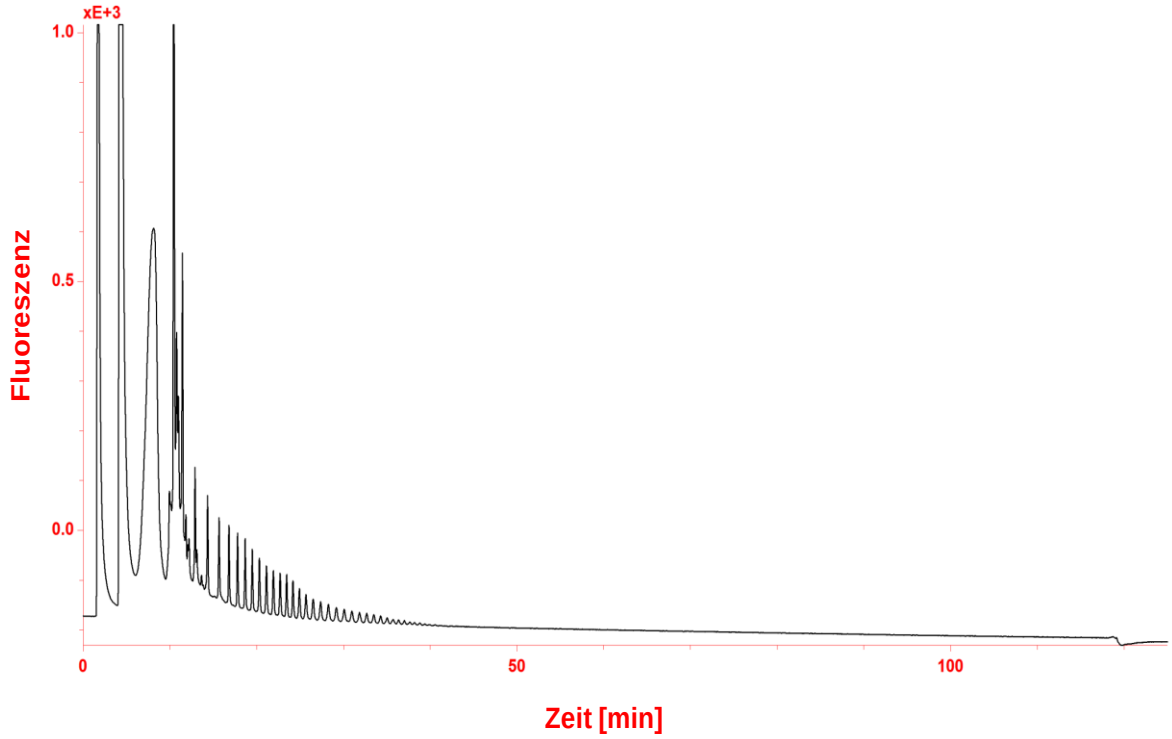


Abbildung 15. HPLC-Analyse nach Gefriertrocknung/Glycininkubation.
Dargestellt ist die HPLC-Analyse von 48 h in 4 % Formalin fixiertem Hirngewebe. Dieses wurde vor der Analyse über Nacht in Aqua dest. inkubiert, anschließend gefriergetrocknet und mit 5 ml 50 mM Glycin für 15 min im Ultraschallbad behandelt. Es folgte erneut eine Gefriertrocknung und hiernach die Inkubation in 15 ml 50 mM Glycin über Nacht bei 4 °C im Schüttler. Die DMB-Markierung fand durch Zugabe von 150 µl DMB-Puffer sowie 150 µl Markierungspuffer über Nacht bei 11 °C im Schüttler statt. Das weitere Prozedere im Sinne von Reaktionsstop, Aufarbeitung und Auftrennung der DMB-markierten PolySia auf einer Anionenaustauschersäule nach Anzahl der Sialinsäuremoleküle enstprach dem bereits im Abschnitt 2.4.5 beschriebenen.

Vergleicht man die Versuchsansätze, in denen eine Inkubation der Proben in Aqua dest. erfolgte (Abbildungen 12 und 14), fällt auf, dass nach längerer Inkubationsdauer mit Aqua dest. die Signale besser voneinander abgrenzbar und keine Artefakte mehr vorhanden sind (siehe Abbildung 13 zum Vergleich). Zudem waren eine Quantifizierung der Peakfläche sowie eine Bestimmung der Kettenlänge möglich. Diese bedeutende Verbesserung ist auf die längere Inkubationszeit mit Aqua dest. und die vorangegangene Gefriertrocknung, mit konsekutiver Verringerung restlicher Formalinmoleküle zurückzuführen. Dem zuvor beobachteten formalinbedingten Funktionsverslust des DMB-Reagenz durch Quervernetzung ist somit Einhalt geboten. Das angewandte Protokoll diente als Grundlage für weitere Analysen, da hier optimierte Bedingungen, sowohl für die Vorbereitung als auch spätere DMB-

Markierung der Proben vorlagen. Die zuvor klar ersichtliche Diskrepanz zu Chromatogrammen, die aus der Analyse von stickstoffkonservierten Gehirnen mit nachfolgender Chloroform-Methanol-Extraktion resultierten (Abbildung 8), waren aufgehoben. Der Versuchsansatz lieferte deutliche Signale von DMB-markierten Oligo-/PolySia-Ketten bei formalinfixiertem Hirngewebe.
Eine zusätzliche Verbesserung der Analysebedingungen und resultierende Chromatogramme blieb jedoch im direkten Vergleich zwischen präanalytisch mit 50 mM Glycin (Abbildung 15) und Aqua dest. (Abbildung 14) behandelten Gehirnen aus, so dass eine Inkubation mit Aqua dest. ausreicht.

3.2 Verknüpfungsanalyse

3.2.1 Sensitivitätssteigerung der Analysemethode

Die Permethylierung von Glykanen (Hakamori 1964) und basierend darauf die Analyse der Verknüpfungen von Oligo- und PolySia-Ketten ist bereits bekannt, erforderte jedoch viel Ausgangsmaterial (Finne et al. 1977; Rauvala et al. 1977; Inoue et al. 1982; Miyata et al. 2004). Um die Sensitivität der Methode zu steigern, wurden in unseren Analysen das erprobte Verfahren mit einer DMB-Markierung der reduzierenden Enden (Inoue and Inoue 2003) von Oligo- und PolySia gekoppelt (Galuska et al. 2012).
Durch die Markierung sollten das Detektionslimit signifikant erhöht werden und so glykosidische Verknüpfungen noch effektiver bestimmt werden. Bedingt durch das Zufügen dieser hydrophoben und fluoreszierenden Substanz zu den polyanionischen Sialinsäureketten, konnte eine erhöhte Löslichkeit der Moleküle in den organischen Lösungsmitteln, die während der Methylierung und folgenden Reinigungsschritten verwendet wurden, erreicht werden (Galuska et al. 2012). Nach Markierung mit DMB (siehe auch Abbildung 6) werden freie Hydroxylgruppen mit Lithiummethylsulfonylcarbanion und Methyliodid permethyliert (Parente et al. 1985; Galuska et al. 2012). Die entstehenden permethylierten Oligo-/PolySiaketten wurden anschließend mit Methanolyse hydrolysiert, woraus teilweise O-methylierte Neuraminsäure methylester ß-methyl Glycoside resultierten.
Zum Ende erfolgte die Acetylierung der, durch die Spaltung der glycosidischen Bindungen entstehenden, freien Hydroxylgruppen und die Produkte wurden dann mit Hilfe von GC oder GC/MS analysiert (Galuska et al. 2012) siehe (Abbildung 16).

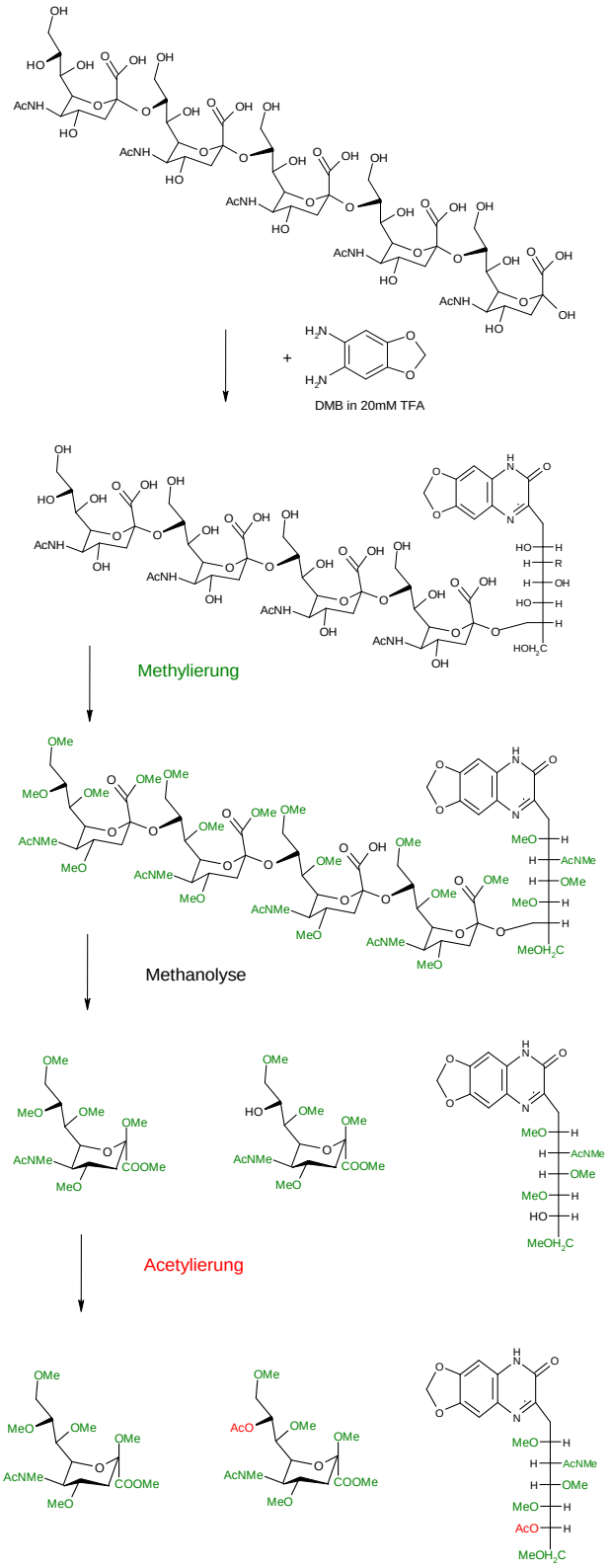


Abbildung 16. Schema DMB-Markierung und Verknüpfungsanalyse.

Dargestellt ist die schematische Illustration der Markierung eines α2,8-verknüpften Neu5Ac Pentamers mit DMB und anschließender Verknüpfungsanalyse mit Permethylierung, Methanolyse und Acetylierung aus (Galuska et al. 2012).

Eine weitere sich ergebende Möglichkeit ist die Auftrennung der fuoreszenzmarkierten Di-/Oligo- und PolySia-Derivate mit Hilfe der Anionenaustauscher-Chromatografie und spätere Methylierung und Analyse von speziell interessierenden Fraktionen. Des weiteren kann die beschriebene Methode auch direkt an Proben von Säugerorganen oder Tumorgewebe durchgeführt werden (siehe 3.2.2), wobei mehrere verkomplizierende Reinigungsschritte nahezu entfallen (Galuska et al. 2012).

3.2.2 Anwendbarkeit bei biologischen Proben

Um herauszufinden, ob die unter 2.5 beschriebene Analysemethode auch direkt an biologischen Proben anwendbar ist (da bisher nur Colominsäurestandard verwendet worden war), analysierten wir die glykosidischen Verknüpfungen von PolySia-Ketten aus postnatalem Mäusegehirn. Das Gewebelysat wurde von Lipiden befreit, die PolySia-Ketten abgelöst und gleichzeitig mit DMB markiert wie unter 2.9.2. beschrieben (Galuska et al. 2006; Oltmann-Norden et al. 2008; Galuska et al. 2010).
Nach Fluoreszenzmarkierung wurden die Proben, ohne weitere Reinigungsschritte, direkt der Anionen-Austauscherchromatographie unterzogen. Die aufgetrennten DMB-markierten Oligo-/PolySia-Ketten wurden wie in Abbildung 17 dargestellt, gesammelt und nachfolgend mittels GC/MS analysiert.
Die Chromatogramme wurden im TIC- und EIC-Modus aufgezeichnet, unter Verwendung von B-Typ Fragment Ionen bei *m/z* 348 und *m/z* 376, um zwischen endständigen Neu5Ac (Neu5Ac4,5,7,8,9Me_5) und internen Neu5Ac (Neu5Ac4,5,7,9Me_4) - Resten bei α2,8-verknüpfter PolySia und Neu5Ac (Neu5Ac4,5,6,8Me_4) - Resten bei α2,9-verknüpfter PolySia unterscheiden zu können. Die am GC/MS erhaltenen Chromatogramme zeigten eindeutige Signale für α2,8-verknüpfte Sialinsäuren. Neu5Ac4,5,7,8 Me_4 konnte nicht detektiert werden, was für das Vorhandensein von α2,9-verknüpfter PolySia gesprochen hätte. Insgesamt zeigen die gewonnenen Ergebnisse, dass das neue Verfahren direkt an Gewebe anwendbar ist.

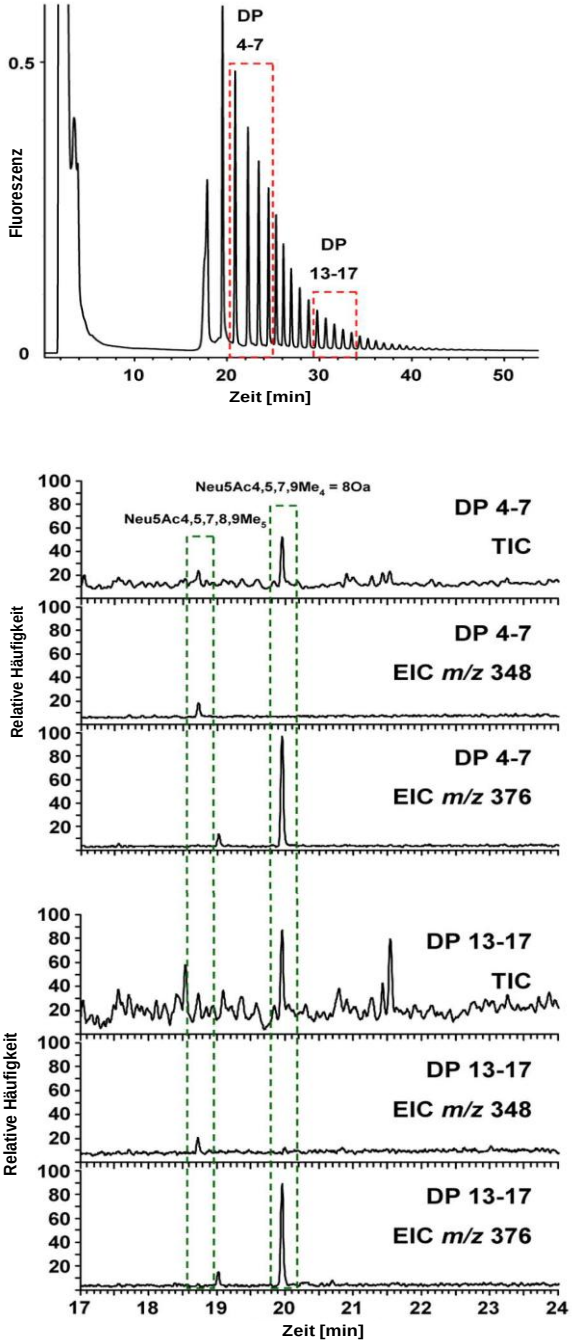


Abbildung 17. Verknüpfungsanalyse von Oligo-/PolySia-Ketten aus (Galuska 2012). Dargestellt ist die Verknüpfungsanalyse von Oligo-/PolySia-Ketten aus postnatalem Mäusegehirn. Das von Lipiden befreite Homogenisat eines Wild-Typ Mäusegehirns wurde direkt einer DMB-Markierung unterzogen. Nach Entfernung von unlöslichem Material wurden 25 % des Überstandes auf einer Anionenaustauscher-Säule aufgetrennt. Zwei Fraktionen mit definierter Kettenlänge (DP 4-7 und DP 13-17) wurden wie gezeigt gesammelt und schließlich deren Verknüpfungen untersucht. Partiell methylierte Sialinsäurederivate wurden im TIC oder EIC Modus betrachtet unter Benutzung von B-Typ Fragment Ionen bei *m/z* 348 und *m/z* 376 zur Detektion von nicht reduzierenden terminalen und internen 8-O-acetylierten (8Oa) Neu5Ac Derivaten (Galuska et al. 2012).

3.2.3 Anwendbarkeit zur Ermittlung potenzieller neuer Tumormarker

Wie bereits erwähnt, ist PolySia auf verschiedensten Tumorzellen nachweisbar (ausführliche Besprechung unter 1.4.3). Möglicherweise kann die beschriebene Analysemethode als effektives Werkzeug dienen, um PolySia als neuen spezifischen Biomarker zur Tumordiagnostik nutzbar zu machen (Zecchini et al. 2010). Zum Nachweis der Durchführbarkeit und Anwendbarkeit an Tumorgewebe wurde Neuroblastomtumorgewebe von transgenetischen TH-MYCN-Mäusen analysiert. Die Mäuse exprimieren das humane MYCN-Onkogen, welches über den Rattentyrosinhydroxylase-Promotor aktiviert wird und ein Tiermodell für Neuroblastome repräsentiert, welches viele Charakteristika dieses hauptsächlich bei Kindern auftretenden Leidens aufweist (Weiss et al. 1997; Hackett et al. 2003). Bisher wurde nicht erforscht, ob zusätzlich zu α2,8- auch α2,9-verknüpfte PolySia bei Tumoren dieses Mäusemodells exprimiert wird. Zur Analyse wurde das Tumorgewebe homogenisiert, von Lipiden befreit und dann direkt DMB-markiert. Fünfzig Prozent der Proben wurden nach der Zentrifugation mittels Anionenaustauscher-Chromatographie aufgetrennt (Abbildung 19 A). Im Gegensatz zu den bisher untersuchten PolySia-Proben zeigten sich keine scharf abgrenzbaren Peaks während der Separierung mittels HPLC. Stattdessen wiesen die registrierten Signale „Peak-Schultern“ auf. Die Fraktion, welche OligoSia-Ketten mit einem Polymerisationsgrad von 3-7 aufwies, wurde wie in Abbildung 19 A gesammelt und nachfolgend Permethylierung und GC/MS-Analyse unterzogen, die die Anwesenheit von Neu5Ac4,5,7,9Me_4 und Neu5Ac4,5,7,8,9Me_5 zeigte (Abbildung 21 B). Um zu detektieren, ob verschiedene Arten von PolySia vorhanden sind, wurden alternative EIC-Bildspuren aufgezeichet um möglicherweise vorhandene B-Fragmente von anderen Sialinsäurederivaten darzustellen. In der Tat zeigte EIC bei *m/z* 378 ein Signal, was auf Neu5Gc(Me)4,5,7,8,9Me_5 (permethyliertes nicht-reduzierende terminale N-glycolylneuraminsäure Neu5Gc) hinweist (Abbildung 19 B). Das entsprechende Elektronenaufschlag-Massenspektrum stellte deutliche Fragmentionen bei *m/z* 169, 284, 328, 348 und 378 dar, welche mit den Fragmentierungsmustern von Neu5Gc(Me)4,5,7,8,9Me_5 übereinstimmten (Inoue et al. 1979) (Abbildung 19 C).

Die Ergebnisse zeigten somit, dass ausschließlich α2,8-verknüpfte Neu5Ac-Reste die internen Bestandteile der PolySia-Ketten sind. Jedoch weisen die terminalen Neu5Gc-Reste darauf hin, dass die PolySia-Ketten wohl nicht nur durch Neu5Ac-Reste terminiert sein können. Ein Umstand der in bisher noch nicht beschrieben wurde.

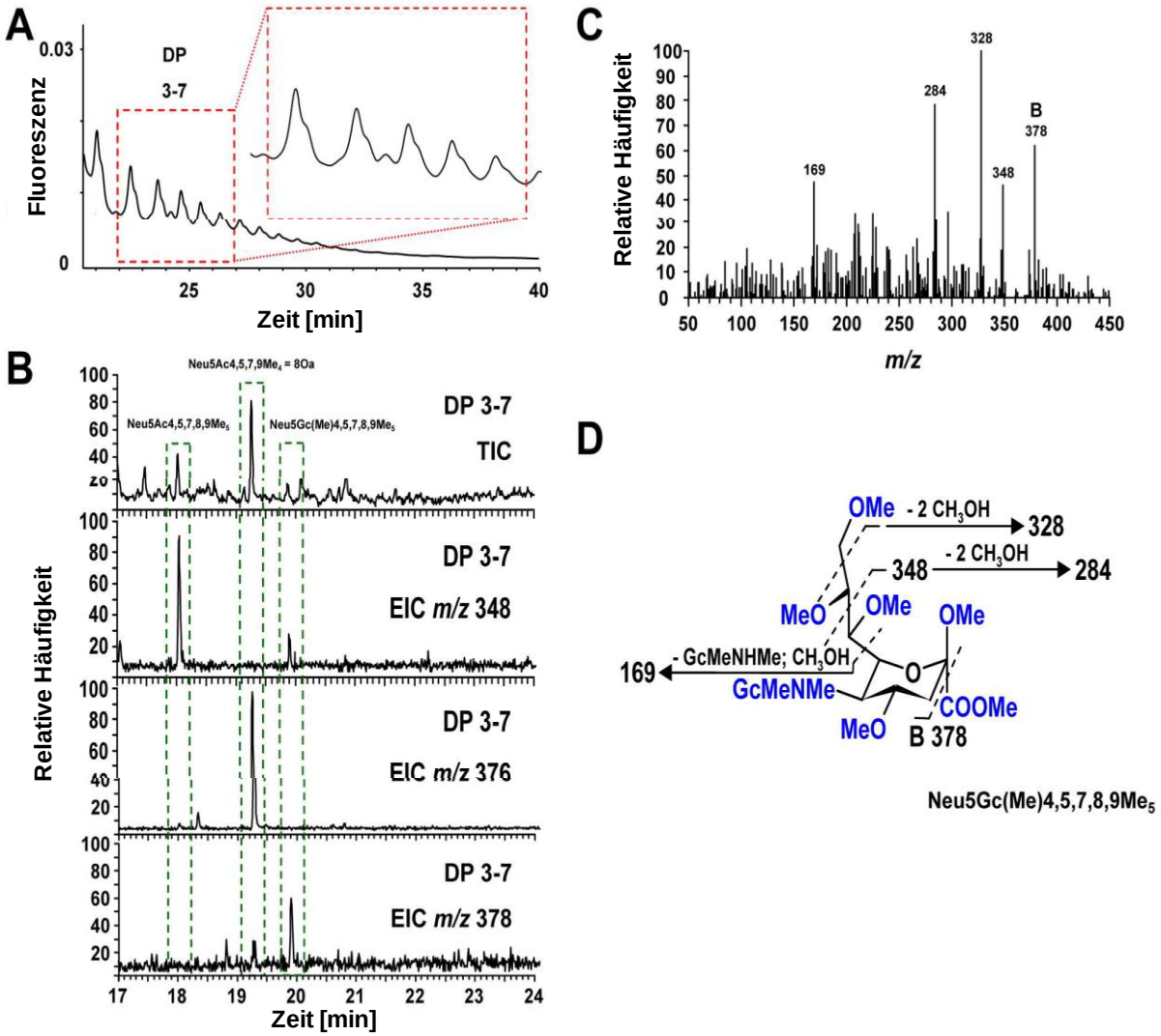


Abbildung 18. Verknüpfungsanalyse von Neuroblastomgewebe aus (Galuska et al. 2012). Dargestellt ist die Analyse der Oligo/PolySia-Ketten von Neuroblastomgewebe. Das Tumorgewebe wurde nach Homogenisation von Lipiden befreit und DMB-markiert. (A) Nach Entfernung von unlöslichem Material durch Zentrifugation wurden 50 % des Überstandes auf einer Anionenaustauscher-Säule aufgetrennt und die Fraktionen, welche OligoSia mit DP 3-7 beinhalten wurden zur weiteren Verknüpfungsanalyse gesammelt. (B). Permethylierte Sialinsäurederivate wurden im TIC oder EIC Modus betrachtet unter Benutzung von B-Typ Fragment Ionen bei *m/z* 348 (zur Detektion von nicht reduzierenden terminalen Neu5Ac), *m/z* 376 (zur Detektion von internen Neu5Ac) und *m/z* 378 (zur Detektion von nicht reduzierenden terminalen Neu5Gc). (C) EIC Massenspektrum von Neu5Gc(Me)4,5,7,8,9Me_5. (D) Fragmentationscharakteristik von permethylierten nicht reduzierenden Neu5Gc (Neu5Gc(Me)4,5,7,8,9Me_5 (Inoue 1979; Galuska 2012).

.

4 Diskussion

4.1 HPLC-Analyse von formalinfixiertem Gewebe

Die DMB-HPLC Methoden wurden bisher nur an frisch gewonnenem Mäusehirn in unserem Labor angewandt, um die Kettenlänge von PolySia zu bestimmen.
Etabliert werden sollte nun eine Methode, um auch die Polysialinsäureverteilung und Kettenlängen an formalinfixiertem Hirngewebe zum Beispiel des humanen Ursprungs analysieren zu können. Dies wäre inbesondere interessant, da erwartet werden darf, dass die Polysialylierung in Abhängigkeit von Alter und Hirnareal, sowie unter pathologischen Bedingungen stark variiert. Gerade im Hinblick auf Hirnareale die in Lern- und Gedächtnisprozesse involviert sind und auch im Alter noch neuronale Regeneration und Plastizität aufweisen, wäre eine Analyse interessant. Ziel war es darzustellen, ob und in welchem Umfang, mit welchem Materialaufwand und gerade auch im Hinblick auf formalinfixierte Gewebe überhaupt ein Nachweis des Polysialylierungsgrades möglich ist. Dies wirft die berechtigte Frage auf, warum überhaupt auf in Formalin konserviertes Material zurückgegriffen werden soll. Analysemethoden sind nicht ubiquitär verfügbar, so dass Gewebe für spätere Untersuchungen haltbar gemacht werden muss. Die Verfügbarkeit von frisch entnommenem Hirnmaterial nach Obduktionen oder Proben von Operationspräparaten nach neurochirurgischen Eingriffen ist eingeschränkt. Im klinischen Alltag werden die Gewebe direkt nach Entnahme in Formalin konserviert, um diese für eine feingewebliche Untersuchung im Rahmen der pathologischen Begutachtung haltbar zu machen. Die sofort einsetzende Autolyse würde sonst eine spätere Begutachtung erschweren und zuverlässige Aussagen nahezu unmöglich machen. Formaldehyd ist der Trivialname für die chemische Verbindung Methanal, das einfachste Aldehyd. Es findet als 4-8% wässrige Formaldehydlösung (Formalin) die oben genannte Anwendung. Durch die Ausbildung von Methylenbrücken und Brücken per Schiff`schen Basen erfolgt die Proteinvernetzung, wobei diese langsamer als die primäre Anlagerung vonstatten geht (Roth 2014).
Da bereits reproduzierbare Ergebnisse (Galuska et al. 2006) von in Stickstoff schockgefrorenen Mäusegehirnen vorlagen, untersuchten wir zunächst die Auswirkungen einer Konservierung mittels Formalin auf die HPLC-Analyse.
Das in Formalin konservierte und ohne weitere Aufarbeitung analysierte Gehirn zeigte im Vergleich zu dem stickstoffgefrorenen Gehirn keine typische Peakverteilung. Es waren lediglich Artefakte erkennbar. Das Resultat könnte auch durch Fehlen von

PolySia im verwendeten Material entstanden bzw. zu wenig Material zur Auftrennung injiziert worden sein, was in Anbetracht der Verwendung von kompletten Gehirnen sowie gleicher Entwicklungsstufe und genetischer Konstellation entstammenden Mäusen ausgeschlossen ist. Dies auch vor dem Hintergrund, dass in späteren Versuchen Chromatogramme mit deutlichen Peaks nach Fixierung mit Formalin resultierten. Ein wie bereits beschrieben vermuteter Fehler bei Zugabe des DMB-Puffers beziehungsweise dessen Reaktionsfähigkeit erscheint durch mehrfache Wiederholung des Experiments und Neuansetzen des Puffers bei ähnlichen resultierenden Chromatogrammen als abwegig. Als mögliche Ursache der fehlenden Einzelpeaks und Artefakte nahmen wir zum Einen an, dass PolySia durch Formalin quervernetzt werden könnte und zogen zum Anderen einen Funktionsverlust des Fluoreszenzpuffers nach Zugabe zur Probe in Betracht. Dieser Funktionsverlust könnte auf einer Reaktion des, noch im Gehirn enthaltenen, Formalins mit DMB basieren, da dieses zwei primäre Aminogruppen aufweist, die durch Formalin quervernetzt werden könnten. In den unter 3.1.3 dargestellten Versuchen untersuchten wir, ob die Dauer der Formalinfixierung des Hirngewebes einen Einfluss auf die Detektierbarkeit von PolySia hat und somit eine Möglichkeit besteht, den anscheinend durch Quervernetzung stattfindenden Funktionsverlust unserer Fluoreszenzmarkierung zu umgehen. Durch Inkubation in Aqua dest. gelang es wie dargestellt, eine Abschwächung der formalininduzierten Effekte zu erreichen, wenn auch in noch unbefriedigendem Maß. Die präanalytische Gefriertrocknung des Gewebes bei längeren Inkubationszeiten brachte den gewünschten Erfolg. Nach Behandlung mit Aqua dest. und Glycin waren die Signale der sich ergebenden Chromatogramme gut voneinander abgrenzbar. Zudem wurde eine Quantifizierung der Peakfläche sowie eine Bestimmung der Kettenlänge möglich.

Die zuvor klar ersichtliche Diskrepanz zu Chromatogrammen, die nach Analyse von stickstoffkonservierten Gehirnen mit nachfolgender Chloroform-Methanol-Extraktion resultierten, waren aufgehoben. Der Versuchsansatz lieferte deutliche Signale von DMB-markierten Oligo-/PolySia-Ketten bei formalinfixiertem Hirngewebe, die mit nicht formalinfixiertem Gewebe vergleichbar waren.

Ausschlaggebend dürfte zusätzlich zur zweimalig längerdauernden Inkubationszeit in Glycin oder Aqua dest. vor allem die Gefriertrocknung gewesen sein, da so vorab aufgrund der Flüchtigkeit mehr Formalinmoleküle entfernt worden sind. Der Funktionsverlust des DMB-Reagenz sollte somit dem im Probenmaterial verbliebenen Formalin geschuldet sein. Einhergehend mit einer Markierung der Polysialinsäureketten ohne parallel ablaufende überwiegende Quervernetzung des DMB.

Eine erwartete zusätzliche Verbesserung der Analysebedingungen und resultierenden Chromatogramme blieb jedoch im direkten Vergleich zwischen präanalytisch mit 50 mM Glycin und Aqua dest. behandelten Gehirnen aus. Die Zugabe von Substanzen mit primären Aminogruppen scheint keine messbare zusätzliche Verbesserung der Versuchsbedingungen zu erbringen.
Auch die beschriebene Modifikation der Derivatisierungszeiten brachte, wie auch verringerte Volumina des DMB-Puffers bzw. gesteigerte Injektionsvolumina, ebenfalls keine Optimierung. Die mehrfache Inkubation mit Glycin in ansteigenden Konzentrationen 50mM/200mM und schließlich 1 M hatte eher negativen Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse (Daten nicht gezeigt). Somit zeigen unsere Ergebnisse, dass durch Gefriertrocknung und anschließende Inkubation mit Aqua dest. mit formalinfixiertem und frischem Gewebe vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können.

4.2 Verknüpfungsanalyse von Oligo-/Polysialinsäuren

Bisher waren Verknüpfungsanalysen von Oligo-/Polysialinsäuren von biologischen Proben auf Kernspinresonanzspektroskopie oder klassische GC/MS-Methylierungsanalysen, aufgrund des hohen Materialaufwands, beschränkt. Somit konnten diese zum Beispiel auch nur bei Bakterien oder Seeigelspermien eine Anwendung finden. Es ist bekannt, dass α2,9-verknüpfte Polymere (Inoue and Inoue 2003) auf Karzinomzellen humanen Ursprungs exprimiert werden, über die Position oder physiologische Funktion der α2,9-verknüpften Sialinsäurereste aber wiederum liegen keine Erkenntnisse vor. Es bedarf somit der Entwicklung neuer analytischer Methoden, um einmal α2,9-verknüpfte Oligo-/PolySia nachzuweisen, die andererseits wiederum aber auch direkt an Geweben und Organen von Säugetieren bzw. humanen Ursprungs anwendbar wäre. Diese könnten wiederum als Screeningverfahren an biologischen Proben, auf der Suche nach genannten Polysialinsäurepolymeren, angewandt werden, um so neue Ergebnisse über die Einflüsse von Oligo-/PolySia auf biologische Prozesse herauszuarbeiten. Die von uns an Colominsäurestandard angewandte Methode bietet eine hochsensitive und zugleich reproduzierbare Möglichkeit der Verknüpfungsanalyse, da eine sensitive Detektion der Sialinsäurederivate erreicht worden ist. Die Verknüpfunganalyse basiert auf einer Permethylierung von Oligo-/Polysialinsäuren nachdem die reduzierenden Enden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DMB markiert wurden. Durch die DMB-Markierung kann das Detektionslimit signifikant erhöht werden und glykosidische Verknüpfungen werden

einer effektiven Bestimmung zugänglich gemacht. Optional können fluoreszenzmarkierte Oligo-/PolySia-Derivate mit Hilfe der Anionenaustauscher-Chromatographie aufgetrennt und so nur speziell interessierende Fraktionen der Proben zur späteren Methylierung gesammelt werden. Weiterhin ist das Versuchsprotokoll direkt an Proben von Säugetieren oder auch humanen Ursprungs anwendbar und mehrere aufwendige Reinigungsschritte entfallen (Galuska 2012). Im Rahmen der Forschung über neoplastisches Metastasierungsverhalten könnten weitere dezidierte Erkenntnisse gewonnen werden und neue molekulare Biomarker auch für verschiedene andere Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Multiple Sklerose entwickelt werden. Es könnte auch nach Entnahme von Biopsien eine Analyse erfolgen, die Ergebnisse mit tumorspezifischen Analysedaten verglichen werden und somit eine pathologische Begutachtung erleichtert und ggf. auch immunologische Nachweismethoden abgelöst werden. Die Forschungsbemühungen stünden dann im Zeichen der klinischen Prognoseeinschätzung und auch Ausarbeitung neuer Therapieansätze mit möglicherweise großem Einfluss auf bestehende Therapiealgorithmen. In Zukunft könnten so auch spezifische Antikörper designt werden, die gegen tumorspezifische Polysialinsäureketten gerichtet sind und eine Tumorbekämpfung ohne systemische Nebenwirkungen ermöglichen. Im Rahmen der Unterscheidung zwischen α2,8-verknüpfter und α2,9-verknüpfter Oligo-/PolySia kann die Massenspektrometrie angewandt werden, da die Laktonisierungsrate zwischen den beiden Molekülen verschieden ist. Die Verknüpfungsposition kann jedoch nur indirekt bestimmt werden und außerdem ist mehr als 0,1 µg Oligo-/PolySia im Falle von α2,9-verknüpfter PolySia für die Analyse notwendig. Fluorometrische C7/C9-Analysen kommen nur zum Nachweis des puren Vorhandenseins von α2,8-verknüpften Polysianlinsäuren in Betracht, da α2,9-verknüfte Sialinsäurereste nicht die Oxidierung interner Sialinsäurereste verhindern (Inoue and Inoue 2003). Auch immunologische Nachweismethoden wie Western Blot erfahren hier ihre Grenzen der Anwendbarkeit, da aktuell nur Antikörper gegen α2,8-verknüpfte Polysialinsäure mit einer minimalen Kettenlänge von 7 Sialinsäureresten erhältlich sind. Zu nennen wäre der monoklonale Antikörper 735 (Frosch et al. 1985), welcher Spezifität im Hinblick auf α2,8-verknüfte PolySia (Husmann et al. 1990) aufweist und an die helikale Konformation der internen Region von PolySia-Ketten bindet. Dabei ist eine minimale Anzahl von acht Sialinsäureresten erforderlich, um diese helikale Konformation aufrecht zu erhalten (Michon et al. 1987; Brisson et al. 1992; Evans et al. 1995), da deren Ausbildung von der Kettenlänge abhängig ist (Michon et al. 1987). Die Affinität des Antikörpers scheint mit ansteigender Kettenlänge größer zu werden (Jennings et al. 1984; Finne and Makela 1985; Jennings et al. 1985; Kabat et al. 1988; Hayrinen et al. 1989). Terminale

Reste des nicht reduzierenden Endes spielen bei der Antigenerkennung mit 735er mAk keine Rolle (Sato 1999).

4.2.1 Anwendbarkeit der Methode an biologischen Proben

Um aufzuklären, ob die beschriebene Methylierungsanalyse auch direkt an biologischen Proben anwendbar ist, analysierten wir die glykosidischen Verknüpfungen von Oligo-/PolySia-Ketten aus postnatalem Mäusegehirn wie unter 2.9 beschrieben und in Abbildung 17 dargestellt. Die Chromatogramme wurden im TIC und EIC Modus aufgezeichnet unter Verwendung von B-Typ Fragment Ionen bei *m/z* 348 und *m/z* 376, um zwischen endständigen Neu5Ac (Neu5Ac4,5,7,8,9Me_5) und internen α2,8 Neu5Ac (Neu5Ac4,5,7,9Me_4) und α2,9 (Neu5Ac4,5,7,8 Me_4) verknüpften Resten unterscheiden zu können. Bei der Retentionszeit von Neu5Ac4,5,7,8Me_4 wurden keine Signale detektiert. Nur Neu5Ac4,5,7,9 Me_4 wurde detektiert. Dies zeigt, dass postnatales Hirngewebe von Mäusen ausschließlich α2,8-verknüpfte PolySia enthält. Die Methode kann auch an zuvor formalinfixiertem Hirngewebe durchgeführt werden, welches zuvor in Glycinpuffer inkubiert wurde.
Die Resultate lassen erkennen, dass die glykosidischen Verknüpfungen der Sialinsäurepolymere eindeutig direkt aus Säugerorganen bestimmt werden können, ohne umfassende Aufreinigung und unabhängig von den Kettenlängen der analysierten Proben. Folglich ist das beschriebene Verfahren exzellent für eine hochempfindliche Verknüpfungsanalyse von Oligo-/PolySia-Arten geeignet, die in biologischen Materialien vorhanden sind (Galuska et al. 2012).

4.2.2 Anwendbarkeit zur Ermittlung potenzieller neuer Tumormarker

Zum Nachweis der Durchführbarkeit und Anwendbarkeit als Tumormarker wurde Neuroblastomtumorgewebe von transgenetischen TH-MYCN Mäusen analysiert.
Die während der Auftrennung mittels HPLC erhaltenen Chromatogramme wiesen keine scharf abgrenzbaren Peaks, sondern Peak-Schultern auf. Dieses Ergebnis weist auf das Vorhandensein von zwei PolySia Spezies mit unterschiedlichen, wenn auch nahe beeinander liegenden, Retentionszeiten hin.
Um diese Hypothese zu hinterfragen, wurde eine Fraktion von OligoSia-Ketten die einen Polymerisationsgrad von 3-7 beinhaltete, wie in Abbildung 18A gesammelt und nachfolgend Permethylierung unterzogen. Die GC/MS Analyse enthüllte die Anwesenheit von Neu5Ac4,5,7,9Me_4 und Neu5Ac4,5,7,8,9Me_5, was darlegt, dass der größte Teil der Sialinsäurepolymere aus α2,8-verknüpften Neu5Ac Resten besteht.

Das EIC Profil bei *m/z* 376 schloss das Vorhandensein von Neu5Ac4,5,7,8Me_4 und somit von α2,9-verknüpfter PolySia aus. Durch die Aufzeichnung alternativer Massenspuren konnten jedoch vorhandene B-Fragmente von anderen Sialinsäurederivaten dargestellt werden. Das EIC zeigte bei *m/z* 378 ein Signal, welches auf Neu5Gc(Me)4,5,7,8,9Me_5 (Reaktionsprodukte von am nicht-reduzierenden Ende vorhandener N-glycolylneuraminsäure Neu5Gc) hinweist. Zur Verifizierung des erhaltenen Signals erfolgte die Darstellung des entsprechenden Elektronenaufschlag-Massenspektrums. Dieses offenbarte deutliche Fragmentionen bei *m/z* 169, 284, 328, 348 und 378, welche, wie bereits erwähnt mit den Fragmentierungsmustern von Neu5Gc(Me)4,5,7,8,9Me_5 übereinstimmen (Inoue et al. 1979). Es wurde beschrieben, dass interne Neu5Gc Reste partiell in Neu5Ac umgewandelt werden können, unter aggressiven Methanolyse Konditionen (Inoue et al. 1979). Aus diesem Grund wandten wir hier milde Methanolyse Konditionen an (0,05 M methanolische HCl über 1 h bei 80 °C), wie bereits für die Analyse von α2,8-verknüpften Neu5Gc Polymeren beschrieben wurde (Inoue et al. 1979). Es konnte kein Signal bei *m/z* 406 detektiert werden. Weiterhin waren die relativen Signalintensitäten von Neu5Ac4,5,7,8,9Me_5, Neu5Ac4,5,7,9Me_4 und Neu5Gc(Me)4,5,7,8,9Me_5 unverändert. Dies zeigt, dass das Fehlen von typischen Fragmentionen für interne Neu5Gc nicht durch eine Konversion von Neu5Gc zu Neu5Ac unter den angewandten Methanolysebedingungen bedingt ist. Man könnte so schlussfolgern, dass ein Teil der Sialsinsäurepolymere in Neuroblastomen von transgenetischen MYCN-Mäusen endständige Neu5Gc aufweisen. Das beschriebene Vorgehen hat sich als hilfreich erwiesen, um Tumorgewebe zur Identifikation von neuen PolySia basierten Biomarkern zu *screenen*. Aufgrund der hohen Sensitivität erlaubt die Methode selbst bei kleinen Gewebemengen (Biopsien) die Identifikation vorkommender Sialinsäurearten sowie die Verknüpfungsanalyse der Monomerbestandteile (Galuska et al. 2012).

5 Zusammenfassung

Die posttranslationale Polysialylierung des neuralen Zelladhäsionsmoleküls NCAM spielt eine wichtige Rolle während der neonatalen Hirnentwicklung, bei funktionellen Prozessen des Nervensystems und Regeneration von neuronalen Strukturen.

Im Rahmen dieser Arbeit evaluierten wir Methoden zur *in situ* Charakterisierung der Polysialylierung des neuralen Zelladhäsionsmoleküls NCAM. Bedingt durch die große Verfügbarkeit an meist formalinfixiertem Material war es von Interesse, die Analysemethoden zur Detektion von PolySia zu adaptieren, da diese bisher nur an frisch gewonnenem Material eingesetzt wurden. Erste Untersuchungen stellten die Auswirkung der Konservierung mittels Formalin auf den Nachweis des Polysialylierungsgrades des Gewebes mittels chromatographischer Methoden dar. Durch diverse präanalytische Aufreinigungsschritte gelang es schließlich, die von Inaktivierung des Fluoreszenzfarbstoffs herrührenden Artefakte zu eliminieren, mit typischer Peak-Verteilung. Die letztlich reproduzierbaren Chromatogramme mit der Möglichkeit der Kettenlängenbestimmung stimmten mit den erhaltenen Signalen von DMB-markierten Oligo-/PolySia-Ketten an frischem Probenmaterial überein.

Auch bei der Pathogenese von neoplastischer Metastasierung kommt PolySia-NCAM, aufgrund der Korrelation zwischen dem Gehalt an polysialyliertem NCAM und dem Metastasierungspotenzial eine außerordentliche Bedeutung zu. Mit der Verknüpfungsanalyse, basierend auf einer Permethylierung von Oligo- und Polysialinsäuren nach Markierung mit DMB, gelang es, das Detektionslimit signifikant zu erhöhen, mit dem unschätzbaren Vorteil der direkten Anwendbarkeit an frisch gewonnenem Gewebe ohne vorangehende Reinigungsschritte. Selbst bei kleinen Probenmengen, gleich welchen Ursprungs, eignet sich das beschriebene Verfahren aufgrund der hohen Sensitivität exzellent zur Identifikation vorkommender Sialinsäurearten und zur Verknüpfungsanalyse der Monomerbestandteile. Im klinischen Rahmen besteht damit die Möglichkeit, neue Erkenntnisse bezüglich des Einflusses von PolySia auf biologische Prozesse zu gewinnen. Außerdem könnten so neue PolySia-basierte Biomarker für neuronale bzw. neoplastische Erkrankungen etabliert werden, Biopsien umgehend analytisch aufgearbeitet und die pathologische Begutachtung erleichtert werden. Dies alles steht auch vor dem Hintergrund möglicher Prognoseeinschätzung, Abschätzung des Metastasierungsverhaltens von Tumoren und Entwicklung neuer krankheitsspezifischer Therapieansätze.

6 Summary

The post-translational polysialylation of the neural cell adhesion molecule (NCAM), a member of the immunoglobulin superfamily, has been discussed playing an important role during brain development, functional processes of the nervous system and the regeneration of neuronal structures. In this study, we evaluated methods for in situ characterization of the polysialylation of the neural cell adhesion molecule NCAM. Due to the wide availability of formalin fixed tissue, it was of interest to adapt the methods of analysis for the detection of polySia, as these have been used only on freshly obtained material. Initial studies revealed the effect of the preservation by formalin on the degree of detection of polysialylation of the tissue by means of chromatographic methods. Through various preanalytical purification steps we were finally able to eliminate the artifacts stemming from inactivation of the fluorescent dye, with typical peak distribution. The reproducible chromatograms with the possibility of determining chain length were consistent with the signals obtained from DMB-labeled oligo-/polySia chains of fresh sample material. Also in the pathogenesis of neoplastic metastasis polySia-NCAM has an extraordinary relevance, due to the correlation between the content of polysialylated NCAM and the metastasis potential. With the linkage analysis, based on a permethylation of oligo-/polysialic acids after DMB-labeling we succeeded in increasing the detection limit significantly with the inestimable advantage of direct applicability to freshly obtained tissue without prior cleansing steps. Even with small amounts of sample, irrespective of their origin, the method described is suitable for identification of occurring sialic acid species and glycosidic linkage analysis of the monomer components because of its high sensitivity. In the clinical setting, there is the possibility of yielding new findings about the influence of polySia on biological processes. In addition, new polySia-based biomarkers for neuronal or neoplastic diseases could be established, biopsies processed immediately analyzed and pathological assessments be facilitated. All this stands against the background of possible prognostic assessment, rating of metastatic invasion of tumors and the development of new disease-specific therapeutic approaches.

7 Abkürzungsverzeichnis

AcN	Acetonitril
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazole
Ak	Antikörper
AmAc	Ammoniumacetat
Aqua dest.	*Aqua destillata*
BDNF	*Brain Derived Neurotrophic Factor*
BSA	*Albumin from bovine serum*
Col. Acid	*Colominic Acid* (Colominsäure)
Cy3	Indocarbocyanin
DMB	1,2-Diamino-4,5-Methylenedioxybenzene
DP	*degree of polymerisation*
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIC	*extracted ion*-Chromatogramm
ELISA	*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
EndoN	Endoneuraminidase
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
gr	Gramm
h	Stunde
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HPLC	*high pressure liquid chromatography*
HRP	*horseradish peroxidase*; Meerrettich-Peroxidase
IgSF	Immunglobulinsuperfamilie
kg	Kilogramm
LM	Laufmittel
Lsg.	Lösung
Lyo	Gefriertrockner
lyophilisieren	gefriertrocknen
mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minute
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie

NaAc	Natriumacetat
NCAM	*neural cell adhesion molecule*
Ncl.	*Nucleus*
Nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NSCLC	*Non-small cell lung carcinoma*
p. a.	*pro analysis*
PBS	*phosphate-buffered saline*
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PolySia	*polysialic acid*, Polysialinsäure
PSGP	Polysialoglykoprotein
RP	*reversed-phase*
RT	Raumtemperatur
RTq-PCR	*Real-Time quantitative* PCR
SCLC	*Small cell lung carcinoma*
SynCAM	*synaptic cell adhesion molecule*
qPCR	*quantitative Polymerase Chain Reaction*
TBS	*Tris-buffered saline*
TEA	Triethylamin
Temp.	Temperatur
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	*total ion*-Chromatogramm
TMB	3,3´,5´,5-Tetramethylbenzidine
US	Ultraschall
ü. N.	über Nacht

8 Abbildungs-/Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Strukturen der drei häufigsten Sialinsäuren. 3
Abbildung 2 Verknüpfungen von Sialinsäure Oligo-/Polymeren. 4
Abbildung 3 Hauptisoformen von poylsialyliertem NCAM. 11
Abbildung 4 Regulation der NCAM-NCAM Wechselwirkung. 13
Abbildung 5 Interaktion der Polysialyltransferasen mit NCAM. 23
Abbildung 6 Schema DMB-Markierung 26
Abbildung 7 HPLC-Analyse des Standards Colominsäure 39
Abbildung 8 HPLC-Analyse von stickstoffgefrorenem Gehirn. 40
Abbildung 9 HPLC-Analyse eines formalinfixierten Gehirns 41
Abbildung 10 HPLC-Analyse formalinkubierter Colominsäure. 42
Abbildung 11 HPLC-Analyse eines 48 h formalinfixierten Gehirn. 43
Abbildung 12 HPLC-Analyse eines Gehirns nach Aqua dest.-Inkubation 44
Abbildung 13 HPLC-Analyse des Standards Colominsäure. 45
Abbildung 14 HPLC-Analyse nach Gefiertrocknung/Aqua dest.-Inkubation. 46
Abbildung 15 HPLC-Analyse nach Gefriertrocknung/Glycininkubation 47
Abbildung 16 Schema DMB-Markierung und Verknüpfungsanalyse. 49
Abbildung 17 Verknüpfungsanalyse von Oligo-/PolySia-Ketten. 51
Abbildung 18 Verknüpfungsanalyse von Neuroblastomgewebe. 53

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Laufmittelgradient bei HPLC-Analyse 33
Tabelle 2 Laufmittelgradient Trennung DMB-markierte Oligo-/PolySia 35
Tabelle 3 GC-Trennung Temperaturprogramm 36
Tabelle 4 GC/MS Probentrennung Temperaturprogramm 37

9 Literaturverzeichnis

Aitken, R. J., et al. (2007). "Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation." Asian J Androl 9(4): 554-564.

Albach, C., et al. (2004). "Identification of N-glycosylation sites of the murine neural cell adhesion molecule NCAM by MALDI-TOF and MALDI-FTICR mass spectrometry." Anal Bioanal Chem 378(4): 1129-35.

Alghamdi, A. S., et al. (2005). "Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps." Biol Reprod 73(6): 1174-1181.

Amoureux, M., et al. (2010). "Polysialic Acid Neural Cell Adhesion Molecule (PSA-NCAM) is an adverse prognosis factor in glioblastoma, and regulates olig2 expression in glioma cell lines." BMC Cancer 10(91): 1471-2407.

Angata, K., et al. (2004). "Molecular dissection of the ST8Sia IV polysialyltransferase: Distinct domanis are required for NCAM recognition and polysialylation." J Biol Chem 279(11): 25883-90.

Angata, K., et al. (2003). "Polysialyltransferases: major players in polysialic acid synthesis on the neural cell adhesion molecule." Biochimie 85(1-2): 195-206.

Angata, K., et al. (2004). "Sialyltransferase ST8Sia-II assembles a subset of polysialic acid that directs hippocampal axonal targeting and promotes fear behavior." J Biol Chem 279(31): 32603-13.

Angata, K., et al. (1997). "Human STX polysialyltransferase forms the embryonic form of the neural cell adhesion molecule. Tissue-specific expression, neurite outgrowth, and chromosomal localization in comparison with another polysialyltransferase, PST." J Biol Chem 272(11): 7182-90.

Angata, K., et al. (1998). "Differential and cooperative polysialylation of the neural cell adhesion molecule by two polysialyltransferases, PST and STX." J Biol Chem 273(43): 28524-32.

Angata, K., et al. (2002). "ST8Sia II and ST8Sia IV polysialyltransferases exhibit marked differences in utilizing various acceptors containing oligosialic acid and short polysialic acid. The basis for cooperative polysialylation by two enzymes." J Biol Chem 277(39): 36808-17.

Angata, T. and A. Varki (2002). "Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective." Chem Rev 102(2): 439-69.

Atkins, A. R., et al. (2001). "Solution structure of the third immunoglobulin domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM: can solution studies define the mechanism of homophilic binding?" J Mol Biol 311(1): 161-72.

Barbeau, D., et al. (1995). "Decreased expression of the embryonic form of the neural cell adhesion molecule in schizophrenic brains." Proc Natl Acad Sci U S A 92(7): 2785-9.

Barral-Moran, M., et al. (2003). "Oligodendendrocyte progenitor migration in response to injury of glial monolayers requires the polysialic neural cell-adhesion molecule." J Neurosci Res 72: 679-690.

Baumann, H., et al. (1993). "Comparison of the conformation of the epitope of alpha(2-->8) polysialic acid with its reduced and N-acyl derivatives." Biochemistry 32(15): 4007-13.

Becker, C. G., et al. (1996). "The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation." J Neurosci Res 45(2): 143-52.

Bendel, O., et al. (2005). "Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory." J Cereb Blood Flow Metab 25(12): 1586-95.

Benson, D. L., et al. (2000). "Making memories stick: cell-adhesion molecules in synaptic plasticity " Trends Cell Biol 10: 473-482.
Bevilacqua, M. P. (1993). "Endothelial-leukocyte adhesion molecules." Annu Rev Immunol 11: 767-804.
Bevilacqua, M. P., et al. (1987). "Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule." Proc Natl Acad Sci U S A 84(24): 9238-42.
Bhattacharjee, A. K., et al. (1975). "Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of Neisseria meningitidis serogroups B and C with carbon 13 nuclear magnetic resonance." J Biol Chem 250(5): 1926-32.
Biederer, T., et al. (2002). "SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly." Science 297: 1525-1531.
Bonfanti, L. (2006). "PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis." Prog Neurobiol 80(3): 129-64.
Bork, K., et al. (2005). "The intracellular concentration of sialic acid regulates the polysialylation of the neural cell adhesion molecule." FEBS Lett 579(22): 5079-5083.
Bosman, F. T. (1993). "Integrins: cell adhesives and modulators of cell function." Histochem J 25(7): 469-77.
Bourne, S., et al. (1991). "A monoclonal antibody (ERIC-1), raised against retinoblastoma, that recognizes the neural cell adhesion molecule (NCAM) expressed on brain and tumours arising from the neuroectoderm. ." J Neurooncol 10(2): 111-119.
Brackenbury, R., et al. (1977). "Adhesion among neural cells of the chick embryo. I. An immunological assay for molecules involved in cell-cell binding." J Biol Chem 252(19): 6835-40.
Brill, A., et al. (2012). "Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice." J Thromb Haemost 10(1): 136-144.
Brinkmann, V., et al. (2004). "Neutrophil extracellular traps kill bacteria." Science 303(5663): 1532-1535.
Brisson, J. R., et al. (1992). "Helical epitope of the group B meningococcal alpha(2-8)-linked sialic acid polysaccharide." Biochemistry 31(21): 4996-5004.
Bruses, J. L. and U. Rutishauser (2001). "Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development." Biochimie 83(7): 635-43.
Caudrillier, A., et al. (2012). "Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury." J Clin Invest 122(7): 2661-2671.
Chao, C. F., et al. (1999). "On the biosynthesis of alternating alpha-2,9/alpha-2,8 heteropolymer of sialic acid catalyzed by the sialyltransferase of Escherichia coli Bos-12." J Biol Chem 274(26): 18206-12.
Charles, P., et al. (2000). "Negative regulation of central nervous system myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule." Proc Natl Acad Sci U S A 97(13): 7585-90.
Charles, P., et al. (2002). "Re-expression of PSA-NCAM by demyelinated axons: an inhibitor of remyelination in multiple sclerosis ?" Brain: A Journal of Neurology 125(Pt 9): 1972-9.
Charter, N. W., et al. (2000). "Biosynthetic incorporation of unnatural sialic acids into polysialic acid on neural cells." Glycobiology 10(10): 1049-56.
Chen, H., A., et al. (1997). "Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III." Neuron 19(3): 547-59.
Cheresh, D. A. (1991). "Integrins in thrombosis, wound healing and cancer." Biochem Soc Trans 19(4): 835-8.
Cheung, I. Y., et al. (2006). "Sialyltransferase STX (ST8SiaII): a novel molecular marker of metastatic neuroblastoma." Int J Cancer 119(1): 152-6.
Churg, A., et al. (2012). "Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Matrix metalloproteinases in COPD." Eur Respir J 39(1): 197-209.

Close, B. E. and K. J. Colley (1998). "In vivo autopolysialylation and localization of the polysialyltransferases PST and STX." J Biol Chem 273(51): 34586-93.

Close, B. E., et al. (2003). "The minimal structural domains required for neural cell adhesion molecule polysialylation by PST/ST8Sia IV and STX/ST8Sia II." J Biol Chem 278(33): 30796-805.

Close, B. E., et al. (2000). "Polysialyltransferase-1 autopolysialylation is not requisite for polysialylation of neural cell adhesion molecule." J Biol Chem 275(6): 4484-91.

Close, B. E., et al. (2001). "The polysialyltransferase ST8Sia II/STX: posttranslational processing and role of autopolysialylation in the polysialylation of neural cell adhesion molecule." Glycobiology 11(11): 997-1008.

Comstock, L. E. and D. L. Kasper (2006). "Bacterial glycans: key mediators of diverse host immune responses." Cell 126(5): 847-50.

Cremer, H., et al. (1997). "NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus." Mol Cell Neurosci 8(5): 323-35.

Cremer, H., et al. (1998). "Long-term but not short-term plasticity at mossy fiber synapses is impaired in neural cell adhesion molecule-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A 95: 13242-13247.

Cremer, H., et al., (1994). "Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning." Nature 367: 455-459.

Crocker, P. R., et al. (2007). "Siglecs and their roles in the immune system." Nat Rev Immunol 7(4): 255-66.

Cunningham, B. A., et al. (1987). "Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing." Science 236(4803): 799-806.

Curreli, S., et al. (2007). "Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions." J Biol Chem 282(42): 30346-56.

Danen, E. H. and A. Sonnenberg (2003). "Integrins in regulation of tissue development and function." J Pathol 201(4): 632-41.

Daniel, L., et al. (2001). "A nude mice model of human rhabdomyosarcoma lung metastases for evaluating the role of polysialic acids in the metastatic process." Oncogene 20(8): 997-1004.

Daniel, L., et al. (2000). "Polysialylated-neural cell adhesion molecule expression in rat pituitary transplantable tumors (spontaneous mammotropic transplantable tumor in Wistar-Furth rats) is related to growth rate and malignancy." Cancer Res 60(1): 80-5.

De Stefano, M. E., et al. (2001). "Polysialylated neural cell adhesion molecule is involved in the neuroplasticity induced by axonal injury in the avian ciliary ganglion." Neuroscience 103(4): 1093-104.

Doherty, P., et al. (1990). "Neurite outgrowth in response to transfected N-CAM changes during development and is modulated by polysialic acid." Neuron 5(2): 209-19.

Doyle, E., et al. (1992). "Hippocampal NCAM180 transiently increases sialylation during the acquisition and consolidation of a passive avoidance response in the adult rat." J Neurosci Res 31(3): 513-23.

Doz, E., et al. (2008). "Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent." J Immunol 180(2): 1169-1178.

Durbec, P., et al. (2001). "Revisiting the function of PSA-NCAM in the nervous system." Mol. Neurobiol. 24: 53-64.

Eckhardt, M., et al. (2000). "Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SiaIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and

polysialic acid in neural development and synaptic plasticity." J Neurosci 20(14): 5234-44.
Eckhardt, M. and R. Gerardy-Schahn (1998). "Genomic organization of the murine polysialyltransferase gene ST8SiaIV (PST-1)." Glycobiology 8(12): 1165-72.
Eckhardt, M., et al. (1995). "Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1." Nature 373(6516): 715-8.
Edelman, G. M. (1985). "Cell adhesion and the molecular processes of morphogenesis." Annu Rev Biochem 54: 135-69.
El Maarouf, A., et al. (2006). "Use of polysialic acid in repair of the central nervous system." Proc Natl Acad Sci U S A 103(45): 16989-94.
Evans, S. V., et al. (1995). "Evidence for the extended helical nature of polysaccharide epitopes. The 2.8 A resolution structure and thermodynamics of ligand binding of an antigen binding fragment specific for alpha-(2-->8)-polysialic acid." Biochemistry 34(20): 6737-44.
Falconer, R., et al. (2012). "Polysialyltransferase: a new target in metastatic cancer." Curr Cancer Drug Targets 12(8): 925-39.
Favier, B., et al. (2006). "Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration." Blood 108(4): 1243-50.
Fewou, S. N., et al. (2007). "Down regulation of polysialic acid is required for efficient myelin formation." J Biol Chem 282(22): 16700-11.
Figarella-Branger, D. F., et al. (1990). "Differential spectrum of expression of neural cell adhesion molecule isoforms and L1 adhesion molecules on human neuroectodermal tumors." Cancer Res 50(19): 6364-70.
Finne, J. (1982). "Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain." J Biol Chem 257(20): 11966-70.
Finne, J., et al. (1977). "The disialosyl group of glycoproteins. Occurrence in different tissues and cellular membranes." Eur J Biochem 77(2): 319-23.
Finne, J. and P. H. Makela (1985). "Cleavage of the polysialosyl units of brain glycoproteins by a bacteriophage endosialidase. Involvement of a long oligosaccharide segment in molecular interactions of polysialic acid." J Biol Chem 260(2): 1265-70.
Fogel, A. I., et al. (2007). "SynCAMs organize synapses through heterophilic adhesion." J Neurosci 27(46): 12516-12530.
Franceschini, I., et al. (2001). "Polysialyltransferase ST8Sia II (STX) polysialylates all of the major isoforms of NCAM and facilitates neurite outgrowth." Glycobiology 11(3): 231-9.
Frosch, M., et al. (1985). "NZB mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens: isolation of an IgG antibody to the polysaccharide capsules of Escherichia coli K1 and group B meningococci." Proc Natl Acad Sci U S A 82(4): 1194-8.
Fuchs, T. A., et al. (2011). "Histones induce rapid and profound thrombocytopenia in mice." Blood 118(13): 3708-3714.
Fuchs, T. A., et al. (2012). "Neutrophil Extracellular Trap (NET) Impact on Deep Vein Thrombosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol 32(8): 1777-1783.
Fujimoto, I., et al. (2001). "Regulation of cell adhesion by polysialic acid. Effects on cadherin, immunoglobulin cell adhesion molecule, and integrin function and independence from neural cell adhesion molecule binding or signaling activity." J Biol Chem 276(34): 31745-51.
Gagiannis, D., et al. (2007). "Engineering the sialic acid in organs of mice using N-propanoylmannosamine." Biochim Biophys Acta 1770(2): 297-306.
Gallatin, W. M., et al. (1983). "A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes." Nature 304(5921): 30-4.
Gallin, W. J., et al. (1983). "Characterization of L-CAM, a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells." Proc Natl Acad Sci U S A 80(4): 1038-42.

Galuska, S. P. (2008). Charakterisierung der Glykosylierungseigenschaften der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV in vivo. Fachbereich Medizin. Giessen, Justus-Liebig-Universität.

Galuska, S. P. (2013). Identifizierung von polysialylierten Glykoproteinen und Charakterisierung der biologischen Funktionen. Fachbereich Medizin. Giessen, Justus-Liebig-Universität.

Galuska, S. P., et al. (2012). "Glycomic strategy for efficient linkage analysis of di-, oligo- and polysialic acids." J Proteomics 75(17): 5266-78.

Galuska, S. P., et al. (2007). "Characterization of oligo- and polysialic acids by MALDI-TOF-MS." Anal Chem 79(18): 7161-9.

Galuska, S. P., et al. (2010). "Quantification of nucleotide-activated sialic acids by a combiantion of reduction and fluorescent labeling." Anal Chem 82(11): 4591-8.

Galuska, S. P., et al. (2008). "Enzyme-dependent variations in the polysialylation of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in vivo." J Biol Chem 283(1): 17-28.

Galuska, S. P., et al. (2006). "Polysialic acid profiles of mice expressing variant allelic combinations of the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV." J Biol Chem 281(42): 31605-15.

Galuska, S. P., et al. (2010). "Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain." Proc Natl Acad Sci U S A 107(22).

Gascon, E., et al. (2007). "Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: From synapses to integration of new neurons." Brain Res Rev 56(1): 101-118.

Gehring, M. R., et al. (1987). "Sequence of rat liver alpha 2-macroglobulin and acute phase control of its messenger RNA." J Biol Chem 262(1): 446-54.

Geyer, R., et al. (1994). "Saccharide linkage analysis using methylation and other techniques." Methods Enzymol 230: 86-108.

Giger, R. J., et al. (2000). "Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins." Neuron 25(1): 29-41.

Gluer, S., et al. (1998). "Serum polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood neuroblastoma." Br J Cancer 78(1): 106-10.

Gluer, S., et al (1998). "Polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood rhabdomyosarcoma." Pediatr Res 43(1): 145-7.

Goridis, C. and J. F. Brunet (1992). "NCAM: structural diversity, function and regulation of expression." Semin Cell Biol 3(3): 189-97.

Green, P. J., et al. (1995). "Further studies of the binding specificity of the leukocyte adhesion molecule, L-selectin, towards sulphated oligosaccharides--suggestion of a link between the selectin- and the integrin-mediated lymphocyte adhesion systems." Glycobiology 5(1): 29-38.

Hackett, C. S., et al. (2003). "Genome-weide array CGH analysis of murine neuroblastoma reveals distinct genomic aberrations wehich parallel those in human tumors. ." Cancer Res 63(17): 5266-73.

Haile, Y., et al. (2007). "Culturing of glial and neuronal cells on polysialic acid." Biomaterials 28(6): 1163-73.

Hakamori, S. (1964). "A Rapid Permethylation of Glycolipid, and Polysaccharide Catalyzed by Methylsulfinyl Carbanion in Dimethyl Sulfoxide" J Biochem 55: 205-8.

Halbleib, J. M. and W. J. Nelson (2006). "Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis." Genes Dev 20(23): 3199-214.

Hallenbeck, P. C., et al. (1987). "Purification and properties of a bacteriophage-induced endo-N-acetylneuraminidase specific for poly-alpha-2,8-sialosyl carbohydrate units." J Biol Chem 262(8): 3553-61.

Hammond, M. S., et al. (2006). "Neural cell adhesion molecule-associated polysialic acid inhibits NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors and prevents glutamate-induced cell death." J Biol Chem 281(46): 34859-69.

Hara, S., et al. (1987). "Fluorometric high-performance liquid chromatography of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acids and its application to their microdetermination in human and animal sera, glycoproteins, and glycolipids." Anal Biochem 164(1): 138-45.

Hara, S., et al. (1989). "Determination of mono-O-acetylated N-acetylneuraminic acids in human and rat sera by fluorometric high-performance liquid chromatography." Anal Biochem 179(1): 162-6.

Haselhorst, T., et al. (2006). "Endosialidase NF appears to bind polySia DP5 in a helical conformation." Chembiochem 7(12): 1875-7.

Haskill, S., et al. (1988). "Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and proto-oncogenes." J Immunol 140(5): 1690-4.

Hayashi, T., et al. (2001). "Expression of polysialylated neural cell adhesion molecule in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion." Brain Res 907(1-2): 130-3.

Hayrinen, J., et al. (1989). "Interaction of meningococcal group B monoclonal antibody and its Fab fragment with alpha 2-8-linked sialic acid polymers: requirement of a long oligosaccharide segment for binding." Mol Immunol 26(6): 523-9.

He, H. T., et al. (1987). "Biosynthesis, membrane association, and release of N-CAM-120, a phosphatidylinositol-linked form of the neural cell adhesion molecule." J Cell Biol 105(6 Pt 1): 2489-500.

He, Z. and M. Tessier-Lavigne (1997). "Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III." Cell 90(4): 739-51.

Hildebrandt, H., et al. (1998). "Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development." J Neurochem 71(6): 2339-48.

Hildebrandt, H., et al. (1998). "Polysialic acid on the neural cell adhesion melocule correlates with expression of polysialyltransferases an promotes neuroblastoma cell growth." Cancer Res 58(4): 779-784.

Hinsby, A. M., et al. (2004). "Molecular mechanisms of NCAM function." Front Biosci 9: 2227-44.

Hsu-Lin, S., et al. (1984). "A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets." J Biol Chem 259(14): 9121-6.

Hu, E., et al. (1996). "AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity." J Biol Chem 271(18): 10697-703.

Hu, H., et al. (1996). "The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone." Neuron 16(4): 735-43.

Husmann, M., et al. (1990). "Immunohistochemical localization of polysialic acid in tissue sections: differential binding to polynucleotides and DNA of a murine IgG and a human IgM monoclonal antibody." J Histochem Cytochem 38(2): 209-15.

Ijuin, T., et al. (1996). "Isolation and identification of novel sulfated and nonsulfated oligosialyl glycosphingolipids from sea urchin sperm." Glycoconj J 13(3): 401-13.

Ikushima, S., et al. (1991). "Espression of CD56/NCAM on hematopoietic malignant cells. A useful marker for acute monocytic an megakaryocytic leukemias." Int J Hematol 54(5): 395-403.

Inoue, S. and Y. Inoue (2001). "A challenge to the ultrasensitive chemical method for the analysis of oligo- and polysialic acids at a nanogram level of colominic acid and a milligram level of brain tissues." Biochimie 83(7): 605-13.

Inoue, S. and Y. Inoue (2001). "Developmental profile of neural cell adhesion molecule glycoforms with a varying degree of polymerization of polysialic acid chains." J Biol Chem 276(34): 31863-70.

Inoue, S. and Y. Inoue (2003). "Ultrasensitive analysis of sialic acids and oligo/polysialic acids by fluorometric high-performance liquid chromatography." Methods Enzymol 362: 543-60.

Inoue, S. and M. Iwasaki (1978). "Isolation of a novel glycoprotein from the eggs of rainbow trout: occurrence of disialosyl groups on all carbohydrate chains." Biochem Biophys Res Commun 83(3): 1018-23.

Inoue, S., et al. (2001). "An ultrasensitive chemical method for polysialic acid analysis." Glycobiology 11(9): 759-67.

Inoue, S., et al. (1979). "Identification of the N-glycolylneuraminyl-(2-8)-N-glycolylneuraminyl group in a trout-egg glycoprotein by methylation analysis and gas-liquid chromatography-mass spectrometry." Carbohydr Res 74: 316-68.

Inoue, S., et al. (1982). "Stability of N-acyl groups in methylated alpha 2 leads to 8-linked oligosialosyl chains toward methanolysis. Analysis by chemical ionization-mass spectrometry.." Anal Biochem 125(1): 118-24.

Inoue, S., et al. (2003). "Discovery of an alpha 2,9-PolyNeu5Ac glycoprotein in C-1300 murine neuroblastoma (clone NB41A3)." J Biol Chem 278(10): 8541-6.

Inoue, S., et al. (1980). "Characterization of a new type of glycoprotein saccharides containing polysialosyl sequence." Biochem Biophys Res Commun 93(1): 162-5.

Inoue, Y. (1992). "in Polysialic Acids." (Roth, J., Rutishauser, U., and Troy, F.A. II, eds.) Birkhäuser Verlag, Basel: 171-182.

Ishitsuka, K., et al. (2008). "Targeting CD56 by the maytansinoid immunoconjugate IMGN901 (huN901-DM I): a potential therapeutic modality implication against natural killer/T cell malignancy. ." Br J Haematol 141(1): 129-131.

Iwai, M., et al. (2001). "Induction of highly polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) in postischemic gerbil hippocampus mainly dissociated with neural stem cell proliferation." Brain Res 902(2): 288-93.

Jakovcevski, I., et al. (2007). "Down-regulation of the axonal polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression coincides with the onset of myelination in the human fetal forebrain." Neuroscience 149(2): 328-337.

James, W. M. and W. S. Agnew (1987). "Multiple oligosaccharide chains in the voltage-sensitive Na channel from electrophorus electricus: evidence for alpha-2,8-linked polysialic acid." Biochem Biophys Res Commun 148(2): 817-26.

Jennings, H. J., et al. (1984). Pure Appl. Chem. 56: 893-905.

Jennings, H. J., et al. (1985). "Determinant specificities of the groups B and C polysaccharides of Neisseria meningitidis." J Immunol 134(4): 2651-7.

Johnson, C. P., et al. (2005). "Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion." J Biol Chem 280(1): 137-45.

Kabat, E. A., et al. (1988). "The epitope associated with the binding of the capsular polysaccharide of the group B meningococcus and of Escherichia coli K1 to a human monoclonal macroglobulin, IgMNOV." J Exp Med 168(2): 699-711.

Kanamori, A., et al. (1990). "Deaminated neuraminic acid-rich glycoprotein of rainbow trout egg vitelline envelope. Occurrence of a novel alpha-2,8-linked oligo (deaminated neuraminic acid) structure in O-linkd glycan chains." J Biol Chem 265(35): 21811-9.

Kasper, C., et al. (2000). "Structural basis of cell-cell adhesion by NCAM." Nat Struct Biol 7(5): 389-93.

Keilhauer, G., et al. (1985). "Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies." Nature 316(6030): 728-30.

Kelm, S. and R. Schauer (1997). "Sialic acids in molecular and cellular interactions." Int Rev Cytol 175: 137-240.

Keppler, O., et al. (2001). "Biochemical engineering of the N-acyl side chain of sialic acid: biological implications." Glycobiology 11(2): 11R-18R.

Kibbelaar, R., et al. (1991). "Neural cell adhesion molecule expression, neuroendocrine differnetiation and prognosis in lung carcinoma. ." Eur J Cancer 27(4): 431-435.

Kielczynski, W., et al. (1994). "Characterization of ganglioside associated with the thyrotrophin receptor." Glycobiology 4(6): 791-6.
King, M. R., et al. (2007). "Going for baroque at the Escherichia coli K1 cell surface." Trends Microbiol 15(5): 196-202.
Kiselyov, V. V., et al. (2005). "Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR." J Neurochem 94(5): 1169-79.
Kiss, J. Z., et al. (2001). "Contribution of the neural cell adhesion molecule to neuronal and synaptic plasticity." Rev Neurosci 12: 297-310.
Kiss, J. Z. and G. Rougon (1997). "Cell biology of polysialic acid." Curr Opin Neurobiol 7(5): 640-6.
Kiss, J. Z., et al. (2001). "The role of neural cell adhesion molecules in plasticity and repair." Brain Res, Brain Res Rev 36: 175-184.
Kitajima, K., et al. (1999). "in Sialobiology and Other Novel Forms of Glycosylation (Inoue, Y., Lee, Y.C., and Troy, F.A., eds.) " Gakushin Publishing Co., Osaka Japan 68-76.
Kitazume-Kawaguchi, S., et al. (2001). "Differential biosynthesis of polysialic or disialic acid Structure by ST8Sia II and ST8Sia IV." J Biol Chem 276(19): 15696-703.
Kitazume, S., et al. (1996). "The occurrence of novel 9-O-sulfated N-glycolylneuraminic acid-capped alpha2,5-Oglycolyl-linked oligo/polyNeu5Gc chains in sea urchin egg cell surface glycoprotein. Identification of a new chain termination signal for polysialyltransferase." J Biol Chem 271(12): 6694-701.
Kleene, R. and M. Schachner (2004). "Glycans and neural cell interactions." Nat Rev Neurosci 5(3): 195-208.
Knight, J. S., et al. (2012). "Lupus neutrophils: 'NET' gain in understanding lupus pathogenesis." Curr Opin RHeumatol. .
Kojima, N., Y., et al. (1997). "Two polysialic acid synthases, mouse ST8Sia II and IV, synthesize different degrees of polysialic acids on different substrate glycoproteins in mouse neuroblastoma Neuro2a cells." J Biochem 122(6): 1265-73.
Kolodkin, A. L., et al. (1997). "Neuropilin is a semaphorin III receptor." Cell 90(4): 753-62.
Korja, M., et al. (2009). "Absence of polysialylated NCAM is an unfavorable prognostic phenotype fpr advanced stage neuroblastoma." BMC Cancer 9(57): 1471-2407.
Krog, L., et al. (1992). "Characterization of soluble neural cell adhesion molecule in rat brain, CSF, and plasma." J Neurochem 59(3): 838-47.
Kurosawa, N., et al. (1997). "Polysialic acid synthase (ST8Sia II/STX) mRNA expression in the developing mouse central nervous system." J Neurochem 69(2): 494-503.
Lackie, P. M., et al. (1994). "Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is widely expressed during organogenesis in mesodermal and endodermal derivatives." Differnetiation 57(2): 119-131.
Lee, M., et al. (2004). "Vaccination of Small Cell Lung Cancer Patients with Polysialic Acid or N-Propionylated Polysialic Acid Conjugated to Keyhole Limpet Hemocyanin." Clinical Cancer Research 10: 916-923.
Lewinsohn, D. M., et al. (1987). "Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes, and other leukocytes." J Immunol 138(12): 4313-21.
Liedtke, S., et al. (2001). "Characterization of N-glycans from mouse brain neural cell adhesion molecule." Glycobiology 11(5): 373-84.
Lin, S. L., et al. (1999). "Evaluation of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed electrochemical and fluorometric detection for extensive application to the analysisof homologous series of oligo- and polysialic acids in bioactive molecules." Glycobiology 9(8): 807-14.
Lipinski, M., et al. (1987). "Characterization of neural cell adhesion molecules (NCAM) expressed by Ewing and neuroblastoma cell lines." Int J Cancer 40(1): 81-86.

Liu, T., et al. (2000). "Biochemical engineering of surface alpha 2-8 polysialic acid for immunotargeting tumor cells." J Biol Chem 275(42): 32832-6.

Lois, C. and A. Alvarez-Buylla (1994). "Long distance neuronal migration in the adult mammalian brain." Science 264: 1145.

Mahal, L. K., et al. (2001). "A small-molecule modulator of poly-alpha 2,8-sialic acid expression on cultured neurons and tumor cells." Science 294(5541): 380-1.

Marcos, V., et al. (2010). "CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation." Nat Med 16(9): 1018-1023.

Marengo, S. R. (2008). "Maturing the sperm: unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane." Anim Reprod Sci 105(1-2): 52-63.

Matthieu, J. M., et al. (1991). "Selectins: novel receptors that mediate leukocyte adhesion during inflammation." Thromb Haemost 65(3): 223-8.

McEver, R. P., et al. (1984). "A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets." J Biol Chem 259: 9799-9804.

Mechtersheimer, G., et al. (1991). "Expression of the netual killer cell-associated antigens CD 56 and CD 57 in human neural and striated muscle cells and in their tumors." Cancer Res 51(4): 1300-1307.

Mendiratta, S. S., et al. (2006). "A novel alpha-helix in the first fibronectin type III repeat of the neural cell adhesion molecule is critical for N-glycan polysialylation." J Biol Chem 281(47): 36052-9.

Mendiratta, S. S., et al. (2005). "Specific amino acids in the first fibronectin type III repeat of the neural cell adhesion molecule play a role in its recognition and polysialylation by the polysialyltransferase ST8Sia IV/PST." J Biol Chem 280(37): 32340-8.

Michon, F., et al. (1987). "Conformational differences between linear alpha (2----8)-linked homosialooligosaccharides and the epitope of the group B meningococcal polysaccharide." Biochemistry 26(25): 8399-405.

Mikkonen, M., et al. (2001). "Hippocampal plasticity in Alzheimer's disease." Rev Neurosci 12(4): 311-25.

Mikkonen, M., et al. (1999). "Hippocampal plasticity in Alzheimer´s disease: changes in highly polysialylated NCAM immunoreactivity in the hippocampal formation." Eur J Neurosci 11: 1754-1764.

Miller, P., et al. (1994). "Embryonic neural cell adhesion molecule (N-CAM) is elevated in the denervated rat dentate gyrus." J Neurosci 14: 4217-4225.

Miyata, S., et al. (2007). "Glycobiology of Polysialic Acid on Sea Urchin Gametes." Trends in Glycoscience and Glycotechnology 19(106): 85-98.

Miyata, S., et al. (2004). "A major flagellum sialoglycoprotein in sea urchin sperm contains a novel polysialic acid, an alpha2,9-linked poly-N-acetylneuraminic acid chain, capped by an 8-O-sulfated sialic acid residue." Glycobiology 14(9): 827-40.

Miyata, S., et al. (2006). "Flagellasialin: a novel sulfated alpha2,9-linked polysialic acid glycoprotein of sea urchin sperm flagella." Glycobiology 16(12): 1229-41.

Molenaar, W., et al. (1998). "Expression of neural cell adhesion molecules and neurofilament protein isoforms in skeletal muscle tumors." Hum Pathol 29(11): 1290-1293.

Moolenaar, C. E., et al. (1990). "Expression of neural cell adhesion molecule-related sialoglycoprotein in small cell lung cancer and neuroblastoma cell lines H69 and CHP-212." Cancer Res 50(4): 1102-6.

Muhlenhoff, M. et al. (1996). "Autocatalytic polysialylation of polysialyltransferase-1." EMBO J 15(24): 6943-50.

Muhlenhoff, M., et al. (1996). "Polysialylation of NCAM by a single enzyme." Curr Biol 6(9): 1188-91.

Muller, D., et al. (2000). "Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A 97(8): 4315-20.

Muller, D., et al. (1996). "PSA-NCAM is required vor activity-induced synaptic plasticity." Neuron 17: 413-22.

Nadanaka, S., et al. (2001). "Occurrence of oligosialic acids on integrin alpha 5 subunit and their involvement in cell adhesion to fibronectin." J Biol Chem 276(36): 33657-64.

Nagai, Y. and M. Iwamori (1995). "in Biology of the Sialic Acids (Rosenberg, A., ed)." Plenum Press, New York and London: 197-241.

Nakata, D. and F. A. Troy, 2nd (2005). "Degree of polymerization (DP) of polysialic acid (polySia) on neural cell adhesion molecules (N-CAMS): development and application of a new strategy to accurately determine the DP of polySia chains on N-CAMS." J Biol Chem 280(46): 38305-16.

Nakayama, J., et al. (1996). "A human polysialyltransferase directs in vitro synthesis of polysialic acid." J Biol Chem 271(4): 1829-32.

Nelson, R. W., et al. (1995). "Protein determinants for specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule." J Biol Chem 270(29): 17171-9.

Nguyen, L., et al. (2003). "Untangling the functional potential of PSA-NCAM-expressing cells in CNS development and brain repair strategies." Curr Med Chem 10: 2158-2196.

Nishiyama, A., et al. (2009). "Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity." Nat Rev Neurosci 10: 9-22.

Nohara, K., et al. (1998). "Antibody against ganglioside GD1c containing NeuGcalpha2-8NeuGc cooperates with CD3 and CD4 in rat T cell activation." J Biochem 124(1): 194-9.

O'Connell, A., et al. (1997). "Spatial learning activates neural cell adhesion molecule polysialylation in a corticohippocampal pathway within the medial temporal lobe." J Neurochem 68(6): 2538-46.

Ohtsubo, K. and J. D. Marth (2006). "Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease." Cell 126(5): 855-67.

Olsen, M., et al. (1993). "Intact transmembrane isoforms of the neural cell adhesion molecule are released from the plasma membrane." Biochem J 295 (Pt 3): 833-40.

Olsen, M., et al. (1995). "The ability to re-express polysialylated NCAM in soleus muscle after denervation is reduced in aged rats compared to young adult rats." Int J Dev Neurosci 13: 97-104.

Oltmann-Norden, I., et al. (2008). "Impactof the polysialyltransferases St8SiaII and ST8SiaIV on polysialicacid synthesis during postnatal mouse brain development." J Biol Chem 283(3): 1463-71.

Ong, E., et al. (1998). "Developmental regulation of polysialic acid synthesis in mouse directed by two polysialyltransferases, PST and STX." Glycobiology 8(4): 415-24.

Ono, K., et al. (1994). "N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid." Neuron 13: 595-609.

Owens, G. C., et al. (1987). "Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene: alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains." Proc Natl Acad Sci USA 84: 294-8.

Parente, J. P., et al. (1985). "A convenient method for methylation of glycoprotein glycans in small amounts by using lithium methylsulfinyl carbanion." Carbohydr Res 141(1): 41-7.

Patel, K., et al. (1989). "Neural cell adhesion molecule (NCAM) is the antigen recognized by monoclonal antibodies of similar specificity in small-cell lung carcinoma and neuroblastoma." Int J Cancer 44(4): 573-578.

Phillips, G. R., et al. (1997). "Developmental expression of two rat sialyltransferases that modify the neural cell adhesion molecule, N-CAM." Brain Res Dev Brain Res 102(2): 143-55.

Pon, R. A., et al. (2007). "Polysialic acid bioengineering of neuronal cells by N-acyl sialic acid precursor treatment." Glycobiology 17(3): 249-60.

Prescher, J. A., et al. (2004). "Chemical remodelling of cell surfaces in living animals." Nature 430(7002): 873-7.

Ranheim, T. S., et al. (1996). "Homophilic adhesion mediated by the neural cell adhesion molecule involves multiple immunoglobulin domains." Proc Natl Acad Sci U S A 93(9): 4071-5.

Rao, Y., et al. (1992). "Identification of a peptide sequence involved in homophilic binding in the neural cell adhesion molecule NCAM." J Cell Biol 118(4): 937-49.

Rao, Y., et al. (1993). "Structural characterization of a homophilic binding site in the neural cell adhesion molecule." J Biol Chem 268(27): 20630-8.

Rauvala, H., et al. (1977). "Methylation analysis of neuraminic acids by gas chromatography-mass spectrometry." Carbohydr Res 56(1): 1-9.

Riboni, L., et al. (1986). "Natural occurrence of ganglioside lactones. Isolation and characterization of GD1b inner ester from adult human brain." J Biol Chem 261(18): 8514-9.

Robbins, J. B., et al. (1974). "Escherichia coli K1 capsular polysaccharide associated with neonatal meningitis." N Engl J Med 290(22): 1216-20.

Roguska, M. (1994). "Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. ." Proc Natl Acad Sci USA 91(3): 969-973.

Ronn, L. C., et al. (1995). "NCAM-antibodies modulate induction of long-term potentiation in rat hippocampal CA1." Brain Res 677: 145-51.

Rosen, S. D. (1993). "Cell surface lectins in the immune system." Semin Immunol 5(4): 237-47.

Roth, J., et al. (1988). "Reexpression of poly(sialic acid) units of the neural cell adhesion molecule in Wilms tumor." Proc Natl Acad Sci U S A 85(9): 2999-3003.

Roth, L., et al. (2014). Formaldehyd - Eigenschaften, Vorkommen, Verwendung, Ökotoxizität, Toxikologie, Therapie, Vorschriften, Umgang. Hamburg, Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm GmbH.

Rusznak, C., et al. (2000). "Effect of cigarette smoke on the permeability and IL-1beta and sICAM-1 release from cultured human bronchial epithelial cells of never-smokers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Cell Mol Biol 23(4): 530-536.

Rutishauser, U. et al. (2007). "Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system." Nat Rev Neurosci.

Rutishauser, U., et al. (1988). "The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions." Science 240(4848): 53-7.

Rutishauser, U., et al. (1996). "Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions." Trends Neurosci 19(10): 422-7.

Saez, F., et al. (2003). "Epididymosomes and prostasomes: their roles in posttesticular maturation of the sperm cells." J Androl 24(2): 149-154.

Saffarzadeh, M., et al. (2012). "Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones." PLoS One 7(2): e32366.

Sara, Y., et al. (2005). "Selective capability of SynCAM and neuroligin for functional synapse assembly." J Neurosci 25(1): 260-270.

Sato, C. (1999). "Glycobiology of Di-and Oligosialyl Glycotopes." Trends in Glycoscience and Glycotechnology 11(62): 371-390.

Sato, C. (2004). "Chain length diversity of sialic acids and its biological significance." Trends in Glycoscience and Glycotechnology 16(91): 331-334.

Sato, C., et al. (1999). Glycoconjugate J. 16: 117.

Sato, C., et al. (1993). "Structural diversity in the alpha 2-->8-linked polysialic acid chains in salmonid fish egg glycoproteins. Occurrence of poly(Neu5Ac), poly(Neu5Gc), poly(Neu5Ac, Neu5Gc), poly(KDN), and their partially acetylated forms." J Biol Chem 268(31): 23675-84.

Sato, C., et al. (1993). "Structural diversity in the alpha 2-->8-linked polysialic acid chains in salmonid fish egg glycoproteins. Occurrence of poly(Neu5Ac), poly(Neu5Gc), poly(Neu5Ac, Neu5Gc), poly(KDN), and their partially acetylated forms." J Biol Chem 268(31): 23675-84.

Sato, C., et al. (2002). "Neuronal differentiation-dependent expression of the disialic acid epitope on CD166 and its involvement in neurite formation in Neuro2A cells." J Biol Chem 277(47): 45299-305.

Sato, C., et al. (2001). "Identification and adipocyte differentiation-dependent expression of the unique disialic acid residue in an adipose tissue-specific glycoprotein, adipo Q." J Biol Chem 276(31): 28849-56.

Schauer, R. (2000). "Achievements and challenges of sialic acid research." Glycoconj J 17(7-9): 485-99.

Schauer, R. (2004). "Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man." Zoology (Jena) 107(1): 49-64.

Schauer, R., et al. (1996). Biology of the Sialic Acids (Rosenberg, A., ed.) Plenum Press, New York and London 7-67.

Scheidegger, E., et al. (1994). "In vitro and in vivo growth of clonal sublines of human small cell lung carcinoma is modulatd by polysialic acid of the neural cell adhesion molecule." Lab Invest 70(1): 95-106.

Schumann, E. M., et al. (1999). "Neurotrophin regulation of synaptic transmission." Curr. Opin. Neurobiol. 9: 105-109

Schwarzkopf, M., et al. (2002). "Sialylation is essential for early development in mice." Proc Natl Acad Sci U S A 99(8): 5267-70.

Seidenfaden, R., et al. (2000). "Control of NCAM polysialylation by the differential expression of polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV." Eur J Cell Biol 79(10): 680-8.

Seidenfaden, R., et al. (2003). "Polysialic acid directs tumor cell growth by controlling heterophilic neural cell adhesion molecule interactions." Mol Cell Biol 23(16): 5908-18.

Seki, T. and Y. Arai (1993). "Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system." Neurosci Res 17(4): 265-90.

Seki, T., et al. (1993). "Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat." J Neurosci 13: 2351-2358.

Sharon, N., and H. Lis (1997). "in Glycosciences (Gabius, H.-J., and Gabius, S., eds.)." Chapman & Hall, Weinheim: 133-189.

Shen, G. J., et al. (1999). "Expression of alpha2,8/2,9-polysialyltransferase from Escherichia coli K92. Characterization of the enzyme and its reaction products." J Biol Chem 274(49): 35139-46.

Shin, M. H., et al. (2002). "Neural cell adhesion molecule (NCAM) promotes the differentiation of hippocampal precursor cells to a neuronal lineage, especially to a glutamatergic neural cell type." Exp Mol Med 34(6): 401-10.

Simon, P., et al. (2013). "Polysialic acid is present in mammalian semen as a posttranslational modification of NCAM and the polysialyltransferase ST8SiaII." J Biol Chem 288(26): 18825-33.

Soker, S., et al. (1998). "Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor." Cell 92(6): 735-45.

Soroka, V., et al. (2003). "Structure and interactions of NCAM Ig1-2-3 suggest a novel zipper mechanism for homophilic adhesion." Structure 11(10): 1291-301.

Springer, T. A. (1990). "Adhesion receptors of the immune system." Nature 346(6283): 425-34.
Springer, T. A. (1995). "Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration." Annu Rev Physiol 57: 827-72.
Stark, Y., et al. (2007). "A study on polysialic acid as a biomaterial for cell culture applications." J Biomed Mater Res A.
Storms, S. D., et al. (1994). "Multiple mechanisms of N2A and CHO cell adhesion to NCAM purified from chick embryonic brain and retina." Exp Cell Res 214(1): 100-12.
Stummeyer, K., et al. (2004). "Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F." Nat Struct Mol Biol.
Styren, S., et al. (1994). "Rapid expression and transport of embryonic N-CAM in dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: ultrastructural analysis." J Comp Neurol 394: 486-492.
Suzuki, M., et al. (2005). "Polysialic acid facilitates tumor invasion by glioma cellls." Glycobiology 15(9): 887-894.
Takashima, S., et al. (1998). "Genomic structure and promoter activity of the mouse polysialic acid synthase (mST8Sia IV/PST) gene." J Biol Chem 273(13): 7675-83.
Tanaka, F., et al. (2000). "Expression of polysialic acid and STX, a human polysialyltransferase, is correlated with tumor progression in non-small cell lung cancer." Cancer Res 60(11): 3072-3080.
Tanaka, F., et al. (2001). "Prognostic Significance of Poylsialic Acid Expression in Resected Non-Small Cell Lung Cancer." Cancer Res 61: 1666-1670.
Tassone, P., et al. (2004). "IN vitro and in vivo activity of the maytasinoid immunoconjugate huN901-N2´-deacety-N2´-(3-mercapto-I-oxopropyl)-maytansine against CD56+ multiple myeloma cells." Cancer Res 64(13): 4629-4636.
Thiery, J. P., et al. (1977). "Adhesion among neural cells of the chick embryo. II. Purification and characterization of a cell adhesion molecule from neural retina." J Biol Chem 252(19): 6841-5.
Thomaidou, D., et al. (2001). "Soluble forms of NCAM and F3 neuronal cell adhesion molecules promote Schwann cell migration: identification of protein tyrosine phosphatases zeta/beta as the putative F3 receptors on Schwann cells." J Neurochem 78(4): 767-78.
Tomasiewicz, H., et al. (1993). "Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system." Neuron 11(6): 1163-74.
Trotter, J., et al. (2010). "NG2 cells: Properties, progeny and origin." Brain Res Rev 63: 72-82.
Troy, F. A., 2nd (1992). "Polysialylation: from bacteria to brains." Glycobiology 2(1): 5-23.
Ulm, C., et al. (2013). "Soluble polysialylated NCAM: a novel player of the innate immune system in the lung." Cell Mol Life Sci 70(19): 3695-708.
Uzman, L. L., et al. (1958). J. Neurochem 3: 170-184.
Vaithianathan, T., et al. (2004). "Neural cell adhesion molecule-associated polysialic acid potentiates alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor currents." J Biol Chem 279(46): 47975-84.
Varki, A. (1992). "Diversity in the sialic acids." Glycobiology 2(1): 25-40.
Varki, A. (2007). "Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins." Nature 446(7139): 1023-9.
Varki, A. and T. Angata (2006). "Siglecs--the major subfamily of I-type lectins." Glycobiology 16(1): 1R-27R.
Varki, N. M. and A. Varki (2007). "Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease." Lab Invest 87(9): 851-7.

Venero, C., et al. (2006). "Hippocampal up-regulation of NCAM expression and polysialylation plays a key role on spatial memory." Eur J Neurosci 23(6): 1585-95.

Vestweber, D. and J. E. Blanks (1999). "Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands." Physiol Rev 79(1): 181-213.

Vimr, E. and C. Lichtensteiger (2002). "To sialylate, or not to sialylate: that is the question." Trends Microbiol 10(6): 254-7.

Vimr, E. R., et al. (1984). "Use of prokaryotic-derived probes to identify poly(sialic acid) in neonatal neuronal membranes." Proc Natl Acad Sci U S A 81(7): 1971-5.

von Der Ohe, M., et al. (2002). "Localization and characterization of polysialic acid-containing N-linked glycans from bovine NCAM." Glycobiology 12(1): 47-63.

Vutskits, L., et al. (2001). "PSA-NCAM modulates BDNF-dependent survival and differentiation of cortical neurons." Eur J Neurosci 13(7): 1391-402.

Walsh, F. S. and P. Doherty (1997). "Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance." Annu Rev Cell Dev Biol 13: 425-56.

Weber, M., et al. (2006). "Increased polysialic acid neural cell adhesion molecule expression in human hippocampus of heroin addicts." Neuroscience 138: 1215-1223.

Weinhold, B., et al. (2005). "Genetic Ablation of Polysialic Acid Causes Severe Neurodevelopmental Defects Rescued by Deletion of the Neural Cell Adhesion Molecule." J Biol Chem 280(52).

Weiss, W. A., et al. (1997). "Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice." EMBO J 16(11): 2985-95.

Williams, A. F. and A. N. Barclay (1988). "The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition." Annu Rev Immunol 6: 381-405.

Wood, G. K., et al. (1997). "Cloning and in situ hybridization analysis of the expression of polysialyltransferase mRNA in the developing and adult rat brain." Brain Res Mol Brain Res 51(1-2): 69-81.

Wuhrer, M., et al. (2003). "Localization of defined carbohydrate epitopes in bovine polysialylated NCAM." Biochimie 85(1-2): 207-18.

Yabe, U., et al. (2003). "Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein." J Biol Chem 278(16): 13875-80.

Yoshida, C. and M. Takeichi (1982). "Teratocarcinoma cell adhesion: identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation." Cell 28(2): 217-24.

Yoshida, Y., et al. (1995). "Molecular cloning of Sia alpha 2,3Gal beta 1,4GlcNAc alpha 2,8-sialyltransferase from mouse brain." J Biol Chem 270(24): 14628-33.

Yoshida, Y., et al. (1996). "Genomic structure and promoter activity of the mouse polysialic acid synthase gene (mST8Sia II). Brain-specific expression from a TATA-less GC-rich sequence." J Biol Chem 271(47): 30167-73.

Yousef, M., et al. (2013). "Pharmacoligical Inhibition of poylsialyltransferase ST8SiaII Modulates Tumour Cell Migration." PLOS one 8(8).

Zecchini, S., et al. (2010). "Neural cell adhesion molecule in cancer: expression and mechanisms." Adv Exp Med Biol 663: 319-33.

Zhang, G., et al. (1997). "Developmentally regulated O-acetylated sialoglycans in the central nervous system revealed by a new monoclonal antibody 493D4 recognizing a wide range of O-acetylated glycoconjugates." Glycoconj J 14(7): 847-57.

Zhang, Y. and Y. C. Lee (1999). "Acid-catalyzed lactonization of alpha2,8-linked oligo/polysialic acids studied by high performance anion-exchange chromatography." J Biol Chem 274(10): 6183-9.

Zhou, H., et al. (1993). "Homophilic adhesion between Ig superfamily carcinoembryonic antigen molecules involves double reciprocal bonds." J Cell Biol 122(4): 951-60.

10 Publikationsverzeichnis

1. Galuska, S.P., Geyer, H., Mink, W., Kaese, P., Kühnhardt, S., **Schäfer, B**., Mühlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R., and Geyer, R. (2012). Glycomic Strategy for Efficient Linkage Analysis of Di-, Oligo- and Polysialic Acids. ***J. Proteomics***, 75, 5266-5278.

2. **Schäfer, B.,** Galuska, S.P., Kuchelmeister, K., Rinné, S., Gerardy-Schahn, R., Mühlenhoff, M., Geyer, H., and Geyer, R. (2009). Analysis oft he polysialic acid distribution in human brain tissue. Posterpräsentation, 20th Joint Glycobiology Meeting, Köln.

11 Erklärung zur Disseration

„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 wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt 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.“

Limburg, 16. Juni 2014 Benedikt Debus

12 Danksagung

Ein herzlicher Dank gebührt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Rudolf Geyer der, mit der Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu forschen, den Grundstein für diese Arbeit gelegt hat.
Für die fortwährende Unterstützung während der Tätigkeit im Labor, der Datenauswertung und nicht zuletzt auch der Verfassung der Dissertationsschrift bedanke ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. Sebastian Galuska. Er hat mir stets mit seinem Engagement, fundiertem Fachwissen und auch im privaten Umfeld als Weggefährte zur Seite gestanden. Danke für die fruchtbare Zusammenarbeit.
Viele weitere Menschen haben mich auf meinem Weg zur Promotion begleitet und unterstützt. Herzlichen Dank an Herrn Dr. Kai Maas der neben der Textformatierung und Lösung von Softwareproblemen auch durch seine Freundschaft zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat. Danke für deine Hilfe und den Beistand.
Den Herren Werner Mink, Peter Kaese und Siegfried Kühnhard danke ich für die technische Umsetzung all unserer Ideen und die tüftlerische Erfahrung, die sie bereitwillig geteilt haben. Ohne euch wäre ich an manchem Problem verzweifelt und Analysen gescheitert.
Ein Wort des Dankes auch an Frau Dr. Galuska und Herrn Professor Dr. Lochnit, die meine Arbeit durch ihre konstruktive Kritik und hilfreichen Rat vorangebracht haben.
Danke an die gesamte Arbeitsgruppe für die zahlreichen Ideen und Anregungen, die meine wissenschaftliche Arbeit bereichert haben. Das Projekt hat durch eure Unterstützung immer wieder an Fahrt aufgenommen. Danke für eure Motivation.
Danken möchte ich auch meinen Freunden für die kritische Durchsicht der Arbeit und eure uneingeschränkte Freundschaft auf dem Weg als Doktorand. Auf euch kann ich mich verlassen. Ihr seid immer für mich da.
Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mir in jeder Lebensphase immer mit offenem Ohr wie auch Rat und Tag zur Seite gestanden haben. Danke für eure stetige Verbundenheit.

13 Lebenslauf