

Einsatz von künstlichen Sialinsäuren zur Anwendung gegen Influenza-A-Viren

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

vorgelegt von Christian, Philipp
aus Frankfurt am Main

Gießen 2018

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

1. Gutachter: PD Dr. Galuska
2. Gutachter: Prof. Dr. Ziebuhr

Tag der Disputation: 14.10.2019

„Alle großen Dinge sind einfach, aber zu den einfachsten Erkenntnissen
braucht man die längste Zeit.“

Freiherr Justus von Liebig

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Sialinsäuren	1
1.1.1	Strukturelle Eigenschaften	1
1.1.2	Komplexität, Vorkommen und Funktion	2
1.1.3	Sialinsäurestoffwechsel	4
1.1.4	Metabolisches Glykoengineering	6
1.2	Influenza-Virus	10
1.2.1	Allgemeines und struktureller Aufbau	10
1.2.2	Hämagglutinin	12
1.2.3	Neuraminidase	14
1.2.4	Infektionszyklus des Influenza-Virus	16
1.2.5	Antivirale Wirkstoffe	18
2	Zielsetzung	21
3	Material und Methoden	22
3.1	Verwendete Materialien	22
3.1.1	Antikörper	22
3.1.2	Chemikalien	22
3.1.3	Enzyme	23
3.1.4	Influenza-A-Stamm	24
3.1.5	Reaktionsansätze (Kits)	24
3.1.6	Puffer und Lösungen	24
3.1.7	Zelllinien	25
3.1.8	Zellkulturzusätze	26
3.1.9	Zellkulturmedien	26
3.1.10	Laborgeräte	27
3.1.11	Programme	28
3.1.12	Verbrauchsmaterialien	29
3.2	Peracetylierung von N-Acyl-Monosacchariden	30
3.3	Zellbiologische Methoden	30
3.3.1	Kultur und Passage adhärenter eukaryotischer Zellen	30
3.3.2	Langzeitlagerung – Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen	31
3.3.3	Zellzählung mittels improved-Zählkammer nach Neubauer	31
3.3.4	Inkubation mit peracetylierten ManNAc-Analoga	32
3.3.5	Ernten von Zellen	33

3.3.6	Weitere Bearbeitung und Analyse des Zellpellets	33
3.4	Sialinsäureanalytische Methode	34
3.4.1	HPLC - Quantifizierung von Sialinsäuren mittels C18-Säule	34
3.4.1.1	Standardreihe und Leerwert	34
3.4.1.2	Analysenvorbereitung	35
3.4.1.3	Lösungen und Gradient - Umkehrphase	35
3.4.1.4	Probenanalyse	36
3.5	Inkubation homogenisierter Zellen mit Neuraminidasen des Influenza-A-Virus.....	37
3.5.1	Inkubation mit Neuraminidasen	37
3.5.2	Reduktion freier Sialinsäuren und Probenvorbereitung	38
3.5.3	Bestimmung abgespaltener Sialinsäuren	39
3.6	Anreicherung sialylierter Glykokonjugate.....	40
3.6.1	Probenaufbereitung	40
3.6.2	Proteinanalytische Methode	40
3.6.3	Enzymverdau und Aufreinigung.....	41
3.6.4	Fraktionierung und Anreicherung mittels HPLC - Normalphase	41
3.6.5	Zusammenführen aufgereinigter Proben	42
3.7	Virologische Methoden.....	42
3.7.1	Messung der Neuraminidaseaktivität unter Einfluss sialylierter Glykokonjugate (MUNANA-Fluoreszenz-Assay)	42
3.7.2	Infektion eukaryotischer Zellen	43
3.7.3	Multizyklische Replikation unter Einfluss sialylierter Glykokonjugate	43
3.7.4	Einzelzyklus-Replikation unter Einfluss sialylierter Glykokonjugate	43
3.7.5	Immunhistochemische Färbung infizierter Zellen	44
3.7.6	Bestimmung des Virustiters (Avicel-Plaque-Test)	44
4	Ergebnisse	46
4.1	Etablierung eines Protokolls zur effektiven Metabolisierung artifiziieller N-Acetyl-Mannosaminanaloga anhand der A549-Lungenzelllinie.....	46
4.1.1	Nachweis der Sialylierung von A549-Zellen	47
4.1.2	Nachweis metabolisierter N-Acetyl-Mannosaminanaloga	47
4.1.3	Zellwachstum in Abhängigkeit des Kulturmediums	49
4.1.4	Metabolismus des artifiziiellen Sialinsäurevorläufers O-Ac ₄ -ManNProp in Abhängigkeit von Konzentration und Kulturmedium	50
4.1.5	Vergleich des Metabolismus artifiziieller N-Acetylmannosamin-Analoga in Abhängigkeit von Inkubationszeit und Kulturmedium	53

4.2	Abspaltung modifizierter Sialinsäuren von Glykokonjugaten homogenisierter A-549-Zellen durch Neuraminidasen verschiedener Influenza-A-Viren.....	56
4.2.1	Influenza-A-H1N1-Neuraminidase (A/California/04/2009).....	56
4.2.2	Influenza-A-H3N2-Neuraminidase (N294S mutation)(A/Babool/36/2005)	60
4.2.3	Influenza-A-H5N1-Neuraminidase (A/Anhui/1/2005).....	61
4.2.4	Influenza-A-H7N7-Neuraminidase (A/Netherlands/219/03).....	62
4.3	Aufarbeitung und Anreicherung sialylierter Glykokonjugate.....	63
4.3.1	Anionenaustauscherchromatographie zur Anreicherung sialylierter Glykokonjugate	63
4.3.2	Stoffmengenverlust	66
4.4	Einfluss aufgereinigter sialylierter Glykokonjugate auf das Influenza- A-Virus H1N1 (A/Hamburg/5/09)	67
4.4.1	Verschiedene Proben sialylierter Glykokonjugate	67
4.4.2	Neuraminidase-Aktivitätstest (MUNANA-Fluoreszenz-Assay)	67
4.4.3	Einfluss auf die Einzelzyklus-Replikation des Influenza-A-Virus H1N1 (A/Hamburg/5/09) in MDCK(H)-Zellen	69
4.4.4	Einfluss auf die multizyklische Replikation des Influenza-A-Virus H1N1 (A/Hamburg/5/09) in Calu-3-Zellen	71
5	Diskussion	73
5.1	Metabolismus künstlicher peracetylierter ManNAc-Analoga in A549-Zellen.....	73
5.2	Abspaltung künstlicher Sialinsäuren durch humane Neuraminidasen..	77
5.3	Anreicherung künstlich sialylierter Glykokonjugate	81
5.4	Künstlich sialylierte Glykokonjugate zur Anwendung gegen das Influenza-A-Virus.....	83
6	Zusammenfassung.....	93
7	Summary	94
8	Abkürzungsverzeichnis	95
9	Abbildungsverzeichnis	99
10	Literaturverzeichnis	101
11	Publikation im Zusammenhang mit dieser Arbeit.....	117
12	Ehrenwörtliche Erklärung.....	118
13	Danksagung	119

1 Einleitung

1.1 Sialinsäuren

1.1.1 Strukturelle Eigenschaften

Sialinsäuren sind negativ geladene α -Ketosäuren mit einem „9-gliedrigen“ Kohlenstoffgerüst und vorwiegend an endständigen Glykanen membrangebundener Glykoproteine und -lipide vorzufinden (Angata and Varki, 2002; Schauer and Kamerling, 1997). Kennzeichnend sind eine Carboxylgruppe am C₁-Atom und eine Ketogruppe am C₂-Atom. Alle Sialinsäuren leiten sich aus einem Neuraminsäuregerüst (5-Amino-3,5-Dideoxy-D-Glycero-D-Galacto-non-2-ulosonsäure) ab, kurz Neu, das aber so nicht in der Natur existiert. In Säugetieren kommen vorwiegend die Sialinsäuren *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) und *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) vor, wobei die desaminierte Form 2-Keto-3-Deoxy-D-Glycero-D-Galactonsäure (KDN) nur geringfügig auftritt. Es sind über 50 strukturell verschiedene Sialinsäuren bekannt. Die strukturellen Variationen am C₅-Atom (Neu5Ac, Neu5Gc, KDN) und an den Hydroxylgruppen der C-Atome 4, 7, 8 und 9 erlauben eine solche Vielfalt. Die Hydroxylgruppen kommen frei, verestert (acetyliert, lactyliert, sulfatiert, phosphoryliert) oder verethert (methyliert) vor. Die Bildung intra- bzw. intermolekularer Lactone vergrößert weiter die strukturelle Mannigfaltigkeit.

In Lösung nehmen Sialinsäuren eine ²C₅-Sesselkonformation an. Die Glycerin-Seitenkette orientiert sich äquatorial. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen C₇ und C₈ stabilisieren die Seitenkette, wodurch sie relativ rigide wird. Die C₁-Carboxylgruppe verleiht der Sialinsäure saure Eigenschaften. Der pK_a für Neu5Ac liegt bei 2,6, wodurch die α -Ketosäuren bei physiologischem pH-Wert eine negative Ladung besitzen. Freie Sialinsäuren befinden sich in der Regel in β -anomere Ringstruktur (Tiralongo, 2013).

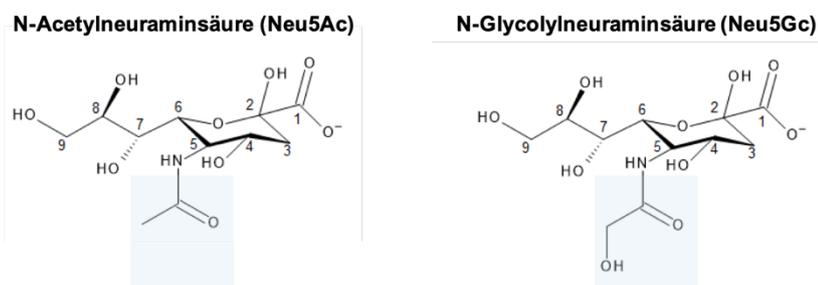


Abbildung 1.1 Strukturelle Darstellung der Sialinsäuren

Darstellung der häufig vorkommenden Sialinsäuren *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) und *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) in β -anomere Ringstruktur.

1.1.2 Komplexität, Vorkommen und Funktion

Sialinsäuren kommen ubiquitär in der Natur vor und sind vorwiegend an nichtreduzierenden Enden von Oligosaccharidketten membrangebundener Glykoproteine bzw. -lipide zu finden und somit Teil zahlreicher Glykokonjugate der Glykokalix. Durch ihre endständige Position sind sie in Eukaryonten an einer Vielzahl von Zell-Zell- und Zell-Molekül-Interaktionen beteiligt, wie der Stabilisierung von Glykokonjugaten und Zellmembranen durch Ladungsabstoßung, Vermittlung von Zell-Zell-Regulationen, Wirkung als chemische Botenstoffe, Regulierung transmembraner Rezeptorfunktionen, Beeinflussung des Membrantransports, Kontrolle der Halbwertszeit zirkulierender Glykoproteine und Zellen (Vimr et al., 2004) und Regulierung des Immunsystems (Pilatte et al., 1993).

Gerade die strukturelle Vielfalt des Sialoms, als Subklasse des Glykoms, gestaltet die Komplexität unvorstellbar groß und betont die biologische Bedeutung der Sialinsäuren. Um eine Vorstellung der Größe des Sialoms zu bekommen, sollen die verschiedenen Komplexitätsstufen hierarchisch geordnet erwähnt sein (Cohen and Varki, 2010).

Zunächst bietet die Grundstruktur der Sialinsäure mehrere Möglichkeiten der Modifikation (siehe 1.1.1). Diverse Verknüpfungsmöglichkeiten führen zu einer weiteren Differenzierung. Sialinsäuren sind vorwiegend α 2,3- oder α 2,6-glykosidisch mit Galactose bzw. α 2,6 mit *N*-Acetyl-Galactosamin verknüpft. Zudem können sie in Säugern untereinander in α 2,8-Verbindung erscheinen. Heterogene Verlinkungen mit *N*-Acetyl-Glucosamin oder homogene wie Neu5Ac- α 2,9-Neu5Ac und Neu5Ac- α 2,4-Neu5Ac kommen jedoch auch in der Natur vor. Die Zuckerkette des jeweiligen sialinsäuretragenden Glykokonjugats kann sich weiterhin hinsichtlich der Verzweigung und Länge der Kette unterscheiden. Sialylierte Glykane sind wiederum endständige Einheiten von *N*-Glykanen und *O*-Glykanen, sekretierter oder membrangebundener Glykoproteine, Glykosphingolipide (Ganglioside) und Seitenketten von Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker). Diese Einheiten sind auf der Zelloberfläche in dynamischen Mikrodomänen organisiert. Jede einzelne dieser Komplexitätsstufen kann die Affinität Glykan-bindender-Proteine (GBP) beeinflussen. Vor allem aber steigert die Multivalenz der membrangebundenen Glykokonjugaten die Wechselwirkung mit GBPs und verstärkt deren Bindung (Brewer et al., 2002).

In der Virologie spielt die strukturelle Komplexität des Sialoms eine beachtenswerte Rolle. Das Glykoprotein Hämagglutinin des Influenza-Virus bindet seinen Rezeptor, eine endständige Sialinsäure der Zelloberfläche, sehr spezifisch. Die Bindungsaffinität zur Sialinsäure variiert hinsichtlich der Grundstruktur (Neu5Ac, Neu5Gc) und deren Acetylierung (De Groot, 2006; Higa et al., 1985), der spezifischen Verlinkung (Suzuki et al., 2000) und der Verzweigung des Glykans (Gulati et al., 2013).

Erscheinen Neu5Ac-Reste sialylierter Glykokonjugate in polymerisierter Struktur, so wird zwischen Di- (2), Oligo- (3-7) oder Polysialinsäure (≥ 8) unterschieden (Sato and Kitajima, 2013). Polysialinsäuren können mehr als 50 Sialinsäurereste enthalten (Galuska et al., 2007). Die lineare, polymerisierte Struktur unterscheidet sich nicht nur in der Länge, sondern auch in dem Verknüpfungsmuster (s.o.). Durch die Menge an deprotoniert vorliegenden Carboxylgruppen, nimmt die Polysialinsäure eine stark negative Ladung an. Es bildet sich eine voluminöse Hydrathülle im Bereich der polymerisierten Struktur, die Einfluss auf Zell-Zell-Interaktionen nimmt (Yang et al., 1994).

In der Zahnmedizin, insbesondere bei parodontalen Erkrankungen, spielen Sialinsäuren eine außerordentlich wichtige Rolle (Stafford et al., 2012). Parodontitis ist eine bakterielle Entzündung des Zahnhalteapparates, die mit einer irreversiblen Zerstörung dessen einhergeht (Page and Kornman, 1997). Die im Rahmen der parodontalen Erkrankung auftretenden Pathogene nutzen oberflächliche Sialinsäuren der Wirtszellen aus, um diese als Nährstoffgrundlage zu verwenden, das Wirtsgewebe aufzulösen oder eine Immunantwort zu umgehen. *Treponema denticola* ist ein oraler Spirochät, der im Wesentlichen an der Zerstörung des Zahnhalteapparates beteiligt ist. Ein wichtiger Virulenzfaktor des Bakteriums ist die Sialidase (Neuraminidase TDE0471). TDE0471 katalysiert die Spaltung terminaler Sialinsäuren von Glykokonjugaten der Wirtszellen. *Treponema denticola* nutzt die gespaltenen Sialinsäuren des Wirtes als Nährstoffgrundlage und zur Beeinflussung des Komplementsystems (Kurniyati et al., 2013). Für ein weiteres periodontales Pathogen, *Tannerella forsythia*, konnte die Wachstumsstimulation im Biofilm durch Sialinsäuren bzw. deren Aufnahme demonstriert werden. Das Wachstum unter Sialyllactose ist dabei abhängig von der Sialidase des Pathogens. Eine Wachstumshemmung wurde durch Blockade der Neuraminidase mit Oseltamivir erreicht (Roy et al., 2010). Das Leukotoxin von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, einer der bekanntesten Virulenzfaktoren parodontaler Pathogene, fördert die Entstehung chronischer Entzündungen, vermittelt Zellyse und ist mit einer schnell fortschreitenden Parodontitis assoziiert. Für die Lyse der Zellen bindet das Leukotoxin den β_2 -Integrin-Rezeptor polymorphnuklearer Leukozyten und Makrophagen. Eine fehlende Sialylierung der Zellen mit β_2 -Integrin-Rezeptoren reduziert signifikant die Lyse dieser Zellen. Die Gegenwart von negativ geladenen sialinsäuretragenden Proteinen von Zellen ohne β_2 -Integrin führt zu einer Sensibilisierung gegenüber dem Leukotoxin (Munksgaard et al., 2014).

Die Beispiele demonstrieren die Vielseitigkeit der Sialinsäuren und deren Beteiligung an unterschiedlichsten biologischen Interaktionen. Vor allem soll hier betont sein, welche bedeutende Rolle der Wissensstand in diesem Forschungsfeld der Medizin zuspielt. Gerade der Fortschritt im Glykoengineering (siehe 1.1.4) kann weiterhin zum Aufschluss

über Funktion und Lokalisation dieser besonderen Stoffklasse sowie zur Entwicklung neuer Medikamente beitragen.

1.1.3 Sialinsäurestoffwechsel

In Vertebraten ist das Ausgangssubstrat für die Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) der Nukleotidzucker UDP-*N*-Acetyl-Glucosamin (UDP-GlcNAc), der über den Hexosamin-Stoffwechselweg gewonnen wird. Die folgenden Reaktionsschritte ereignen sich im Zytoplasma. Ein bifunktionales Enzym katalysiert die ersten beiden Schritte der Neu5Ac-Synthese: UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ ManNAc-Kinase (GNE/MNK) (Hinderlich et al., 1997; Stäsche et al., 1997). Während sich die katalytische Domäne der Epimerase *N*-terminal befindet, ist die Kinase *C*-terminal lokalisiert (Effertz et al., 1999). Die Epimerase wandelt UDP-GlcNAc unter Freisetzung von UDP in *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) um, wobei die ATP-abhängige Kinase ManNAc am C₆-Atom phosphoryliert und ManNAc-6-Phosphat entsteht (Ghosh and Roseman, 1961; Warren and Felsenfeld, 1961). Die Neu5Ac-9-P-Synthase (NANS) katalysiert die Kondensreaktion von ManNAc-6-P und Phosphoenolpyruvat (PEP), die unter energetischer Freisetzung einer Phosphatgruppe von PEP zu Neu5Ac-9P reagieren (Roseman et al., 1961; Warren and Felsenfeld, 1961). Die humane Neu5Ac-9-P-Synthase besitzt außerdem eine geringe Aktivität phosphoryliertes KDN aus Mannose-6-Phosphat (Man-6-P) zu generieren (Lawrence et al., 2000). Neu5Ac-9-P reagiert unter Abspaltung der 9-Phosphatgruppe zu Neu5Ac. Diesen Reaktionsschritt ermöglicht die Neu5Ac-9-P-Phosphatase (NANP) (Jourdian et al., 1964). Die Aktivierung von Neu5Ac findet im Zellkern statt und stellt damit die Ausnahme gegenüber anderen Monosacchariden dar (Kean, 1991). Sie wird von der Cytidin-Monophosphat-Neu5Ac-Synthetase (CMP-Neu5Ac-Synthetase, CMAS) katalysiert. Nukleäres Cytidin-Triphosphat (CTP) reagiert unter Abspaltung von Pyrophosphat mit Neu5Ac zu CMP-Neu5Ac. CMP-Neu5Ac inhibiert die Funktion der UDP-GlcNAc-2-Epimerase. Durch die Feedback-Inhibition von CMP-Neu5Ac nimmt dieses Enzym (GNE) eine Schlüsselrolle in der Biosynthese von Sialinsäuren ein (Kornfeld et al., 1964). Bei Hydroxylierung der Azetamidogruppe von CMP-Neu5Ac entsteht CMP-Neu5Gc. Dieser Reaktionsschritt ist von der Aktivität der Monophospho-Neu5Ac-Hydroxylase abhängig. In den meisten Säugetieren kann Neu5Gc detektiert werden, allerdings nicht beim Menschen. Verantwortlich hierfür ist eine *N*-terminale Trunkierung eines essentiellen Bereichs der humanen Hydroxylase durch Deletion eines Exons in der DNA (Irie et al., 1998).

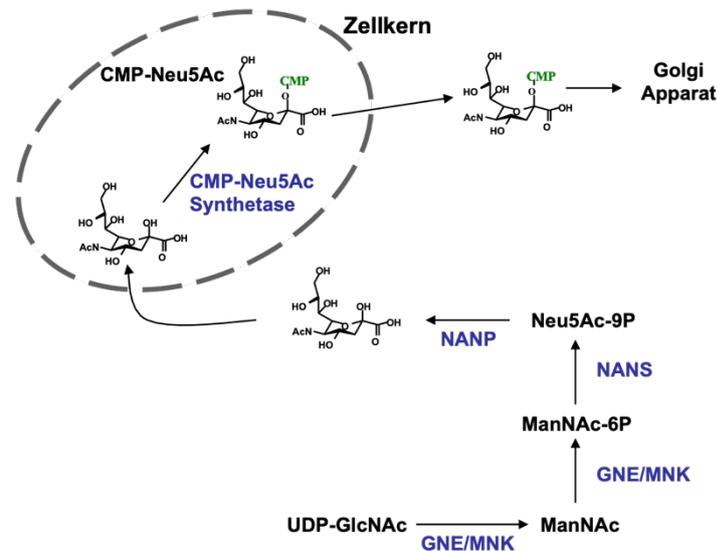


Abbildung 1.2 Sialinsäurebiosynthese

Die Abbildung bietet eine Übersicht der im Text geschilderten Reaktionsschritte. Die Enzyme sind blau dargestellt. GNE/MNK, UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ ManNAc-Kinase; NANS, Neu5Ac-9-P-Synthase; NANP, Neu5Ac-9-P-Phosphatase. Modifiziert nach Bayer et al. (Bayer et al., 2013).

CMP-Neu5Ac bzw. CMP-Neu5Gc werden anschließend über einen CMP-Neu5Ac-Transporter in den Golgi-Apparat transportiert (Eckhardt et al., 1996), wo die Sialylierung von Glykoproteinen und Glykolipiden stattfindet. Dabei unterscheiden sich die Sialyltransferasen in der Verknüpfungsspezifität und der Möglichkeit Homopolymere zu synthetisieren. Im menschlichen Genom werden mehr als 20 verschiedene Sialyltransferasen vermutet (Harduin-Lepers et al., 2001).

Der Abbau bzw. das Recycling sialylierter Glykokonjugate beginnt mit der Abspaltung der Sialinsäuren durch Sialidasen (in Säugetieren NEU 1-4), die sich in Lysosomen, dem Zytoplasma oder der Plasmamembran befinden (Miyagi and Yamaguchi, 2012). Die Neu5Ac-Aldolase spaltet daraufhin Neu5Ac in ManNAc und Pyruvat (Comb and Roseman, 1960). ManNAc kann durch Epimerisierung (GlcNAc-2-Epimerase) in GlcNAc umgewandelt werden und steht dem Hexosamin-Stoffwechsel zur Verfügung, während Pyruvat in die Glykolyse eingeschleust werden kann (Münster-Kühnel and Hinderlich, 2013).

1.1.4 Metabolisches Glykoengineering

Metabolisches Glykoengineering (MGE) der Sialinsäuren ist eine Methodik künstliche Substrat-Analoga dem Sialinsäurestoffwechsel *in vitro*, *in vivo* oder *ex vivo* zuzuführen, wobei diese metabolisiert und anschließend in sialylierte Glykokonjugate inkorporiert werden (Du et al., 2009, 2013). Die künstlich veränderten Stoffgruppen sialylierter Glykokonjugate können auf der Zelloberfläche Zell-Zell- oder Zell-Molekül-Interaktionen beeinflussen und erlauben darüber hinaus deren Visualisierung. Rückschlüsse auf die Funktion und Lokalisation der Sialinsäuren ermöglichen neue Einblicke in das große Feld der Glykomik. Die Erkenntnis über biochemische und pathologische Abläufe bei denen Sialinsäuren eine bedeutende Rolle spielen, kann ferner in der Entwicklung therapeutischer Ansätze und neuer Medikamente helfen.

Es ist die Promiskuität der Enzyme des Sialinsäurestoffwechsels, die eine chemisch strukturelle Veränderung der Substrat-Analoga erlaubt. Dabei kann der Stoffwechsel durch verschiedene Intermediate beeinflusst werden. Diese werden im Folgenden genauer beschrieben, wobei das Hauptaugenmerk auf den wichtigsten Vertreter, die ManNAc-Analoga, gelegt werden soll.

Es war die Gruppe um Brossmer, die im Laufe der 1980er Jahren begann verschiedene Struktur-Analoga von CMP-Neu5Ac zu synthetisieren und deren Inkorporation in Glykoproteine zu erforschen. Der Vorteil dieser Substrate liegt darin, den Großteil der Enzymmaschinerie von ManNAc bis CMP-Neu5Ac und damit Restriktionen der Enzyme gegenüber künstlich synthetisierter Substituenten zu umgehen. Die Sialyltransferasen zeigten in den verschiedenen Versuchen am C₉-Atom der aktivierten Sialinsäure eine große Substratpermissivität. Sogar Fluorophore, Amine, Amide, Acetamide und Azide können mit dem C₉-Atom konjugiert und mit der aktivierten Sialinsäure auf Glykoproteine übertragen werden (Conradt et al., 1984; Gross and Brossmer, 1988; Gross et al., 1987). Der Einsatz der CMP-Analoga ist allerdings nur mit Einschränkung möglich, da die Gesamtladung den Transport über eine Lipiddoppelmembran verhindert (Hirschberg et al., 1976).

Neu5Ac-Analoga bieten eine weitere Möglichkeit in den Stoffwechsel einzuschreiten und künstliche Sialinsäure in Glykokonjugate der Zelloberfläche zu inkorporieren. Nachdem die zelluläre Aufnahme von Neu5Ac aus dem Kulturmedium wissenschaftlich belegt wurde, konnte auf Basis dessen die Aufnahme und Inkorporation von Neu5Ac-Analoga demonstriert werden (Oetke et al., 2002, 2001). Im Gegensatz zu CMP-Neu5Ac-Analoga, ist die Membrangängigkeit und Bioverfügbarkeit dieser künstlichen Analoga gut, deren Synthese einfacher und Substitutionen an den Atomen C₅ bzw. C₉ sind möglich. Die spezielle Modifikation des C₉-Atoms kann gezielt die Bindungseigenschaften von Siglecs (sialic acid-binding immunoglobulin type-lectins)

beeinflussen (Oetke et al., 2002). Der bedeutende Vorteil gegenüber ManNAc-Analoga ist die Umgehung der „Flaschenhals-Reaktion“ der Neu5Ac-9P-Synthase (NANS) (Viswanathan et al., 2003). Gerade für bestimmte Bakterienstämme, deren Ausgangssubstrat für den Sialinsäurestoffwechsel Neu5Ac darstellt und notwendige Enzyme für ManNAc fehlen, bieten Neu5Ac-Analoga die Basis für strukturelle Modifikationen (Goon et al., 2003).

Schon zu Beginn der 1980er wurden ManNAc-Analoga im Feld der Krebsforschung als alternative Therapiemöglichkeit untersucht, um die starke Sialylierung neoplastischer Zellen zu reduzieren (Schwartz et al., 1983). Etwa 10 Jahre später war es die Gruppe um Kayser und Reutter, denen die Inkorporation von ManNAc-Analoga mit verlängerter *N*-Acylseitenkette *in vitro* und *in vivo* gelang (Kayser et al., 1992). ManNAc-Analoga müssen im Gegensatz zu CMP-Neu5Ac- und Neu5Ac-Analoga den gesamten Sialinsäurestoffwechsel durchlaufen, bis sie auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Daher muss während der Entwicklung neuer Strukturanaloga die Substratspezifität der beteiligten Enzyme berücksichtigt werden. Die Amidgruppe des C₂-Atoms ist hinsichtlich der Synthese essentiell und kann nicht ersetzt werden. Die Verlängerung der *N*-Acylkette wird dagegen zu einem gewissen Grad von der Enzymmaschinerie toleriert, stößt aber bei Erweiterung der Kette um mehr als fünf C-Atome und zusätzlichen Verzweigungen auf eine deutliche Restriktion. Es sind die ManNAc-Kinase und Neu5Ac-Synthase, die limitierend gegenüber langen *N*-Acylseitenketten wirken (Jacobs et al., 2001; Viswanathan et al., 2003). Außerdem ist die Neu5Ac-Synthase restriktiv gegenüber der Phosphorylierung von C₆-Modifikationen (Lawrence et al., 2000), die nach Reaktion an der C₉-Position erscheinen.

In den letzten zwei Jahrzehnten haben sich viele Modifikationen der *N*-Acylseitenkette gefunden, die sich als mögliche Substrate im MGE herausstellten (Keppler et al., 2001; Wratil et al., 2016). Die verschiedenen Modifikationen lassen sich in aliphatische und bioorthogonale Analoga unterteilen. Aliphatische Analoga tragen eine durch Methylengruppen verlängerte *N*-Acylseitenkette. Bioorthogonale Gruppen dagegen tragen Substituenten, die im Organismus nicht vorkommen und an keiner biologischen Reaktion beteiligt sind. Die bioorthogonale Markierung der Sialinsäuren mit einer funktionellen Gruppe ermöglicht eine selektive Reaktion mit Signalmolekülen, die deren Lokalisation erlaubt. Zu den bioorthogonalen Gruppen zählen Ketone (Jacobs et al., 2000; Mahal et al., 1997), Azide (Luchansky et al., 2003; Saxon and Bertozzi, 2000), Aryl-Azide (Han et al., 2005), Alkyne (Hsu et al., 2007), Diazirine (Tanaka and Kohler, 2008) und Thiole (Sampathkumar, Li et al., 2006).

Die zelluläre Aufnahme von ManNAc durch Monosaccharid-Transporter ist relativ gering. Um die Membranpermeabilität der Substrate und damit deren metabolischen Einfluss zu steigern, werden freistehende Hydroxylgruppen mit kurzkettigen Fettsäuren verestert, die durch zelluläre Esterasen wieder abgespalten werden können (Sarkar et al., 1995). Der Aufnahmefluss der Analoga ist direkt abhängig von der Konzentration im Medium. Dadurch kann die Metabolisierung durch peracetylierte ManNAc-Analoga um den Faktor 900 gesteigert werden (Jones et al., 2004). Zwar steigt mit zunehmender Kettenlänge der Esterderivate die Effizienz der zellulären Aufnahme weiter an, gleichzeitig nehmen die Derivate aber auch stetigen Einfluss auf ein abnehmendes Zellwachstum und Apoptose. In hohen Konzentrationen konnte mit *O*-Ac₄-ManNAc im Vergleich zu *O*-Prop₄-ManNAc, *O*-But₄-ManNAc und anderen langkettig veresterten Analoga das Maximum der Sialinsäurebiosynthese erreicht werden. In geringen Konzentrationen der Mannosaminderivate im Kulturmedium hingegen, erreichte man durch Behandlung mit *O*-Prop₄-ManNAc oder *O*-But₄-ManNAc, verglichen mit *O*-Ac₄-ManNAc, einen wesentlich höheren Sialinsäuregehalt pro Zelle (Kim EJ et al., 2004). Die negative Auswirkung auf das Zellwachstum durch But₄ManNAc könnte allerdings Anwendung in der Krebstherapie finden. Nach zellulärer Spaltung der Esterverbindung entsteht zytosolisches *n*-Butyrat, das die Histon-Deacetylase inhibiert und in Krebszellen den Zelltod bewirkt (Sampathkumar, Campbell et al., 2006).

Gerade die aliphatische Veränderung der *N*-Acylseitenkette hat in der Vergangenheit im Wesentlichen dazu beigetragen biologische Prozesse zu modulieren und untersuchen. Die hydrophobe Exposition an der Zelloberfläche verleiht den behandelten Zellen neue charakteristisch biologische Eigenschaften. Auch bei höheren Konzentrationen von ManNAc-Analoga mit aliphatischen Seitenketten im Medium haben diese keinen bzw. nur geringen cytotoxischen Einfluss auf inkubierte Zellen (Bayer et al., 2013) und erlauben somit einen großen Austausch natürlich exponierter Neu5Ac durch das jeweilige Substratanaloga.

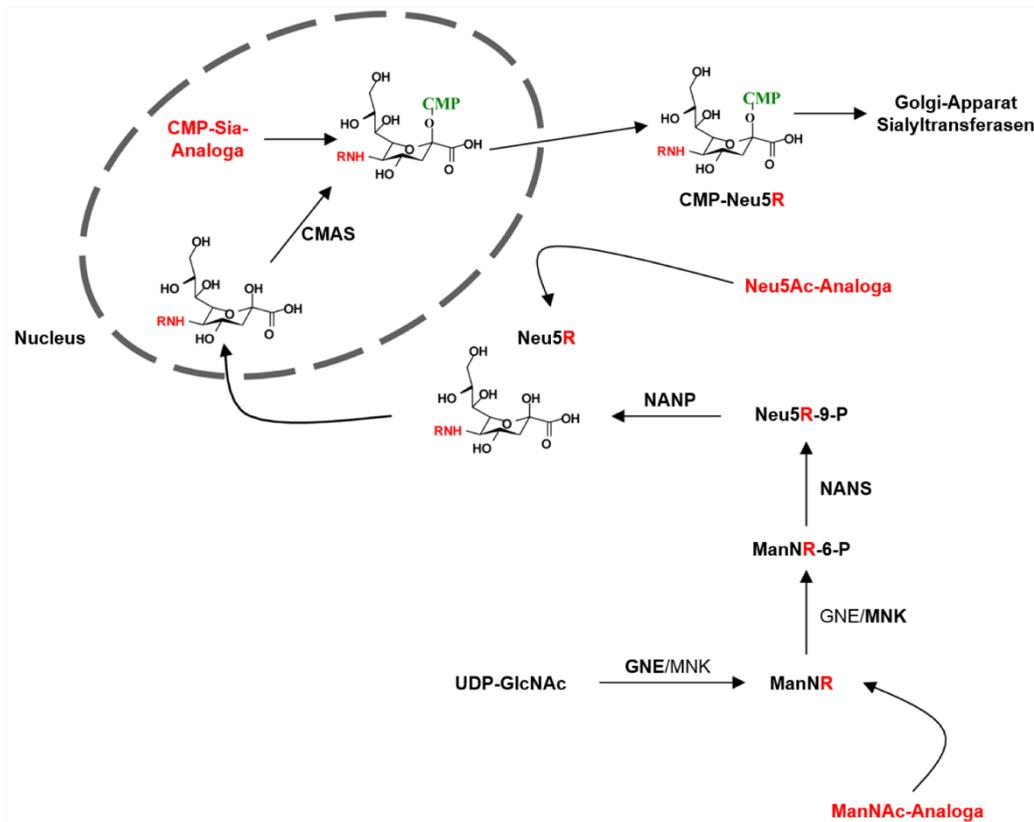


Abbildung 1.3 Übersicht - Metabolisches Glykoengineering der Sialinsäuren

Dargestellt sind die Reaktionsschritte der Sialinsäurebiosynthese mit den jeweiligen Enzymen und Substraten. Die möglichen Einschleusungspunkte sind durch rot markierte modifizierte Analoga (ManNAc-, Neu5Ac-, CMP-Sia- Analoga) dargestellt. Der chemisch modifizierte Rest des auftretenden Stoffes, in diesem Fall die *N*-Acylseitenkette, ist ebenfalls rot gekennzeichnet. Im Text sind die Schritte näher erläutert. GNE/MNK, UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ ManNAc-Kinase; NANS, Neu5Ac-9-P-Synthase; NANP, Neu5Ac-9-P-Phosphatase; CMAS, CMP-Neu5Ac-Synthetase. Modifiziert nach Bayer et al. (Bayer et al., 2013).

In der Virologie ist Neu5Ac membranständiger Glykoproteine und -lipide bei verschiedenen Virenstämmen von enormer Bedeutung. Während der initialen Infektion und dem Verlassen der infizierten Zelle interagiert das Virus mit Neu5Ac der Wirtszelle (siehe 1.2.4). Das integrale Membranprotein Hämagglutinin des Influenza-A- und -B-Virus bindet Neu5Ac initial, wobei unter anderem die *N*-Acetyl-Gruppe ein essentielles Bindungselement ist. Verbindungen ohne diese Gruppe oder mit deren Modifikation verändern die Bindungsaffinität (Kelm et al., 1992; Matrosovich et al., 1993). Nach Inkubation einer Zellkultur mit aliphatischen ManNAc-Analoga, wie ManNProp, ManNBut oder ManNPent, exponieren die behandelten Zellen verlängerte *N*-Acylseitenketten auf ihrer Zelloberfläche. Dabei können bis zu 85% der Glykokonjugat-assoziierten Sialinsäuren durch Strukturanaloga ersetzt sein (Mantey et al., 2001). Die Exposition aliphatischer Strukturanaloga reduziert dabei deutlich die initiale Infektion von Influenza-A-Viren. Schon der Unterschied einer zusätzlichen Methylengruppe in der Seitenkette

führt zu einer erheblichen Steigerung der Resistenz (Keppler et al., 1998). Interessanterweise unterscheidet sich die Wirkung nach Veränderung der Zelloberfläche bei verschiedenen Polyomaviridae, die Sialinsäuren als Rezeptoren für die initiale Bindung benötigen. Während nach Behandlung von ManNProp, ManNBut und ManNPent die Resistenz gegenüber dem B-lymphotropen Papovavirus steigt, fördert die Behandlung mit ManNProp eine Infektion durch das Humane Polyomavirus 1 (BK-Virus) (Keppler et al., 1995). Die enzymatische Spaltung von Sialinsäuren der Zelloberfläche durch eine Sialidase reduziert ebenfalls drastisch das Infektionsrisiko des B-lymphotropen Papovavirus und betont die Bedeutung endständiger Sialinsäure während der Infektion (Haun et al., 1993). Es wird deutlich, wie MGE dazu beiträgt Zell-Molekül-Interaktionen zu verstehen. Die Neuraminidase, ein weiteres oberflächliches Glykoprotein des Influenza-Virus, ist wichtig für die initiale Infektion und das Verlassen infizierter Zellen (Air and Laver, 1989; Matrosovich et al., 2004). Allerdings wurde diesem Protein in der Vergangenheit weniger Aufmerksamkeit geschenkt. Die Erkenntnis über die Bindungseigenschaften, die Funktion und Struktur der oberflächlichen Virusproteine sowie das Testen vieler verschiedener Substanzklassen, hat in der Vergangenheit wesentlich zur Entwicklung neuer Medikamente beigetragen (siehe 1.2.5) und wird auch in Zukunft dazu beitragen können.

Die Anwendung von ManNAc-Analoga bietet ein breites Anwendungsgebiet. Sie können Einfluss auf verschiedenste Bereiche wie die Angiogenese (Bayer et al., 2013), das neuronale Wachstum (Schmidt et al., 1998), die bakterielle Toxizität (Goon et al., 2003), das Immunsystem (Roehlecke et al., 2013), die Zell-Zell-Interaktionen (Horstkorte et al., 2004) oder die Tumorzellen und Krebstherapie (Gnanapragassam et al., 2014; Liu et al., 2000) haben. Die Vielseitigkeit und Möglichkeit diverser Modifikation macht diese Substratanaloga zum Mittel der Wahl im Forschungsgebiet des MGE der Sialinsäuren.

1.2 Influenza-Virus

1.2.1 Allgemeines und struktureller Aufbau

Influenza, „echte Grippe“, ist eine durch das Influenza-Virus ausgelöste Infektionskrankheit des Menschen. Das Virus gehört zur Familie der Orthomyxoviridae, die folgende Genera umfasst: Influenza-A-Virus, Influenza-B-Virus, Influenza-C-Virus, Thogotovirus, Isavirus. Kennzeichnend ist das einzelsträngige RNA-Genom mit negativer Polarität (King et al., 2011; Lefkowitz et al., 2018). Der Ursprung des Influenza-A-Virus liegt bei den aquatischen Vögeln (Webster et al., 1992) und ist daher eine zoonotische Erkrankung. Die Verbreitung erfolgt hauptsächlich über Tröpfcheninfektion. Als Beispiel für das Ausmaß dieser durchaus lebensbedrohlichen Erkrankung sollte allen voran die

„spanische Grippe“ erwähnt sein, die zu den größten Pandemien des 20. Jahrhunderts zählt. Während der spanischen Influenza-Pandemie 1918-1919 betrug die Zahl der Todesopfer etwa 50 Millionen (Taubenberger and Morens, 2006). Eine solche Folge aber auch die Epidemien der vergangenen Zeit betonen die Wichtigkeit der Entwicklung neuer Wirk- und Impfstoffe im Kampf gegen Influenza.

Die Nomenklatur des Influenza-A-Virus richtet sich nach den Oberflächenglykoproteinen Neuraminidase und Hämagglutinin und unterteilt die Viren in verschiedene Subtypen. 18 HA und 11 NA Subtypen sind bekannt. Davon haben 16 HA und 9 NA Subtypen ihren Ursprung im Intestinaltrakt aquatischer Vögel (Assaad et al., 1980; Russell et al., 2008). 2013 wurden zusätzlich jeweils zwei Subtypen in Fledermäusen gefunden, deren Krankheitsverlauf klinisch stumm verläuft und keine Verbindung zu terminalen Sialinsäuren zeigt (Tong et al., 2013; Webster and Govorkova, 2014; Wu et al., 2014). Die weiteren Abschnitte geben Einblick in den strukturellen Aufbau des Influenza-Virus. Dazu werden neben dem Infektionszyklus die Glykoproteine Neuraminidase (NA) und Hämagglutinin (HA) genauer erläutert, da diese mit terminalen Sialinsäuren interagieren und im Wesentlichen ausschlaggebend für die Thematik der vorliegenden Arbeit waren.

Das Influenza-Virus ist von einer Lipiddoppelmembran umgeben und erscheint pleomorph in sphärischer oder filamentöser Struktur. Während die sphärische Form einen Durchmesser von etwa 100 nm besitzt, liegt die Länge der Filamentösen durchschnittlich bei 300 nm (Bouvier and Palese, 2008). In der Membran sind die Glykoproteine NA und HA dicht aber unregelmäßig verankert und bilden Spikes. Der Durchmesser der Spikes beträgt etwa 4,7 nm. NA (16 nm) ragt weiter von der Membran heraus als HA (14 nm) (Harris et al., 2006).

Im Inneren des Viruspartikels befindet sich das einzelsträngige RNA-Genom der Influenza-Viren, das komplementär zur Basensequenz der messenger RNA ist und eine RNA-abhängige RNA-Synthese voraussetzt (Baltimore, 1971). Bereits in den 60er Jahren wurde erkannt, dass das Genom des Influenza-Virus aus mehreren RNA-Segmenten besteht (Duesberg, 1968), wobei das Influenza-A-Virus 8 RNA-Segmente zählt (Lamb, 1983).

Das Matrixprotein M1 kleidet von innen die Virushülle aus, inseriert in die Lipiddoppelmembran und wirkt stabilisierend. Zu den lipidbindenden Regionen des Proteins zählen vor allem die hydrophoben und neutralen Aminosäuren ab den Positionen 114 und 62 (Gregoriades and Frangione, 1981). Außerdem bindet M1 in Influenza-A-Viren spezifisch einzelsträngige RNAs und RNPs (Wakefield and Brownlee, 1989).

Das Matrixprotein M2 bildet als integrales Membranprotein einen Protonenkanal, der in der initialen Infektion der Wirtszelle bedeutsam ist und über den vorherrschenden pH-Wert kontrolliert wird (Pinto et al., 1992).

Die Synthese von mRNA aus viraler RNA (vRNA) ist nur mit einem viralen Polymeraskomplex möglich, der eine RNA-abhängige RNA-Polymeraseaktivität besitzt. Dieser replikationsrelevante Komplex ist grundlegend für die Entstehung viraler Proteine, die für die weitere Transkription und Translation notwendig sind. Der heterotrimere Komplex besteht aus dem sauren Polymeraseprotein (PA), sowie den basischen Polymeraseproteinen 1 und 2 (PB1, PB2) (Braam et al., 1983).

Der Viruskern besteht aus helikalen Ribonukleoprotein-Komplexen (RNP). Diese setzen sich aus dem Nukleoprotein (NP), der vRNA und dem trimeren Polymerasekomplex (PA, PB1 und PB2) zusammen. Dabei vermittelt das Nukleoprotein dessen Kerntransport in einer infizierten Wirtszelle (O'Neill et al., 1995).

Das Nichtstruktur-Protein (NS2/ NEP), auch „nuclear export protein“ bezeichnet, ist an dem nukleären Export viraler RNA beteiligt. Es interagiert mit viralen Ribonukleoprotein-Komplexen, vermutlich über M1 und nukleäre Exportkomponenten, wie Nukleoporine der Wirtszelle (O'Neill et al., 1998). Zudem konnten Martin et al. zeigen, dass M1 entscheidend für den nukleären Export ist (Martin and Helenius, 1991).

1.2.2 Hämagglutinin

Hämagglutinin (HA) ist ein integrales Membranglykoprotein vom Typ I. Es inseriert mit dem C-Terminus in die Membran des Virus. N- und C-Terminus sind am gleichen Punkt der Membran lokalisiert. HA ist ein Homotrimer und besteht somit aus drei identischen Untereinheiten. Zur Aktivierung des HAs werden die drei Untereinheiten HA0 jeweils in HA1 und HA2 geteilt, die dann über kovalente Disulfidbrücken in Verbindung stehen (Wiley and Skehel, 1987). Die posttranslationale Spaltung von HA0 ist ein wichtiger Pathogenitätsfaktor (Lazarowitz and Choppin, 1975), da die Spaltung unabdingbar für die Infektion und Vermehrung des Virus ist. Es wird zwischen mono- und multibasischer Spaltstelle unterschieden. Monobasische Spaltstellen (basische AS Arginin) kommen in humanpathogenen Viren vor und werden extrazellulär im oberen Respirationstrakt, zum Beispiel durch die sezernierte trypsinähnliche Protease der Clara-Zellen, gespalten, wodurch sich das Virus auch auf diesen Bereich im Körper beschränkt. Diese Prozessierung erfolgt außerhalb der Zelle (Kido et al., 1992). Polybasische Spaltstellen sind in aviären Subtypen wie H5 und H7 vorhanden. Proteasen, die dieses Muster erkennen, kommen ubiquitär in vielen Zellen des Körpers vor. Daher ist HA beim Verlassen neuer Virionen bereits gespalten. Das erklärt die hohe Pathogenität solcher Viren und die Gefahr einer systemischen Infektion (Horimoto and Kawaoka, 2005).

HA bindet initial den Wirtszellrezeptor, terminale Sialinsäuren von Glykoproteinen und Glykolipiden. Am globulären Kopf des Glykoproteins befindet sich die Rezeptorbindungsstelle. Anhand des humanen H3 HA soll die konservierte Struktur dieser wichtigen Region des Moleküls erläutert werden. Die Basis der Rezeptorbindetasche bildet ein Netzwerk aus den Aminosäuren Tyr-98, Trp-153, His-183 und Tyr-195. Zudem ist sie von drei konservierten sekundären Strukturen umgeben: 130-Loop, 220-Loop und 190- α -Helix. Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kräfte bilden die Grundlage für die Bindung mit dem Wirtszellrezeptor, der terminalen Sialinsäure. Folgende Aminosäuren von HA gehen Wasserstoffbrückenbindungen ein: die OH-Gruppe Tyr-98 mit OH-8 der Sialinsäure; die Carbonylgruppe der Hauptkette Gly-135 mit dem Azetamido N der Sialinsäure; die OH-Gruppe Ser-136 mit dem Carboxylat der Sialinsäure bei zusätzlicher Stabilisierung über eine OH-Gruppe Asn-137 der Hauptkette; Glu-190, His-183, Ser-228 mit OH-9 der Sialinsäure. Weiterhin stabilisieren van-der-Waals-Kräfte der Azetamido-Methyl-Gruppe der Sialinsäure mit Trp-153 die Bindung (Gamblin and Skehel, 2010; Weis et al., 1988). Der Bindungsmechanismus, Spezifität und Affinität des HAs, wurden unter anderem durch nukleare magnetische Resonanz und Kristallstrukturanalysen mit verschiedenen Sialinsäureanaloga erforscht (Sauter et al., 1989, 1992). Matrosovich et al. konnten durch kompetitive Bindungsassays mit Sialinsäureanaloga und verschiedenen Influenza-Viren die *N*-Acetyl-Gruppe, die Carboxyl-Gruppe des C₂-Atoms und die Hydroxylgruppe des C₄-Atoms von Neu5Ac als essentielle Bindungselemente des HAs identifizieren (Matrosovich et al., 1993).

Die Verknüpfung der jeweiligen Sialinsäuren zu Galactose ist artspezifisch. So erlaubt die Rezeptorspezifität des HAs nur eine effiziente Bindung bei bestimmter Verlinkung der Sialinsäuren des Wirts. Immunhistochemische und Lektin-Bindungs-Assays erlauben eine Darstellung oberflächlicher Sialinsäuren und Differenzierung der endständigen Verknüpfungen auf der Zelloberfläche. In Pferden wurden vorwiegend Sialinsäuren mit Neu5Gc- α 2,3-Gal Verknüpfungen im Epithel der Trachea gebunden, während im humanen Gewebe überwiegend Neu5Ac- α 2,6-Gal Verbindungen erkannt wurden. Humane Influenza-A-Viren binden daher auch überwiegend Neu5Ac- α 2,6-Gal Verknüpfungen, Influenza-A-Viren der Pferde dagegen vor allem Neu5Gc- α 2,3-Gal bzw. Neu5Ac- α 2,3-Gal (Suzuki et al., 2000). Im Gegenteil dazu befinden sich auf der Zelloberfläche der Trachea aquatischer Vögel überwiegend die Verlinkung Neu5Ac- α 2,3-Gal. Eine Ausnahme stellt das Schwein dar, denn hier kommen sowohl Neu5Ac- α 2,3-Gal als auch Neu5Ac- α 2,6-Gal vor. Daher ist eine Reassortierung von humanen, aviären oder Influenza-A-Viren der Pferde durch einen antigenen Shift, also dem Austausch von HA- bzw. NA-Gensegmenten, im Schwein als Zwischenwirt möglich und

kann eine Pandemiegefahr bergen. Zudem können Mutationen im HA (antigener Drift) eine Adaptation an spezifische Verlinkung verursachen, wodurch beispielsweise ein aviärer Influenza-Virus (präferiert Neu5Ac- α 2,3-Gal) seine Affinität zu Neu5Ac- α 2,6-Gal im humanen Wirt steigert (Ito et al., 1998).

Fukosylierung, Sulfatierung und Sialylierung der Galaktose an zweiter Position der terminalen Sialinsäure (Stevens et al., 2006) und der Unterschied zwischen kurzer verzweigter oder langer unverzweigter sialylierter Glykane (Gulati et al., 2013) nehmen auch entscheidend Einfluss auf die Bindungsaffinität des HAs zum Wirtszellrezeptor.

1.2.3 Neuraminidase

Die Neuraminidase ist ein integrales Membranglykoprotein vom Typ II. Das Molekül ist ein Homotetramer aus identischen Untereinheiten. Die Monomere bestehen jeweils aus sechs viersträngigen antiparallelen β -Faltblättern, organisiert in einer Propellerformation und stabilisiert über Wasserstoff-, Disulfidbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen. Die aktive Seite befindet sich im Zentrum einer jeden Untereinheit. Der *N*-Terminus ist hydrophob und verankert das Protein in der Membran. Viele Strukturen des Proteins sind hochkonserviert und weisen nur geringe Variationen in den verschiedenen Subtypen auf (Varghese and Colman, 1991; Varghese et al., 1983).

Während der Virusreplikation spalten NA Sialinsäuren von zellulären Glykokonjugaten, also von Glykoproteinen und Glykolipiden, als auch von den beiden Glykoproteinen des Influenza-Virus. NA löst im letzten Schritt des Infektionszyklus neue Viruspartikel von der Wirtszelle (Palese et al., 1974), spielt aber auch in der initialen Infektion eine bedeutende Rolle (Matrosovich et al., 2004) (siehe 1.2.4).

Im aktiven Zentrum stehen verschiedene Aminosäuren in engem Kontakt zur Sialinsäure. Die Aminosäuren Arg-118, Asp-151, Arg-152, Arg-224, Glu-276, Arg-292, Arg-371 und Tyr-406 katalysieren die Reaktion. Die Interaktion mit dem Substrat ist durch weitere Strukturen organisiert und definiert. Die Carboxylgruppe der Sialinsäure interagiert mit einem Triarginylcluster (Arg-118, Arg-292, Arg-371). Mit den Hydroxylgruppen der Atome C₃ und C₄ interagieren Asp-151 und Glu-119. Glu-227 geht eine Wasserstoffbrückenbindung mit einem Wassermolekül ein und interagiert mit dem Wasserstoff des Stickstoffs der Azetamidogruppe (C₅). Arg-152 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Sauerstoff des Carbonyls der Azetamidogruppe (C₅). Asp-151 und Glu-276 gehen Wasserstoffbrückenbindungen mit der Glycerolseitenkette (C₈, C₉) ein (Russell et al., 2013; Varghese and Colman, 1991).

Die NA des humanen Influenza-A-Virus H3N2 zeigt im Gegenteil zu HA eine breite enzymatische Spezifität im Umsatz des Substrats bezüglich der Verlinkung zwischen Sialinsäuren und Glykoprotein bzw. -lipid. Diese werden allerdings nicht mit gleicher

Effizienz umgesetzt. Die Neuraminidase A/Hong Kong/68 (H3N2) spaltet bevorzugt Neu5Ac- α 2,3- und α 2,8-Verlinkungen, dagegen nur sehr gering α 2,6-Verlinkungen (Cabezas et al., 1980). Baum und Paulson stellten einen evolutionären antigenen Drift von Neu5Ac- α 2,3-Gal hin zu Neu5Ac- α 2,6-Gal in der Spezifität der Neuraminidase N2 des Influenza-A-Virus fest (Baum and Paulson, 1991). Auch Kobasa et al. konnten beweisen, dass verschiedene humane Neuraminidasen eine hohe Spezifität für Ganglioside mit terminaler Neu5Ac- α 2,3-Gal Verlinkung teilen, während die Substratspezifität für Neu5Ac- α 2,6-Gal zwischen früh und spät isolierten Viren variiert. So können früh isolierte Neuraminidasen humaner Viren nur wenig Neu5Ac- α 2,6-Gal umsetzen, während die Aktivität spät isolierter humaner Neuraminidasen wesentlich höher ist. Eine Substitution von Isoleucin zu Valin an Position 275 scheint die Spezifität für Neu5Ac- α 2,6-Gal Verlinkungen entscheidend zu beeinflussen. Die Substitution konnte in spät isolierten humanen als auch porzinen Viren bestätigt werden (Kobasa et al., 1999).

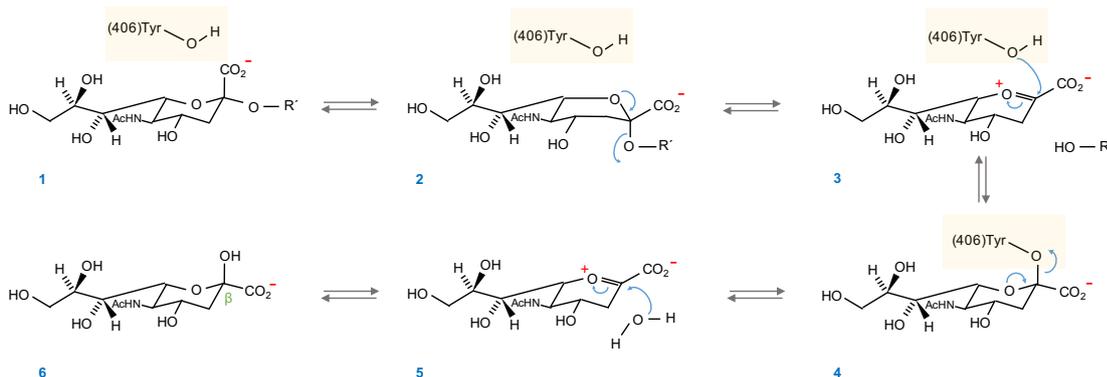


Abbildung 1.4 Katalytischer Reaktionsmechanismus der Neuraminidase

Die Darstellung bietet einen Überblick der verschiedenen Reaktionsschritte für die Abspaltung endständiger Sialinsäuren. Die einzelnen Schritte sind im nächsten Abschnitt erläutert. Modifiziert nach Russel und Itzstein et al. (Russell et al., 2013; von Itzstein, 2007).

Der genaue Mechanismus der Reaktion, katalysiert durch die Neuraminidase, ist bisher nicht exakt erforscht. Die im Folgenden beschriebenen Reaktionsschritte entsprechen den Ansichten Russells und von Itzsteins (Russell et al., 2013; von Itzstein, 2007). Das Substrat Neu5Ac bindet den aktiven Bereich der Neuraminidase (siehe oben). Zwischen Carboxylat (Neu5Ac) und Triarginylcluster (NA) bildet sich eine Salzbrücke. Das Substrat geht dabei von der stabilen Sessel-Konformation (1. Schritt) in eine α -Boot-Konformation (2. Schritt) über. Es entsteht ein Sialosylkation, ein Oxocarbenium-Ion, dessen Stabilität die Trennung der glykosidischen Bindung katalysiert (3. Schritt). Die verbleibende Zuckerkette mit dem glykosidischen Sauerstoff verlässt das aktive Zentrum der Neuraminidase. Saure Reste der Aminosäuren des aktiven Zentrums stabilisieren

die positive Ladung des Oxocarbenium-Ions und den planaren Kohlenstoff am C₂-Atom. Das Substrat wird über die Hydroxylgruppe von Tyr-406 kovalent gebunden (4. Schritt). Nach Hydroxylierung des Oxocarbenium-Ions (5. Schritt), dissoziiert das Produkt (6. Schritt).

1.2.4 Infektionszyklus des Influenza-Virus

Der initiale Schritt der Infektion stellt die Bindung des Virus an zelluläre Rezeptoren des Wirts dar. HA bindet endständige Sialinsäuren von Glykoproteinen bzw. -lipiden der Zelloberfläche, die mit Galactose verknüpft sind und vermittelt somit den ersten Kontakt zwischen Virus und Zelle (Weis et al., 1988; Wiley and Skehel, 1987). Auch das Oberflächenglykoprotein NA ist an der frühen Infektion beteiligt. Es wird die Entfernung von Rezeptoren auf Muzinen, Zilien und zellulärer Glykokalix diskutiert, die für das Virus ohne Bedeutung sind. Dadurch würde der Viruszugang zu den funktionellen Rezeptoren der Zelloberfläche erleichtert (Matrosovich et al., 2004). Nach Bindung des Rezeptors kann das Virus durch Clathrin- und Caveolin-vermittelte aber auch Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose sowie über Makropinozytose in die Wirtszelle aufgenommen werden (Lakadamyali et al., 2004; Rust et al., 2004). Die Fusion der Endosomenmembran mit der des Virus wird durch den niedrigen pH-Wert ausgelöst. Eine Konformationsänderung des HAs (Bullough et al., 1994) führt zur Exposition des hydrophoben Fusionspeptids der HA2-Untereinheit und ist ausschlaggebend für die Verschmelzung beider Membranen (Stegmann, 2000; Steinhauer et al., 1995). Der Protonenkanal führt zudem zur Absenkung des pH-Wertes im Inneren des Virions (Pinto et al., 1992) und schwächt die Bindung zwischen M1 und der Virusmembran bzw. der vRNPs (Fontana et al., 2012). Es kommt zur Freisetzung von vRNPs und damit zum Abschluss des Uncoatings (Dekodierung).

Virale Nukleoproteine wirken als Kernlokalisierungssignale und vermitteln den Kerntransport der vRNPs (O'Neill et al., 1995). Im Zellkern erfolgt die Transkription, also die mRNA-Synthese aus komplementärer vRNA. Die Replikation neuer vRNA und anschließende Entstehung neuer vRNPs erfordert zuvor die Synthese viraler cRNA aus vorhandener vRNA (Sidorenko and Reichl, 2004; Smith GL and Hay, 1982). M1 und NEP vermitteln den Transport neuer vRNP-Komplexe aus dem Zellkern (Eisfeld et al., 2015; Martin and Helenius, 1991; O'Neill et al., 1998). Virale Membranproteine werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Doms et al., 1993), Kernproteine im Cytoplasma synthetisiert, um anschließend in den Zellkern oder zur Assemblierung in Richtung Plasmamembran transportiert zu werden.

Im Bereich der apikalen Plasmamembran sammeln sich neu synthetisierte Genomsegmente und Proteine. Eine genaue Übersicht über die vielen Schritte der

Assemblierung und Knospung beschreiben Rossman et. al (Rossman and Lamb, 2011) und Nayak et al. (Nayak et al., 2009). Die Membranglykoproteine NA und HA akkumulieren in Membranmikrodomänen, sogenannten Lipid rafts. Diese sind reich an Cholesterin und Sphingolipiden. Dagegen kommt M2 nicht in diesen Domänen vor und wurde in geringem Umfang im Randbereich der Knospungszone lokalisiert (Leser and Lamb, 2005). M1 dient als Hauptorganisator der Assemblierung und treibende Kraft für den Knospungsprozess. Dabei interagiert es vor allem mit RNP und NEP aber auch mit HA (Gómez-Puertas et al., 2000). Den finalen Schritt des Abschnürens und der basalen Fusion der neuen Viruspartikel vermittelt M2 (Rossman et al., 2010). Um das Loslösen der neuen Viruspartikel zu ermöglichen, spaltet NA die Verbindung zu terminalen Sialinsäuren von Glykoproteinen und -lipiden (Palese et al., 1974). Zudem werden Sialinsäuren neu synthetisierter NAs und HAs abgespalten. Dies verhindert eine erneute Anheftung an bereits infizierte Zellen und vermeidet darüber hinaus die Selbstaggregation neuer Viruspartikel (Nayak et al., 2004; Palese et al., 1974). Neue Viruspartikel verlassen die Zelle.

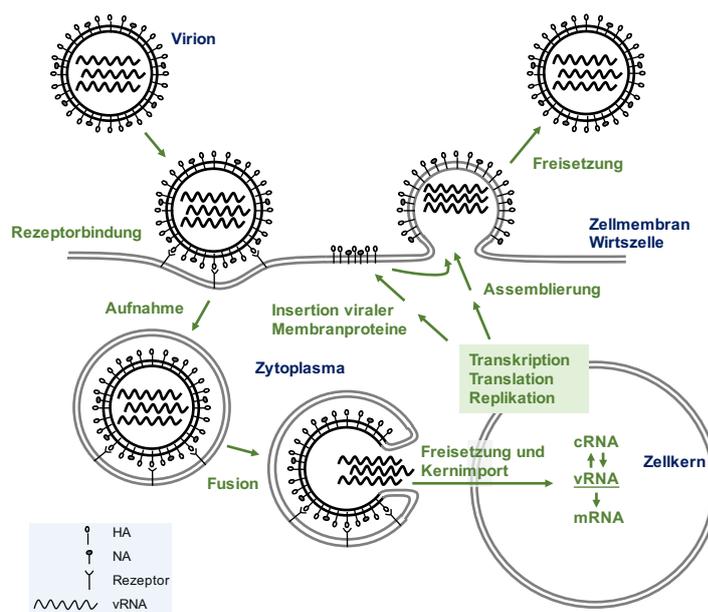


Abbildung 1.5 Infektionszyklus des Influenza-Virus

Vereinfachte Darstellung des Infektionszyklus (Influenza-Virus). Das Viruspartikel bindet initial die Wirtszelle an oberflächlichen Zellrezeptoren (Sialinsäuren). Nach Aufnahme und Fusion des Viruspartikels erfolgt die Dekodierung und Synthese neuer Viruspartikel, die letztendlich die infizierte Wirtszelle verlassen und neue Wirtszellen infizieren können. Der Replikationszyklus wird im Text näher erläutert. HA, Hämagglutinin; NA, Neuraminidase.

Die funktionelle Balance der Proteine NA und HA kann die Effektivität einer Infektion entscheidend beeinflussen. Die N-Glykosylierung in der Nähe der HA-Rezeptorbindestelle reguliert die Bindungsaffinität. Eine Abnahme der Oligosaccharide

führt zu einer Steigerung der Rezeptoraffinität und erschwert das Lösen durch die Neuraminidase erheblich (Ohuchi et al., 1997). Eine aktivere NA ist notwendig um eine weitere Infektion zu ermöglichen. Im Gegenteil dazu kann mit steigender *N*-Glykosylierung und somit sinkender Rezeptoraffinität des HAs schon eine weniger aktive Neuraminidase ausreichen, um die Freisetzung neuer Viruspartikel zu gewährleisten (Klenk et al., 2002; Wagner, Matrosovich et al., 2002). Zudem ist die *N*-Glykosylierung des HAs von Bedeutung für eine effiziente Replikation in Influenza-A-Viren (Wagner, Heuer et al., 2002).

1.2.5 Antivirale Wirkstoffe

Virostatika hemmen die Vermehrung von Viren. In der Therapie gegen Influenza bieten verschiedene Angriffspunkte eine Möglichkeit die Virusvermehrung einzuschränken: das initiale Andocken, das Verschmelzen mit der Wirtsmembran und die Dekodierung, die Transkription, Translation, Proteinsynthese und im letzten Schritt das Abschnüren und Freisetzen neuer Viruspartikel. Eine Übersicht dazu beschreibt De Clercq in seinem Review (De Clercq, 2006). Es werden die Wirkstoffe näher erläutert, die in der antiviralen Therapie gegen Influenza zur Zeit Anwendung finden. Die Medikamente nehmen Einfluss auf das Glykoprotein NA und das integrale Membranprotein M2.

Das hochkonservierte aktive Zentrum der Neuraminidase bietet einen idealen Effekt antiviraler Wirkstoffe. Die aktuelle Forschungsgrundlage der Struktur und Interaktion mit dem Substrat des Enzyms ermöglicht die Entwicklung neuer Substanzklassen zur antiviralen Therapie gegen das Influenza-Virus.

In der Vergangenheit wurden viele Substanzen getestet, um die Inhibition der Neuraminidase *in vitro* als auch *in vivo* zu optimieren. Magesh und Ando haben zusammenfassend eine gute Übersicht erarbeitet, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird (Magesh and Ando, 2013). Das Spaltprodukt des Enzyms, *N*-Acetylneuraminsäure, ist ein schwacher kompetitiver Inhibitor der Sialidase (Walop et al., 1960). Die Substitution durch Fluor am C₃-Atom (Hagiwara et al., 1994) und *S*-glykosidische Verbindungen mit Sialinsäureanaloga (Suzuki et al., 1990) konnten die inhibitorische Wirkung steigern. DANA (Neu5Ac2en), ein Übergangszustand-Analoga, zeigte eine noch bessere Wirkung als zuvor entwickelte Analoga (Meindl et al., 1974) und war in Zukunft entscheidend für die Entwicklung neuer Derivate. Zanamivir, ein Guanidin-Derivat von DANA (4-guanidino-Neu5Ac2en, GG167), wurde 1993 auf Basis der Kristallstruktur der Influenza-Virus Sialidase digital entworfen und stellte sich als hocheffektiver kompetitiver Inhibitor der Sialidase heraus. Auch in Zellkultur- und Tierversuchen konnte die Replikation des Virus unterbunden werden. Die 4-Guanidin-Gruppe besetzt eine kleine Tasche des aktiven Zentrums der Neuraminidase und

interagiert mit den sauren Aminosäureresten von Glu-119, Asp-151 und Glu-227 (Taylor et al., 1998; von Itzstein et al., 1993). Die hohe Polarität des Moleküls und die niedrige Bioverfügbarkeit erfordern die Aufnahme des Substrats über Inhalation, um die Infektion direkt entscheidend beeinflussen zu können (Smith PW et al., 1998). Es sind nur wenige Resistenzen gegen Zanamivir bekannt. Aus einer Analyse von 391 Influenza-A-H1N1-Viren im asiatischen Raum aus den Jahren 2006 bis 2008 konnten bei lediglich 2,3 % der Viren eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Zanamivir festgestellt werden. Es handelte sich um eine Gln-136-Lys(Q136K)-Mutation (Hurt et al., 2009).

Auf der Suche nach einem potenten oralen Neuraminidaseinhibitor wurde ein Cyclohexanring als Grundlage verwendet, der chemisch wie enzymatisch stabil ist und Modifikationen erlaubt. Dabei wurde ein 3-Pentyl-Analoga, GS-4071, gefunden, das eine enorme Bindungsfähigkeit zeigte. Die Besonderheit von GS-4071 ist die hydrophobe Wechselwirkung der 3-Pentyl-Seitenkette mit dem Enzym, wobei eine der Ethylgruppen mit den Aminosäuren Ile-222, Arg-224 und Ala-246 interagiert. Die andere Ethylgruppe der 3-Pentyl-Seitenkette ermöglicht, durch Rotation der Seitenkette von Glu-276, die Bindung einer hochpolaren Region (Kim CU et al., 1997; Lew et al., 2000). Die orale Bioverfügbarkeit von GS-4071 bei Ratten lag allerdings bei unter 5%, intravenös bei 100%. Durch weitere Forschung gelang die Entwicklung von Oseltamivir (GS-4104), die korrespondierende Ethyl-Ester-Prodrug von GS-4071. Die orale Bioverfügbarkeit konnte bei Ratten immens gesteigert werden und war 5 mal höher als das Vorläufermolekül (Li W et al., 1998). Im Gegensatz zu Zanamivir treten bei Oseltamivir regelmäßig Fälle von resistenten Influenza-A-Stämmen auf. In einer deskriptiven Studie konnten resistente H3N2 Viren bei Kindern, die während der Erkrankung mit Oseltamivir behandelt wurden, isoliert werden. 18% der Patienten zeigten Mutationen, 6 Patienten in Position 292 (Arg292Lys) und 2 in Position 119 (Glu119Val). Die Resistenz wurde bereits am 4. Tag nach der Behandlung entdeckt (Kiso et al., 2004).

Der dritte antivirale Wirkstoff, der zur Verwendung gegen Influenza A Anwendung findet, ist Amantadin, ein trizyklisches, primäres Amin. Es ist das erste zugelassene Virostatikum gegen Influenza, dessen Wirkung bereits in den 60er Jahren untersucht und Ende der 60er zur Behandlung in einer Studie verabreicht wurde (Davies et al., 1964; Grunert et al., 1965; Wingfield et al., 1969). Mit der Blockade des M2-Protonenkanals kann die Aufnahme der Viruspartikel in das Zytoplasma durch das Verschmelzen mit der Endosomenmembran vermieden werden (Duff and Ashley, 1992; Wang et al., 1993). Schnell treten bei Behandlung mit Amantadin hochfrequentierte Resistenzen auf, die auf einzelne Aminosäuresubstitutionen zurückzuführen sind (Shiraishi et al., 2003).

Ein anderer Ansatz für die Entwicklung neuer Inhibitoren beruht auf der Basis natürlicher Oligosaccharide, die terminale Sialinsäureresiduen tragen (Matrosovich and Klenk, 2003). Denn ausschlaggebend für die Bindung des Rezeptors bzw. die Spaltung des Substrats ist neben der Grundstruktur der Sialinsäure auch der an sie gebundene Zucker und die daran anschließende Struktur (Sun, 2007). Die Idee der hier vorliegenden Arbeit war es, die natürlichen Struktureigenschaften der Glykokonjugate einer Lungenzelllinie zu nutzen, diese künstlich zu verändern und deren inhibitorischen Effekt als potentiell Virostatikum zu testen. Eine Möglichkeit, Resistenzen zukünftig zu vermeiden und die natürliche Schutzfunktion des Mukus zu stärken (Lamblin and Roussel, 1993). Gerade die Ergebnisse der Forschungsgruppe um Keppler klangen sehr vielversprechend. Zumal die resistente Wirkung gegenüber dem Virus nicht ausreichend geklärt werden konnte (Keppler et al., 1998). Diese Arbeit knüpft an die Ideen und Ergebnisse dieser Forschungsgruppe an und schildert die Entwicklung neuer möglicher Inhibitoren gegen das Influenza-A-Virus.

2 Zielsetzung

Zahlreiche Beispiele der Vergangenheit demonstrieren, welche verheerende Auswirkungen Infektionen durch das Influenza-Virus haben können. Während der initialen Infektion und dem Verlassen infizierter Wirtszellen, sind endständige Sialinsäuren der Zelloberfläche essentiell für das Virus. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, künstlich sialylierte Glykokonjugate anzureichern und diese als potentielle Virostatika zu untersuchen.

Dabei waren die folgenden Punkte richtungsweisend:

- Inwiefern metabolisieren alveoläre A549-Zellen künstliche ManNAc-Analoga und wie kann die Metabolisierung gesteigert werden?
- Können Neuraminidasen künstlich veränderte Sialinsäuren von Glykokonjugaten der A549-Zellen spalten?
- Entwicklung eines Protokolls zur Herstellung und Anreicherung künstlich sialylierter lungenspezifischer Glykokonjugate.
- Beeinflussen die künstlichen Glykokonjugate die Aktivität der Neuraminidase?
- Welche Auswirkung haben die künstlichen Glykokonjugate auf die initiale Infektion des Influenza-Virus?
- Haben die künstlichen Glykokonjugate Einfluss auf die multizyklische Replikation des Influenza-Virus?

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

3.1.1 Antikörper

Primärantikörper:

Kaninchenserum α -H9N2 (polyklonal) Institut für Virologie Marburg,
Immunsierung eines Kaninchens mit dem
Virus A/quail/Shantou/2061/00 (H9N2)

Sekundärantikörper:

Ziege α -Kaninchen-IgG, HRP-gekoppelt DAKO, Golstrup, Dänemark

3.1.2 Chemikalien

Das im Rahmen der Laborarbeit verwendete Wasser wurde durch eine „Merck Millipore Elix-3-Anlage“ vorgereinigt, anschließend mit einem „Mili-Q Advantage A10“ Wasseraufbereitungssystem (Merck, Darmstadt, Deutschland) entsalzt und für analytische Verfahren rein aufgearbeitet.

Produktname	Firma	Sitz	Land
1,2-Diamino-4,5-Methyldioxybenzol (DMB)	Dojindo Laboratories	Kumamoto	Japan
2´-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-Acetyl-Neuraminsäure (MUNANA)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Albumin Fraktion V	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Acetonitril (ACN)	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Ammoniumacetat	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Ammoniumbicarbonat	Fluka Analytical - Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Calciumchlorid (CaCl_2)	Merck	Darmstadt	Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Ethanol 99,9%	Riedel deHaen, Sigma-Aldrich	München	Deutschland

Ethanol vergällt	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Eisessig	Merck	Darmstadt	Deutschland
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Glycin	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Isopropanol	Fluka Analytical - Sigma-Aldrich	Karlsruhe	Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Methanol	Merck	Darmstadt	Deutschland
Monosaccharidstandards: Neu5Ac, Neu5Gc, KDN	Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Natriumacetat	Merck	Darmstadt	Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Natriumhydrosulfit	Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Natriumtetraborat-Dekahydrat	Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Oseltamivircarboxylat	Roche	Ludwigshafen	Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Serva	Heidelberg	Deutschland
Pferdeserum	Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Pyridin	Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Salzsäure	Merck	Darmstadt	Deutschland
Stickstoff, flüssig	Linde	Pullach	Deutschland
Trifluoressigsäure	LGC Promochem	Wesel	Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Carl Roth	Darmstadt	Deutschland
Triton X-100	Serva	Heidelberg	Deutschland
Tween 80	Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland

3.1.3 Enzyme

Enzym	Firma	Sitz	Land
Tosyl phenylalanyl chloromethyl keton (TPCK)-Trypsin	Stratagene	Heidelberg	Deutschland
Trypsin/EDTA	Gibco	Karlsruhe	Deutschland

Trypsin Typ XI vom bovinen Pankreas	Sigma-Aldrich	München	Deutschland
Influenza-A- H1N1(A/California/04/2009)- Neuraminidase / NA (Active)	Sino Biological	Beijing	China
Influenza-A-H3N2(A/Babool/36/2005)- Neuraminidase / NA (N294 mutation) (Active)	Sino Biological	Beijing	China
Influenza-A-H5N1(A/Anhui/1/2005)- Neuraminidase / NA (Active)	Sino Biological	Beijing	China
Influenza-A-H7N7 (A/Netherlands/219/03)- Neuraminidase / NA (Active)	Sino Biological	Beijing	China

3.1.4 Influenza-A-Stamm

H1N1 (A/Hamburg/5/09)

Institut für Virologie Marburg, Deutschland

3.1.5 Reaktionsansätze (Kits)

Reaktions-Kit	Firma	Sitz	Land
Pierce™ 660nm Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts	U.S.A.
True Blue™ Peroxidase Substrat	KPL	Maryland	U.S.A.

3.1.6 Puffer und Lösungen

10× PBS 1 l	80 g (1,37 M) NaCl 2 g (0,027 M) KCl 14,4 (0,12 M) Na ₂ HPO ₄ 2,4 (0,12 M) KH ₂ PO ₄ ad 1 l H ₂ O
Ca-Tris Buffered Saline (TBS)-Puffer	4 mM CaCl ₂ 20 mM TRIS 0,85 % NaCl pH 7,0
ELISA-Puffer	PBS _{def} 10 % Pferdeserum 0,1 % Tween

PBS _{def}	0,2 g KCl 8 g NaCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ 0,2 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l H ₂ O
MUNANA-Stopp-Puffer	0,1 M Glycin 25 % Ethanol pH 10,7
Natrium-Acetat Puffer	40 mM Natriumacetat pH 5,5
Natrium-Borat Puffer	0,2 M Natriumtetraborat-Dekahydrat pH 8

DMB-Markierung	
<u>DMB-Puffer</u>	
18 mM Natriumhydrosulfit (31,3 mg)	
1 M Mercaptoethanol (700,7 µl)	
40 mM Trifluoressigsäure (30,8 µl)	
ad 10 ml dH ₂ O	
<u>DMB-Reagenz</u>	
1,22 mg DMB frisch in 1 ml DMB-Puffer lösen	
<u>Verdünnte DMB-Reagenz</u>	
dH ₂ O : DMB (1:1)	

3.1.7 Zelllinien

A549	permanente Zelllinie aus einem humanen Adenokarzinom der Lunge (Cell Lines Service, Eppenheim, Deutschland) (Giard et al., 1973)
Calu-3	permanente Zelllinie aus einem metastatischen Adenokarzinom der Lunge eines 25-jährigen kaukasischen Mannes (ATCC [®] -HTP-55)
MDCK(H/II)	permanente Epithelzelllinie der Niere eines weiblichen Cockerspaniels (Mardin-Darby canine kidney, ATCC [®] -CCL-34)

3.1.8 Zellkulturzusätze

Die verwendeten Zuckervorläufermoleküle O-Ac₄-ManNProp und O-Ac₄-ManNBut wurden im Labor der AG PD Dr. Galuska, Biochemisches Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen, hergestellt (Bayer et al., 2013).

Produktname	Firma	Sitz	Land
Avicel	Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA) 30 %	Gibco	Karlsruhe	Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco	Karlsruhe	Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium / F-12 (DMEM/F-12)	Gibco	Karlsruhe	Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Gibco	Karlsruhe	Deutschland
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	Karlsruhe	Deutschland
L-Glutamin	Gibco	Karlsruhe	Deutschland
Modified Eagle's Medium (MEM, 2×)	Gibco	Karlsruhe	Deutschland
Penicillin/Streptomycin (5.000 U/ml)	Gibco	Karlsruhe	Deutschland
Penicillin/Streptomycin/Glutamin (10.000 U/ml)	Gibco	Karlsruhe	Deutschland
RPMI 1640, L-Glutamine	Gibco	Karlsruhuf	Deutschland

3.1.9 Zellkulturmedien

Wachstumsmedium A549	RPMI 1640 L-Glutamin; 10 % FBS; 1 % Penicillin/Streptomycin/Glutamin
Wachstumsmedium Calu-3 / MDCK (H/II)	DMEM bzw. DMEM/F-12; 10 % FBS; 1 % Penicillin/Streptomycin; 1 % L-Glutamin
Hungermedium	RPMI 1640 L-Glutamin; 1 % FBS; 1 % Penicillin/Streptomycin/Glutamin
Infektionsmedium	DMEM; 0,1 % BSA; 1 % Penicillin/Streptomycin; 1 % L-Glutamin
Überschichtungsmedium	2× MEM; 0,6 % BSA; 2 % Penicillin/Streptomycin; 2 % L-Glutamin
Avicel-Medium	dH ₂ O; 2,5 % Avicel (weight/volume); 1:1 mit Überschichtungsmedium

3.1.10 Laborgeräte

Laborgerät	Produktname	Firma	Sitz	Land
Analysenwaage	Mettler AJ 150	Mettler-Toledo	Greifensee	Schweiz
Brutschrank	Biocenter 2001	SalvisLab Renggli	Rotkreuz	Schweiz
Bunsenbrenner	Fireboy eco	INTEGRA Bioscences	Biebertal	Deutschland
Cell disruptor	B 15	Branson, Sonifier	Dietzenbach	Deutschland
Feinwaage	Mettler M5	Mettler-Toledo	Greifensee	Schweiz
Glühofen	Heraeus K1253	Heraeus	Hanau	Deutschland
Heiz-Magnet- Rührer	Ikamag Reo Motor	IKA-Werke	Staufen	Deutschland
HPLC- Anionenaus- tauschersäule	DNAPac PA 100	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts	U.S.A.
HPLC- C-18-Säule	Superspher 100 RP-18 entkappte LiChroCART 250-2 Säule	Merck	Darmstadt	Deutschland
HPLC- Fluoreszenz- detektor	Jasco FP 2020 Plus	JASCO	Gross-Umstadt	Deutschland
HPLC- Hochdruck- pumpe	Knauer HPLC- System, Smartline Pump 1000	Knauer	Berlin	Deutschland
HPLC-Interface Box	Knauer Interface Box IF2	Knauer	Berlin	Deutschland
HPLC- Steuerung- einheit	Knauer HPLC- System, Smartline Manager 5000	Knauer	Berlin	Deutschland
Kühlzentrifuge	Universal 32 R	Hettich	Tuttlingen	Deutschland

Laborspritze	50 µl, fixierte Nadel	Unimetrics Corporation	Texas	U.S.A.
Lichtmikroskop	Leica DMIL 090-135.001	Leica	Wetzlar	Deutschland
Lyophilisator	Leybold-Heraeus GT 2 A	Oerlikon Leybold Vacuum	Köln	Deutschland
Multifunktions-Mikrotiter-platten-Lesegerät	Tecan Infinite M200	Tecan Group AG	Männedorf	Schweiz
pH-Messgerät	FE 20/EL 20	Mettler-Toledo	Greifensee	Schweiz
Pipetten	10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Pipettierhilfe elektronisch	neoPipette Controller	neoLab	Heidelberg	Deutschland
Rüttler	Reax 1	Heidolph	Schwabach	Deutschland
Sicherheitswerkbank	Gelaire TC 48	Gelaire Flow	Meckenheim	Deutschland
Speed-Vac	JouanSA RC 1010	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts	U.S.A.
Thermo-Schüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Tischzentrifuge	Galaxy 14D	VWR	Darmstadt	Deutschland
Trockenschrank	Binder ED 240	Binder	Tuttlingen	Deutschland
Ultraschallbad	Sonorex	BANDELIN	Berlin	Deutschland
Zählkammer nach Neubauer	Neubauer improved	Marienfeld	Lauda Königshofen	Deutschland

3.1.11 Programme

Programm	Firma	Sitz	Land
EuroChrom 2000	Knauer	Berlin	Deutschland
i control – Microplate Reader	Tecan	Männedorf	Schweiz

3.1.12 Verbrauchsmaterialien

Produktname	Firma	Sitz	Land
Deckel (8mm) und Membran (Silikon, Polytetrafluorethylen) für Vial	VWR	Darmstadt	Deutschland
Gaskartusche, BUTAN 10 CV 360	Campin Gaz	Hattersheim	Deutschland
Glasvial, konisch, FLK 101.244	TECHLAB	Braunschweig	Deutschland
Glasvial, konisch, 8004-NM-H/V15 μ	Glastechnik Gräfenroda	Gräfenroda	Deutschland
Kryoröhrchen, 2ml, T309 2A	Simport Scientific	Bernard-Pilon	Kanada
Mikrotiterplatte, schwarz	Nunc, Sigma- Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Pasteurpipetten, 23mm	Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 μ l)	Sarstedt	Nümbrecht	Deutschland
Polypropylenröhrchen 15 ml	Greiner Bio-One	Kremsmünster	Österreich
Polypropylenröhrchen 50 ml	Corning, Centristar	Corning, New York	U.S.A.
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Sarstedt	Nümbrecht	Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Reaktionsgefäße 2 ml	Sarstedt	Nümbrecht	Deutschland
Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Sarstedt	Nümbrecht	Deutschland
Zellkulturflasche, 75 cm ² , Cellstar	Greiner Bio-One	Kremsmünster	Österreich
Zellkulturplatten (24, 96 Vertiefungen)	Greiner Bio-One	Kremsmünster	Österreich
Zellkulturschale, 58 cm ²	Sarstedt	Nümbrecht	Deutschland
Zellschaber, 28 cm	Greiner Bio-One	Kremsmünster	Österreich

3.2 Peracetylierung von *N*-Acyl-Monosacchariden

Die Peracetylierung der Hydroxylgruppen von ManNProp und ManNBut lief wie folgt ab: Die trockenen Proben wurden in 100 µl Pyridin aufgenommen und durch Zugabe von 400 µl Essigsäureanhydrid über Nacht unter Argon bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Proben unter Stickstoffstrom getrocknet.

3.3 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeitsverfahren wurden stets unter Steriltechnik vorgenommen, um eine aseptische Arbeitsweise zu gewährleisten und unerwünschte Kontaminationen zu verhindern. Die Arbeiten im Bereich der Zellkultur fanden unter einer Sicherheitswerkbank statt. Verwendete Gegenstände, Lösungen und Verbrauchsmaterialien wurden physikalisch sterilisiert (Glühofen bei 500°C; Sterilfiltration Millipore Membranfilter (0,2 µm Porengröße); Gammastrahlung durch Hersteller; Autoklav). Der Brutschrank hatte eine Temperatur von 37 °C, Gaskonzentration von 5 % CO₂ und eine relative Luftfeuchte von 85 %.

3.3.1 Kultur und Passage adhärenter eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung erfolgte in Kulturflaschen von 75 cm². Für die Inkubation mit peracetylierten ManNAc-Analoga wurden Kulturschalen (58 cm²) verwendet. Kurz vor Erreichen der vollständigen Konfluenz erfolgte die Passage der Zellen. Das verbrauchte Kulturmedium (Kulturmedium entspricht Vollmedium bzw. Wachstumsmedium) sowie zugrunde gegangene Zellen wurden entsorgt. Im Anschluss wurden die Zellen mit 8-10 ml erwärmten (37 °C) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) gewaschen. DPBS wurde verworfen. 75 cm² Kulturoberfläche wurde mit 2-3 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung behandelt. Trypsin löst Zell-Matrix-Verbindungen, während EDTA die Zell-Zell-Verbindungen trennt. Dadurch konnte die adhärenente Monolayerkultur schonend im Brutschrank (37 °C, 2-3 min) vom Boden der Kulturschale gelöst werden. Die Reaktion wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Nach vollständigem Ablösen der Zellen wurde unter Zusatz von 8 ml Kulturmedium (37 °C) die Reaktion gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Kunststoffröhrchen überführt und für 3 min bei 1000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das gewonnene Zellpellet wurde mit 1 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Die homogene Zellsuspension wurde mit 10 ml frischem Kulturmedium 1:3, 1:5 oder 1:10 auf eine neue Kulturschale bzw. -flasche aufgetragen.

3.3.2 Langzeitlagerung – Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Eine Möglichkeit zur nahezu unbegrenzten Aufbewahrung der Zellen und gleichzeitigen Aufrechterhaltung der Vitalität bietet die Kryokonservierung. Die Flüssigphase des Stickstoffes hat eine Temperatur von -196 °C , die Gasphase -155 °C . Ab einer Temperatur von -130 °C laufen in den Zellen keine biochemischen Reaktionen mehr ab. Zudem werden Kontamination, Seneszenz, genetische Drifts und andere unerwünschte Vorgänge verhindert. Daher ist eine Lagerung der Zellen im Stickstofftank zu empfehlen. Um die Bildung von schädigenden Eiskristallen während des Einfrierprozesses zu verhindern, wurden die Zellen unter anderem in dem Frostschutzmittel DMSO gelagert. Das Wasser der Zellen wurde dadurch gebunden und verdrängt. Das Einfriermedium bestand aus zwei Lösungen:

Lösung 1: 80 % serumfreies Medium, 20 % DMSO und

Lösung 2: 60 % serumfreies Medium und 40 % fetales Kälberserum.

Die Lösungen wurden steril filtriert und auf Eis gelegt. Zum Einfrieren sollten sich die Zellen in der späten log-Phase befinden. Die Zellen wurden trypsiniert, in Suspension in ein 15 mL Röhrchen übertragen und zentrifugiert (siehe 3.3.1). Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 500 μl Lösung 1 aufgenommen und im Kryoröhrchen resuspendiert, anschließend zusätzlich mit 500 μl Lösung 2. Die Zellen wurden so bei -80 °C für 24 Stunden in Isopropanol überführt. Danach konnten die Zellen bei -196 °C im Stickstofftank gelagert werden.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese zügig, um Zellschädigungen durch das DMSO zu verhindern, im Wasserbad (37 °C) erwärmt. Die Zellsuspension wurde in 9 ml Vollmedium (37 °C) resuspendiert, anschließend zentrifugiert (3 min, $1000 \times g$) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem Vollmedium aufgenommen, resuspendiert und auf eine neue Kulturschale ausgesät.

3.3.3 Zellzählung mittels improved-Zählkammer nach Neubauer

Die Zellen wurden wie beim Passagieren beschrieben (siehe 3.3.1) mit DPBS gewaschen und durch eine Trypsin/EDTA Lösung von der Kulturoberfläche gelöst. Dadurch wurden zugrunde gegangene von vitalen Zellen separiert. Die Zellen wurden in 1 ml Vollmedium aufgenommen und 1:2 – 1:10 verdünnt. Der richtige Sitz des Deckglases auf der Zählkammer konnte durch das Erscheinen von Newtonschen Ringen kontrolliert werden. 10 μl der verdünnten Zellsuspension wurden in den Zwischenraum abgegeben. Das Zählgitter der Neubauer improved-Zählkammer besteht aus 3×3 Großquadraten, die jeweils eine Fläche von 1 mm^2 besitzen. Aus den gezählten Zellen der vier Eckquadranten wurde die Gesamtzellzahl anhand der folgenden Formel berechnet.

$$\frac{\sum \text{Zellzahl der 4 Eckquadrate}}{4} \times \text{Verdünnung} = \text{Mittelwert Zellzahl/mm}^3$$

$$\text{Mittelwert Zellzahl/mm}^3 \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

$$\text{Zellzahl/ml} \times \text{Volumen der Zellsuspension} = \text{Gesamtzellzahl}$$

Durch die Bestimmung der Gesamtzellzahl war es möglich eine definierte Zellzahl durch das jeweilige Volumen zu bestimmen. Um das Zellwachstum zu berechnen, wurde eine definierte Zellzahl ausplattiert und die Gesamtzellzahl nach 48 Stunden erneut berechnet.

3.3.4 Inkubation mit peracetylierten ManNAc-Analoga

Zum Etablieren eines ertragreichen und effizienten Protokolls wurden Inkubationszeit, Zusatz des Zellmediums und Konzentration der ManNAc-Analoga variiert. Im Folgenden ist das Protokoll geschildert, das für die Versuche mit Neuraminidasen (siehe 3.5) und zur Gewinnung von künstlichen Glykokonjugaten (siehe 3.6) verwendet wurde. Die Zellen wurden in Kulturflaschen (75 cm²) gezogen und auf Kulturschalen (58 cm²) mit den jeweiligen Analoga inkubiert.

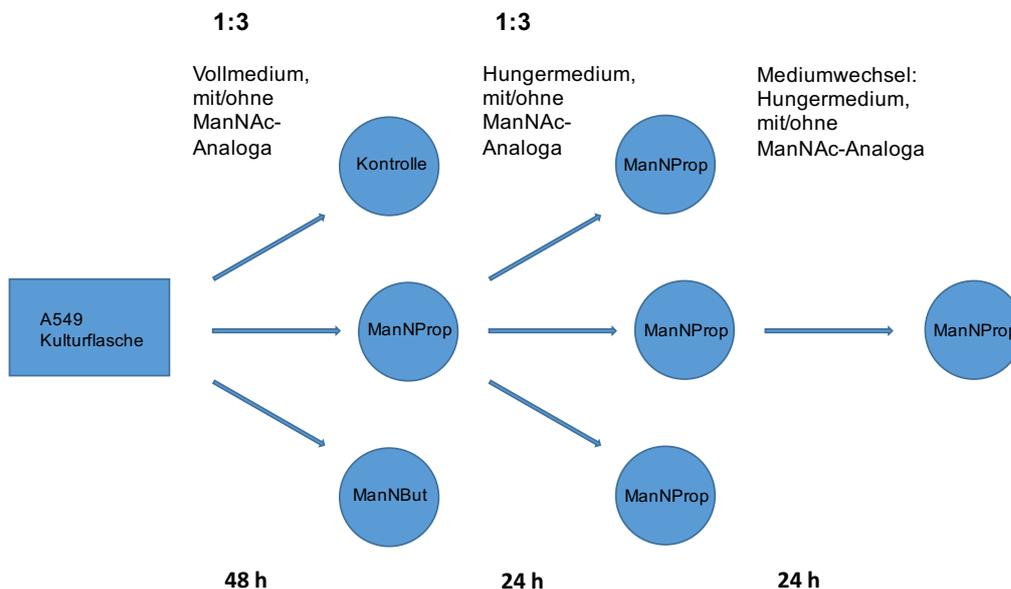


Abbildung 3.1 Inkubation mit/ohne peracetylierte/n ManNAc-Analoga

Das Rechteck bzw. die Kreise stellen die Kulturflasche und -schalen dar. Weiterhin sind Medium, ManNAc-Analoga und Inkubationszeit dargestellt. Am Ende des Protokolls sind die Ausbeute 3 Kulturschalen der Kontrolle (unbehandelt – ohne Sialinsäurevorläufer), 3 Kulturschalen O-Ac₄-ManNProp-behandelter Zellen und 3 Kulturschalen O-Ac₄-ManNBut-behandelter Zellen.

Die synthetisierten und peracetylierten ManNAc-Analoga (O-Ac₄-ManNProp, O-Ac₄-ManNBut) waren in Ethanol gelöst. 100 µl 5 mM der Analoga wurden auf eine

Kulturschale aufgetragen. Nach Verdunsten des Alkohols bei Raumtemperatur wurden A549-Zellen 1:3 mit 10 ml Vollmedium (entspricht dem Wachstumsmedium) auf eine Kulturschale ausgesät. Die Konzentration der ManNAc-Analoga im Kulturmedium lag somit bei 50 μ M. Die Zellen wurden für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach 48 Stunden wurden neue Kulturschalen mit den jeweiligen ManNAc-Analoga (100 μ l, 5 mM) vorbereitet. Die bereits inkubierten Zellen wurden erneut 1:3 passagiert und mit 10 ml Hungermedium auf die vorbereiteten Kulturschalen aufgetragen. Die Inkubationszeit im Brutschrank betrug 24 Stunden. Nach 24 Stunden wurde das Hungermedium gewechselt. Die Konzentration der ManNAc-Analoga von 50 μ M im Kulturmedium wurde beibehalten. Die Inkubationszeit betrug erneut 24 Stunden. Die Zellen wurden geerntet (siehe 3.3.5). Insgesamt nahm das Protokoll 96 Stunden in Anspruch (siehe Abbildung 3.1). Eine Kontrollzellpopulation ohne ManNAc-Analoga wurde parallel kultiviert.

3.3.5 Ernten von Zellen

Das verbrauchte Vollmedium wurde verworfen. Die Zellen wurden zweimal mit 6 ml vorgewärmten DPBS (37 °C) gewaschen. Anschließend wurden erneut 4 ml DPBS auf die Kulturschale aufgetragen, um die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber von der Oberfläche zu lösen. Die Suspension wurde in ein 15 ml Kunststoffröhrchen überführt. Danach wurde die Schale erneut mit 1 ml DPBS benetzt, um alle Rückstände aufzunehmen und diese ebenfalls in das Kunststoffröhrchen zu übertragen. Sialylierte Gykokonjugate, die für die Analyse und weitere Behandlung von Bedeutung waren, blieben so erhalten. Die Zellsuspension wurde für 3 min bei 1000 \times g zentrifugiert. Der Überstand wurde entsorgt. Das erhaltene Zellpellet diente weiteren Versuchen (siehe 3.3.6).

3.3.6 Weitere Bearbeitung und Analyse des Zellpellets

Das Zellpellet wurde in drei unterschiedlichen Ansätzen bearbeitet bzw. analysiert:

- Das gewonnene Zellpellet wurde in 1 ml destilliertem Wasser homogenisiert, wovon 20 μ l der Sialinsäurequantifizierung dienen (siehe 3.4).
- Das gewonnene Zellpellet wurde in 1 ml destilliertem Wasser homogenisiert. Die Zellsuspension diente weiterer enzymatischer Versuche mit Influenza-A-Neuraminidasen (siehe 3.5).
- Das Zellpellet diente der Aufarbeitung und Anreicherung sialylierter Glykokonjugate (siehe 3.6). Es wurde proteinanalytisch untersucht, trypsiniert, fraktioniert, die Sialinsäuren quantifiziert (siehe 3.4.1) und ausgewählte Proben für virologische Versuche zusammengeführt (siehe 3.7).

3.4 Sialinsäureanalytische Methode

3.4.1 HPLC - Quantifizierung von Sialinsäuren mittels C18-Säule

Die Sialinsäurequantifizierung diente zur Kontrolle und Bestimmung der zellulären Metabolisierung artifizierlicher Sialinsäurevorläufer (siehe 3.3.4), zur Untersuchung der Aktivität verschiedener Influenza-A-Neuraminidasen (siehe 3.5) und im Allgemeinen zum Berechnen der Stoffmenge bzw. der Konzentration des jeweiligen Derivats.

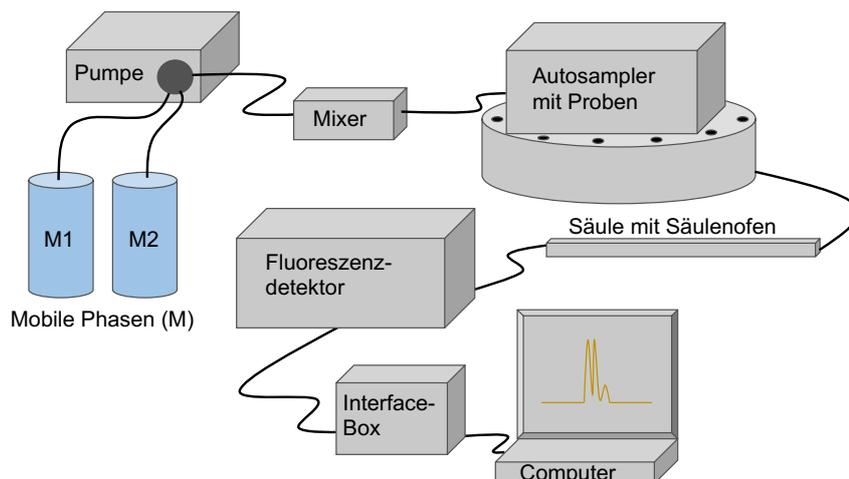


Abbildung 3.2 HPLC

Die verwendete HPLC-Anlage bestand aus den mobilen Phasen M1 und M2, einer Steuerungseinheit, einer Hochdruckpumpe, einem Mixer, einem Aufgabesystem mit Autosampler, der C18-Säule, einem Detektor, einem Analog-Digital-Wandler sowie einem angeschlossenen Computer mit geeigneter Software zur Datenauswertung.

Die Steuerungseinheit sowie die Hochdruckpumpe steuerten den eingestellten Gradienten, also den Fluss und den Druck, mit dem die mobilen Phasen (Laufmittel) durch die Einheit gepumpt wurden. Dabei wurde zu Beginn durch das programmierte Aufgabesystem die jeweilige Probe in definiertem Volumen mit dem Laufmittel auf die Säule aufgetragen. Die UV-Detektion mit dem Fluoreszenzdetektor erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 372 nm und Emissionswellenlänge von 456 nm. Der Analog-Digital-Wandler ermöglichte die visuelle Wiedergabe in Form von Chromatogrammen am Computer. Das System EuroChrom 2000 wurde für die Prozessierung und Analyse der erhobenen Daten verwendet.

3.4.1.1 Standardreihe und Leerwert

Zur Quantifizierung der Sialinsäuren diente eine Verdünnungsreihe der Monosaccharidstandards Neu5Ac, Neu5Gc und KDN in bekanntem Konzentrationsverhältnis. Der Leerwert enthielt lediglich die im Laufe der Arbeitsschritte zugeführten

Reagenzien. Standards bzw. Leerwert wurden im Wechsel der zu analysierenden Proben auf die Säule aufgetragen, um diese bei möglichen Verschiebungen im Chromatogramm richtig zu identifizieren. Proben, Standards und Leerwerte wurden gleich aufgearbeitet (siehe 3.4.1.2) und werden im Folgenden als Probe bezeichnet.

3.4.1.2 Analysenvorbereitung

Zur Detektion von α -Ketosäuren mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors wurden die Proben hydrolysiert und anschließend mit DMB markiert (Hara et al., 1986).

Die Hydrolyse muss stattfinden, um die Monosaccharidbausteine von den jeweiligen Konjugaten zu trennen. Zunächst wurde die zu analysierende Probe in der SpeedVac getrocknet. Auf die trockene Probe wurden 200 μ l Trifluoressigsäure (0,2 M) pipettiert. Die Probe wurde 3 Minuten im Ultraschallbad inkubiert und anschließend bei 80 °C im Heizofen für 2 Stunden hydrolysiert. Nachdem die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde sie in der SpeedVac erneut trocken gezogen.

Im nächsten Schritt wurde die Probe mit DMB markiert. Die trockene Probe wurde in 80 μ l frisch angesetzter, verdünnter DMB-Reagenz aufgenommen, für 3 Minuten im Ultraschallbad durchmischt und für 2 Stunden bei 55 °C im Heizofen derivatisiert.

DMB besitzt 2 freie Aminogruppen, die vor allem mit Ketogruppen reagieren. Ein konjugiertes, optisch aktives Ringsystem entsteht bei Reaktion einer Amino- mit einer Carboxylgruppe und der anderen Amino- mit einer Ketogruppe. Bei Sialinsäuren findet sich diese spezifische Struktur an den Atomen C₁ (Carboxylgruppe) und C₂ (Ketogruppe), woraus eine hochselektive Fluoreszenzmarkierung resultiert.

Die Reaktion wurde nach Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur durch Addition von 20 μ l 0,2 M NaOH gestoppt.

3.4.1.3 Lösungen und Gradient - Umkehrphase

Die DMB markierten Proben wurden durch eine Superspher 100 RP-18 entkappte LiChroCART 250-2 Säule bei einer Säulentemperatur von 40 °C getrennt. Die Separation erfolgte bei einer Flussrate von 0,35 ml/min mit den mobilen Phasen (M):

M1: ACN/MeOH/dH₂O/TFA (4:4:91,9:0,1 (v:v:v))

M2: ACN/MeOH/dH₂O/TFA (45:45:9,9:0,1 (v:v:v)).

Es wurde folgender Gradient verwendet: t_{5min} = 100 % M1, t_{20min} = 96 % M1, t_{40min} = 55 % M1, t_{60min} = 10 % M1, t_{61min} = 0% M1, t_{75min} = 0 % M1, t_{76min} = 100 % M1, t_{90min} = 100 % M1. Gewaschen wurde mit der mobilen Phase M2.

Wurde zur Quantifizierung der Sialinsäuren einer Probe ein anderer Gradient verwendet, ist dies in der jeweiligen Abbildung zusätzlich erwähnt. Der dargestellte Gradient wurde im Rahmen der Arbeit etabliert und ermöglichte, vor allem bei

zusätzlicher Anwendung von Neuraminidasen, eine gute Darstellung der synthetisierten künstlichen Sialinsäuren mit verlängerter *N*-Acylseitenkette.

3.4.1.4 Probenanalyse

Die Stoffmenge der Sialinsäuren bzw. Sialinsäurederivate in den zu analysierenden Proben konnte anhand verschiedener bekannter Stoffmengenkonzentrationen bzw. Stoffmengen der Standardreihe bestimmt werden (siehe 3.4.1.1). Dazu wurde die bekannte Stoffmenge der Standards gegen die jeweilige Fläche der Peaks im Chromatogramm aufgetragen und eine Kalibrierungsgerade erstellt (siehe Abbildung 3.3). Mit der Formel der Kalibrierungsgerade wurde anschließend anhand der Peakfläche unbekannter Proben die Stoffmengenkonzentration bzw. die Stoffmenge berechnet. Die Stoffmenge anderer Sialinsäurederivate (Neu5Prop, Neu5But) in Zell- und aufgearbeiteten Proben wurde ebenfalls anhand der Peakfläche von Neu5Ac berechnet.

Zur genauen quantitativen Analyse unbekannter Proben war es notwendig, dass die zu ermittelnde Stoffmenge im Bereich der Standards lag. Lag die Stoffmenge einer unbekanntes Probe außerhalb der Standardreihe wurde von einer semiquantitativen Analyse gesprochen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden lediglich zur Kontrolle aufwendiger Zwischenschritte (siehe 3.6.3, 3.6.4) Proben semiquantitativ ausgewertet.

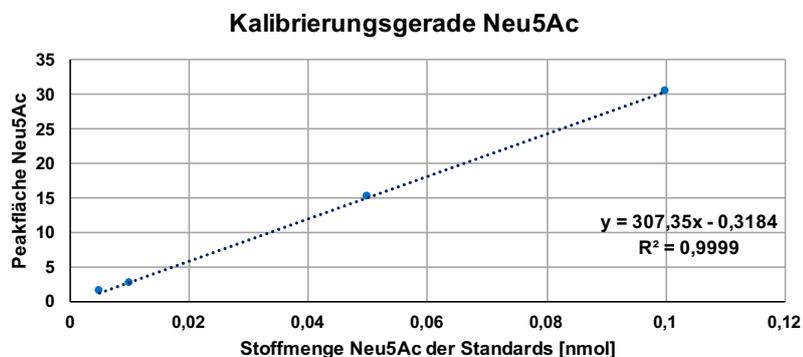


Abbildung 3.3 Kalibrierungsgerade der Standards

Hier sind eine aus den Standardproben ermittelte Kalibrierungsgerade, deren Formel und Abweichungskoeffizient R^2 dargestellt. Gegen die x-Achse wurde die bekannte Stoffmenge des jeweiligen Standards aufgetragen, gegen die y-Achse die mit der Software berechnete Peakfläche von Neu5Ac. Die Formel der Geraden diente zur Ermittlung der Stoffmenge von Sialinsäuren in unbekanntes Proben. Der Koeffizient bestimmte die Abweichung in der Verdünnung der Standards und Verarbeitung der Probe. Je näher der Koeffizient am Wert 1 lag, umso genauer war die Auswertung und umso höher die Verlässlichkeit der Ergebnisse.

3.5 Inkubation homogenisierter Zellen mit Neuraminidasen des Influenza-A-Virus

3.5.1 Inkubation mit Neuraminidasen

A549-Zellen wurden mit den peracetylierten ManNAc-Analoga O-Ac₄-ManNProp und O-Ac₄-ManNBut inkubiert (siehe 3.3.4) bzw. blieben unbehandelt. Das gewonnene Zellpellet (siehe 3.3.5) wurde in 1 ml Aqua dest. aufgenommen. 70 µl der homogenisierten Zellen wurden mit einer Ezymeinheit der jeweiligen Influenza-A-Neuraminidase inkubiert. Die Reaktion lief in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bei einem pH-Wert von 7,4 und einer Temperatur von 37 °C für 3 Stunden ab.

Der Kontrolle dienten A549-Zellen, die ebenfalls mit peracetylierten ManNAc-Analoga inkubiert wurden bzw. unbehandelt blieben. Die Kontrolle enthielt kein Enzym und wurde ebenfalls mit phosphatgepufferter Salzlösung unter den gleichen Bedingungen mitgeführt.

Aus jeder Probe wurden 2 mal 10 µl entnommen, wobei nur eine Probe reduziert wurde. Die Proben wurden in der SpeedVac getrocknet. Die Reduktion ist in Abschnitt 3.5.2 erläutert.

Inkubation mit Neuraminidasen

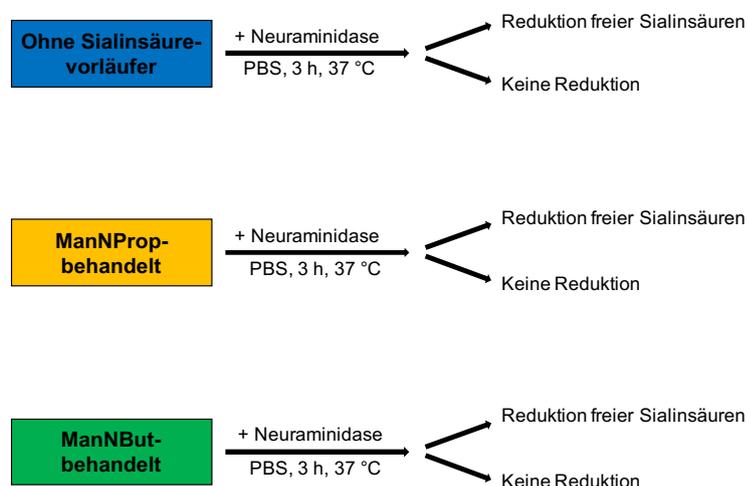


Abbildung 3.4 Übersicht zur Inkubation mit Neuraminidasen

Die Zellen, mit und ohne Inkorporation peracetylierter ManNAc-Analoga, wurden homogenisiert und sind hier farbig dargestellt. Die Proben wurden jeweils mit unterschiedlichen Neuraminidasen inkubiert (in PBS, für 3 Stunden bei 37 °C). Es wurden 2 Aliquots der enzymbehandelten Probe entnommen, wobei eine Probe reduziert wurde.

Kontrolle - ohne Enzym

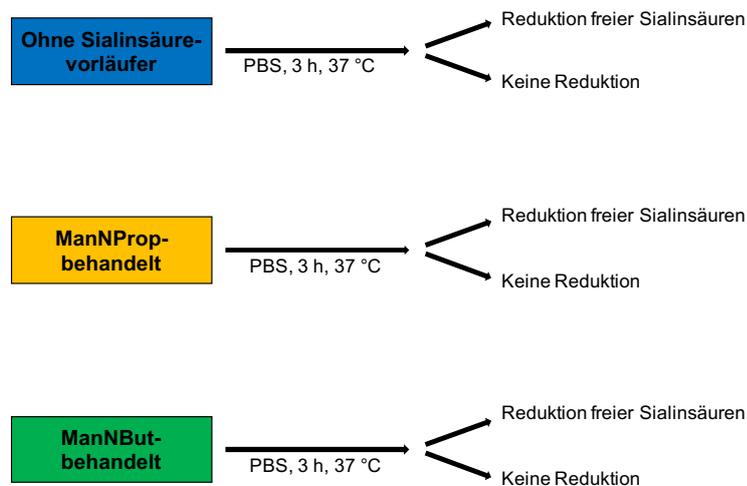


Abbildung 3.5 Übersicht der Kontrolle

Die Zellen, mit und ohne Inkorporation peracetylierter ManNAc-Analoga, wurden homogenisiert und sind hier farbig dargestellt. Alle Proben wurden für 3 Stunden bei 37 °C in PBS inkubiert. Es wurden 2 Aliquots der unbehandelten Probe entnommen, wobei eine Probe reduziert wurde.

3.5.2 Reduktion freier Sialinsäuren und Probenvorbereitung

Die Reduktion freier Sialinsäuren war notwendig, um freie von gebundenen Sialinsäuren zu unterscheiden und somit Rückschlüsse auf die vom jeweiligen Enzym abgespaltenen Sialinsäuren ziehen zu können.

Reduktion:

Zur Reduktion der α -Ketogruppe freier Sialinsäuren wurde die getrocknete Probe in 50 μ l 40 mM Natrium-Acetat-Puffer (pH 5,5) gelöst. Dazu wurden 4 μ l Aqua dest. gegeben und die Probe für 3 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Zu jeder Probe wurden 64 μ l 0,2 M Natriumborhydrid in 0,2 M Natrium-Borat-Puffer (pH 8) pipettiert. Die Reaktion lief über Nacht bei 0 °C ab.

Ohne Reduktion:

Den Proben, bei denen keine Reduktion ablaufen sollte, wurde kein Natriumborhydrid hinzugegeben. Die getrocknete Probe wurde in 50 μ l 40 mM Natrium-Acetat-Puffer (pH 5,5) aufgenommen und 4 μ l Aqua dest. dazugegeben. Die Probe wurde 3 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Im Anschluss wurden 64 μ l 0,2 M Natrium-Borat-Puffer hinzupipettiert. Die Reaktion lief über Nacht bei 0 °C ab.

Leerwerte mit den jeweiligen Reagenzien der „Reduktion“ bzw. „ohne Reduktion“ wurden bei jedem HPLC-Lauf mitgeführt. Alle Proben wurden am darauffolgenden Tag in der SpeedVac getrocknet, hydrolisiert, DMB-markiert und mittels HPLC die Sialinsäuren quantifiziert (siehe 3.4.1).

3.5.3 Bestimmung abgespaltener Sialinsäuren

Gebundene Sialinsäuren können durch den Ringschluss und die feste Verknüpfung nicht an der α -Ketogruppe reduziert werden. Abspaltene und freie Sialinsäuren hingegen nehmen während der Reduktion auch eine Kettenform an und können dadurch an der α -Ketogruppe reduziert werden. Die Reduktion der α -Ketogruppe freier bzw. abgespaltener Sialinsäuren verhindert eine DMB-Markierung. Dadurch wurden freie, nicht markierte Sialinsäuren später im Chromatogramm nicht mehr sichtbar. Wurde keine Reduktion durchgeführt, so wurden alle Sialinsäuren, inklusive der freien, DMB-markiert. In der Differenz zwischen der reduzierten und der nicht-reduzierten Probe ergab sich somit die Menge freier Sialinsäuren.

Mit den freien Sialinsäuren konnte allerdings nicht direkt Rückschluss auf die vom Enzym abgespaltenen Sialinsäuren gezogen werden. Auch die Proben, die nicht mit einem Enzym behandelt wurden, enthielten zu einem gewissen Anteil ungebundene, freie Sialinsäuren. Daher war es notwendig eine Kontrolle (nicht-enzymbehandelt) mitzuführen, die zum einen reduziert bzw. nicht reduziert wurde.

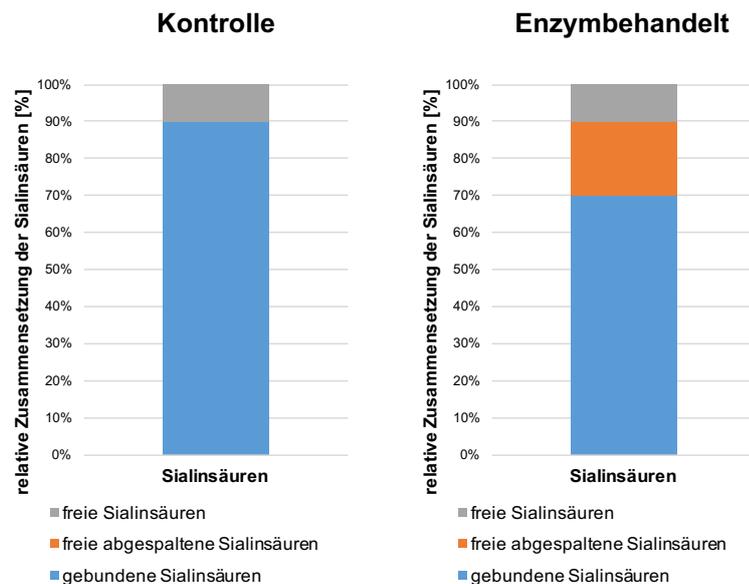


Abbildung 3.6 Beispielhafte Darstellung der relativen Zusammensetzung freier Sialinsäuren der Kontrolle im Vergleich zur enzymbehandelten Probe

Im linken Diagramm ist die Kontrolle (ohne Enzym) dargestellt, im rechten die mit Enzym behandelte Probe. Mit der Kontrolle (links) wurden durch Reduktion frei vorliegende Sialinsäuren identifiziert. Mit der enzymbehandelten Probe wurden freie + freie abgespaltene Sialinsäuren bestimmt. Aus der Differenz konnten schließlich die freien abgespaltene Sialinsäuren dargestellt werden.

Erst im Vergleich zwischen freien Sialinsäuren der Kontrolle und den enzymbehandelten Proben wurde es möglich zu differenzieren, welcher Anteil an freien Sialinsäuren durch das jeweilige Enzym abgespalten wurde. Die vom Enzym abgespaltenen Sialinsäuren ergaben sich also folgendermaßen: „freie Sialinsäuren – enzymbehandelter Probe“ abzüglich „freie Sialinsäuren - Kontrolle“. Zur Veranschaulichung siehe Abbildung 3.6.

3.6 Anreicherung sialylierter Glykokonjugate

3.6.1 Probenaufbereitung

Zunächst wurden A549-Zellen mit peracetylierten ManNAc-Analoga inkubiert (siehe 3.3.4). Das gewonnene Zellpellet (siehe 3.3.5) aus 5 Kulturschalen wurde in 1 ml 25 mM Ammoniumbicarbonat gelöst, resuspendiert und für 30 Minuten bei 8 °C und 14000 × g zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde erneut mit 1 ml 25 mM Ammoniumbicarbonat resuspendiert. Mit einem Cell disruptor (30 Impulse pro Minute, Output control: 3) wurden für 30 Sekunden zusammenhängende Zellbestandteile gelöst, um sialylierte Konjugate freizusetzen. Die Probe wurde erneut für 30 Minuten bei 14000 × g zentrifugiert und der flüssige Überstand verworfen. Das abzentrifugierte Pellet wurde wiederum in 1 ml 25 mM Ammoniumbicarbonat gelöst, mit dem Ultraschallstab behandelt und resuspendiert. Das Homogenisat wurde proteinanalytisch untersucht (siehe 3.6.2).

3.6.2 Proteinanalytische Methode

Die Proteinanalytik war ein notwendiger Arbeitsschritt, um Zellproteine enzymatisch zu verdauen (siehe 3.6.3) und sialylierte Glykokonjugate freizusetzen, wodurch später die Fraktionierung mittels HPLC und die Anreicherung der gewünschten Konjugate möglich wurde.

Aus der aufgearbeiteten Probe (siehe 3.6.1) wurde ein Aliquot entnommen und eine Verdünnungsreihe für die Proteinanalytik angesetzt: 1:5, 1:10, 1:100.

Das PierceTM 660 nm Protein Assay Kit diente der Bestimmung der Proteinkonzentration. Als Proteinstandard wurde Albumin Fraktion V in 25 mM Ammoniumbicarbonat gelöst. Die Konzentration der Stammlösung betrug 10 mg/ml. Als Standardkurve diente die folgende Verdünnungsreihe: 50, 100, 500 und 1000 µg/ml. Als Leerwert wurden 25 mM Ammoniumbicarbonat verwendet. Es wurden jeweils 10 µl der Standardreihe, der verdünnten Probe und des Leerwerts auf eine 96-well-Platte ausplattiert. Zu jeder Vertiefung wurden zusätzlich 150 µl Protein Assay Reagenz hinzupipettiert. Anschließend wurde die Platte für 30 Sekunden gerüttelt und nach 5 Minuten

Inkubationszeit mit einem Multifunktions-Mikrotiter-Plattenlesegerät bei 660 nm mit 9 Messpunkten ausgelesen.

Die erhobenen Daten wurden mit dem Programm „i control – Microplate reader“ aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Kalibrationsgerade bestimmt.

3.6.3 Enzymverdau und Aufreinigung

Der Trypsinverdau richtete sich nach der Proteinkonzentration, die aus der Proteinbestimmung (siehe 3.6.2) hervorging.

1 mg Trypsin wurden in 1 ml 0,001 M HCl gelöst. Die Probe wurde über Nacht mit 0,001 mg/ml Trypsin auf 0,2 mg/ml Protein bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurde die Probe anschließend mit 20 µl 100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) in 100%-haltigem Ethanol im Ultraschallbad bei 3 Minuten und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Probe wurde bei 14000 × g für 30 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen. Der flüssige Überstand wurde in der Speedvac getrocknet. Der getrocknete Rückstand wurde in 400 µl 25 mM Ammoniumbicarbonat aufgenommen, resuspendiert, im Ultraschallbad (3 min) und mit dem Celldisruptor (30 Impulse, Output control: 3) behandelt und anschließend erneut bei 14000 × g für 15 Minuten zentrifugiert. Der flüssige Überstand (380 µl) wurde fraktioniert (siehe 3.6.4). Zudem wurden zur Kontrolle die Sialinsäuren aus 2 µl des Überstands quantifiziert (semiquantitativ). Das Pellet wurde verworfen.

3.6.4 Fraktionierung und Anreicherung mittels HPLC - Normalphase

Trypsinierte Proben (siehe 3.6.3) wurden durch Ionenchromatographie mit der Anionenaustauschersäule DNAPac PA100 aufgetrennt und fraktioniert. Die Proben wurden nicht DMB-markiert und daher blind in einem zeitlich festgelegten Abstand aufgefangen. Die Anionenaustauschersäule diente also lediglich der Auftrennung und Anreicherung. Die Säule wurde ebenfalls über ein Knauer HPLC-System betrieben. Der Aufbau entspricht Abbildung 3.2.

Die mobilen Phasen M1 (dH₂O) und M2 (4 M Ammoniumacetat) wurden in einer Flussrate von 2,5 ml/min als Laufmittel verwendet.

Dabei wurde mit dem folgenden Gradienten gearbeitet:

$t_{0\text{min}} = 100 \% \text{ M1}$, $t_{5\text{min}} = 100 \% \text{ M1}$, $t_{20\text{min}} = 87 \% \text{ M1}$, $t_{35\text{min}} = 79 \% \text{ M1}$, $t_{60\text{min}} = 0 \% \text{ M1}$,
 $t_{70\text{min}} = 0 \% \text{ M1}$, $t_{71\text{min}} = 100 \% \text{ M1}$, $t_{90\text{min}} = 100 \% \text{ M1}$.

Gewaschen wurde mit der mobilen Phase M2.

Bis zu 200 µl der Probe wurden manuell mittels Hamilton-Spritze auf die Säule aufgetragen. Die Fraktionen wurden im Zehnminutentakt aufgefangen, was bei einem Fluss von 2,5 ml/min, einer Menge von 25 ml/Fraktion entspricht. 2 % der gewonnenen Fraktion, also 500 µl, wurden im Anschluss in der SpeedVac getrocknet, hydrolysiert und DMB-markiert, um die Sialinsäuren mittels C-18-Säule (siehe 3.4.1) zu quantifizieren (semiquantitativ). Dadurch konnten die aufgefangenen Fraktionen und die dazugehörige Zeit identifiziert werden, in der ein besonders hoher Sialinsäuregehalt vorzufinden war.

3.6.5 Zusammenführen aufgereinigter Proben

Die Fraktionen mit dem höchsten Anteil künstlicher Sialinsäuren wurden zusammengeführt. Dazu wurden die Proben zunächst mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und im Lyophilisator gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde jeweils in 1 ml Aqua dest. aufgenommen. Anschließend wurde die Probe gerüttelt, 3 min im Ultraschallbad behandelt und 3 min bei $1000 \times g$ zentrifugiert. Diese Arbeitsschritte wurden dreimal wiederholt, um den Verlust beim Überführen der Proben möglichst gering zu halten. Die zusammengeführten Proben wurden sialinsäureanalytisch untersucht (siehe 3.4.1) und die Stoffmenge exakt bestimmt. Die Proben wurden erneut im Lyophilisator gefriergetrocknet, wodurch für spätere virologische Versuche (siehe 3.7) die Aufnahme in das gewünschte Lösungsmittel möglich war.

3.7 Virologische Methoden

Die virologischen Versuche wurden in Kooperation mit Frau Prof. Dr. Eva Friebertshäuser am Institut für Virologie der Philipps-Universität in Marburg durchgeführt. Die hierfür verwendeten Materialien wurden von dem Institut gestellt. Die Methoden sind im Folgenden aufgeführt.

Der Virustiter des verwendeten Influenza-A-Virus H1N1 (A/Hamburg/5/09) betrug $2,4 \times 10^6$ pfu / ml (plaqueformende Einheit pro Milliliter). Die weitere Verdünnung ist im jeweiligen Kapitel angegeben. Die Anreicherung der sialylierten Glykokonjugate ist in Kapitel 3.6 erläutert. Die lyophilisierten Glykokonjugate wurden für die virologischen Versuche in DPBS aufgenommen.

3.7.1 Messung der Neuraminidaseaktivität unter Einfluss sialylierter Glykokonjugate (MUNANA-Fluoreszenz-Assay)

Das Virus wurde 1:5 in Ca-TBS-Puffer verdünnt und mit Oseltamivircarboxylat (Positivkontrolle) bzw. den sialylierten Glykokonjugaten für eine Stunde bei 37 °C auf

einer schwarzen Mikrotiterplatte vorinkubiert. Das Volumen betrug 40 μl , wobei die Stoffmengenkonzentration der Inhibitoren bei 0,1 μM lag. Anschließend wurden die vorinkubierte Virusverdünnung, sowie eine Negativkontrolle ohne Inhibitor, mit 10 μl 0,5 mM MUNANA-Substrat in Ca-TBS-Puffer versetzt. Die Reaktion lief eine Stunde bei 37 °C ab und wurde mit 150 μl MUNANA-Stopp-Puffer abgestoppt. Der Lösungsmittelabgleich bestand aus Ca-TBS-Puffer.

Bei Hydrolyse des Fluorogens MUNANA, katalysiert durch die Neuraminidase, entstehen zwei Spaltprodukte: 4-Methylumbelliferon und $\alpha\text{-D-N-Acetylneuraminsäure}$. Durch die Hydrolyse konnte 4-Methylumbelliferon quantitativ fluorometrisch detektiert und Rückschluss auf die Aktivität der Neuraminidase unter Einfluss der Glykokonjugate gezogen werden. Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und Emissionswellenlänge von 460 nm gemessen.

3.7.2 Infektion eukaryotischer Zellen

Die Zellen wurden nach Abnahme des Wachstumsmediums einmal mit PBS_{def} gewaschen und mit der jeweiligen Infektionsdosis bzw. dem Infektionsvolumen in Infektionsmedium inokuliert. Die Inkubationszeit betrug 1 bzw. 6 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂. Das Inokulum wurde abgenommen und die Zellen mit PBS_{def} (3-4 \times) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen wieder mit frischem Infektionsmedium versetzt.

3.7.3 Multizyklische Replikation unter Einfluss sialylierter Glykokonjugate

Calu-3-Zellen wurden im 24-well-Format (2,5 $\times 10^5$ Zellen) ausplattiert und mit dem Influenza-A-Virus mit einer MOI (multiplicity of infection) von 0,001, also jede tausendste Zelle, für 1 Stunde infiziert (siehe 3.7.2). Die Zellen wurden mit 500 μl frischem Infektionsmedium für 72 Stunden inkubiert, wobei das Medium mit den jeweiligen Glykokonjugaten versetzt war. Der Positivkontrolle diente Oseltamivircarboxylat, der Negativkontrolle eine Infektion ohne Inhibitoren im Infektionsmedium. Die Konzentration aller Inhibitoren lag bei 0,04 μM . Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden 50 μl Überstand pro Vertiefung abgenommen und zur Bestimmung des Virustiters mittels Plaque-Test verwendet (siehe 3.7.6).

3.7.4 Einzelzyklus-Replikation unter Einfluss sialylierter Glykokonjugate

Das Virus wurde 1:5 in Infektionsmedium aufgenommen und die Virussuspension für 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ mit den verschiedenen Glykokonjugaten bzw. Oseltamivircarboxylat inkubiert, wobei die Stoffmengenkonzentration 0,04 μM betrug.

Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe in Infektionsmedium (1:1.000, 1:10.000, 1:100.000) angesetzt und MDCK(H)-Zellen in einer 96-Vertiefungsplatte in Triplikaten mit je 100 µl Virussuspension (mit und ohne Inhibitor) infiziert. Die Inkubationszeit betrug 6 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Zellen wurden mit 100 µl 4 % PFA / PBS_{def} pro Vertiefung für 30 min bei 4 °C fixiert. Im Anschluss erfolgte eine immunhistochemische Färbung virusinfizierter Zellen (siehe 3.7.5). Die infizierten Zellen wurden ausgezählt. Aus der Zahl der infizierten Zellen, Verdünnung und Volumen pro Vertiefung wurden die infektiösen Partikel pro Milliliter berechnet (Infizierte Zellen × reziproker Wert der Verdünnung × Volumen [ml]⁻¹ = Infektiöse Partikel je Milliliter = plaqueformende Einheit je Milliliter [pfu/ml]). Die kurze Infektionszeit dieser Methode erlaubte die Anfärbung initial infizierter Zellen. Eine weitere Ausbreitung des Virus wurde vermieden.

3.7.5 Immunhistochemische Färbung infizierter Zellen

Die Möglichkeit virale Proteine indirekt anfärben zu können, erlaubt die Visualisierung infizierter Zellen. Dazu wurde ein Primärantikörper, der virale Proteine bindet, mit einem Horseradish Peroxidase- (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper identifiziert. Die Zugabe eines Peroxidasesubstrats und die Peroxidaseaktivität des Sekundärantikörpers ermöglichten die Visualisierung infizierter Zellen.

Nach Fixierung mit PFA wurden die Zellen mit PBS_{def} gewaschen und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Die Permeabilisierung der fixierten Zellen erfolgte mit 100 µl 0,3 % Triton X-100 / PBS_{def} für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend konnten 50 µl des Primärantikörpers (1:10.000 in ELISA-Puffer) aufgetragen werden. Die Zellen wurden für 75 min schwenkend bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal mit 200 µl 0,05 % Tween / PBS_{def} für 5 Minuten gewaschen. 50 µl des Sekundärantikörpers (1:3.500 in ELISA-Puffer) wurde für eine Stunde schwenkend hinzugegeben. Die Zellen wurden wiederum dreimal mit 200 µl 0,05 % Tween / PBS_{def} für 5 Minuten gewaschen und mit 50 µl des Peroxidase-Substrats TrueBlue™ für 5 Minuten inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Vertiefungen abschließend zweimal schnell mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach der immunhistochemischen Färbung waren infizierte Zellen blau gefärbt. Die Platte wurde getrocknet.

3.7.6 Bestimmung des Virustiters (Avicel-Plaque-Test)

Der Avicel-Plaque Test (Matrosovich et al., 2006) eignet sich für die Bestimmung infektiöser Viruspartikel (pfu : plaque forming units, plaqueformende Einheit) einer Virussuspension. MDCK(II)-Zellen werden mit verschiedenen Verdünnungen der Virussuspension infiziert. Die Überschichtung der Zellen mit einem halbfesten Medium

begrenzt die weitere Infektion neu entstandener Viruspartikel. Nur benachbarte Zellen können neu infiziert werden. Es bilden sich abgrenzbare Plaques im konfluenten Zellrasen, die aus infizierten und lysierten Zellen bestehen. Ein Plaque in der jeweiligen Verdünnung einer Virussuspension stellt ein infektiöses Viruspartikel dar.

Zunächst wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe der zu bestimmenden Virussuspension in Infektionsmedium hergestellt. Nahezu konfluente MDCK(II)-Zellen (ca. 90 %) wurden mit 500 µl der jeweiligen Verdünnung im 24-well-Format infiziert. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂. Das Inokulum wurde abgenommen. Die Zellen wurden mit 500 µl Avicel-Medium unter Zugabe von 1 µg/ml TPCK-Trypsin für 36 – 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. TPCK-Trypsin ermöglicht eine multizyklische Replikation der neu austretenden Viren. Schließlich wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS_{def} (2-3×) gewaschen und mit 300 µl 4 % PFA / PBS_{def} pro Vertiefung fixiert (30 min bei 4 °C). Virusinfizierte Zellen konnten immunhistochemisch gefärbt (siehe 3.7.5) und der Virustiter bestimmt werden: Plaques pro Vertiefung [pfu] × reziproker Wert der Verdünnung × Inokulationsvolumen [ml]⁻¹ = Virustiter [pfu/ml].

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung eines Protokolls zur effektiven Metabolisierung artifizieller *N*-Acetyl-Mannosaminanaloge anhand der A549-Lungenzelllinie

Um ein effektives Protokoll zu entwickeln, war es notwendig, mit verschiedenen Parametern zu arbeiten und diese zu variieren. Hierfür musste die eingesetzte Menge der *N*-Acetyl-Mannosaminanaloge im Verhältnis zur Menge der entstandenen Strukturanaloga mit verlängerter *N*-Acylseitenkette stimmen. In den nächsten Kapiteln sind die Arbeitsschritte erläutert, die zur Etablierung des Protokolls richtungsweisend waren.

Das Protokoll wurde ferner zur Gewinnung von Probenmaterial für Versuche mit Neuraminidasen (siehe 3.5), zur Anreicherung sialylierter Glykokonjugate (siehe 3.6) und schließlich für virologische Experimente (siehe 3.7) verwendet.

4.1.1 Nachweis der Sialylierung von A549-Zellen

Zunächst wurde das Vorhandensein der *N*-Acetylneuraminsäure in der Kultur von A549-Zellen mittels RP-HPLC untersucht (siehe 3.4.1).

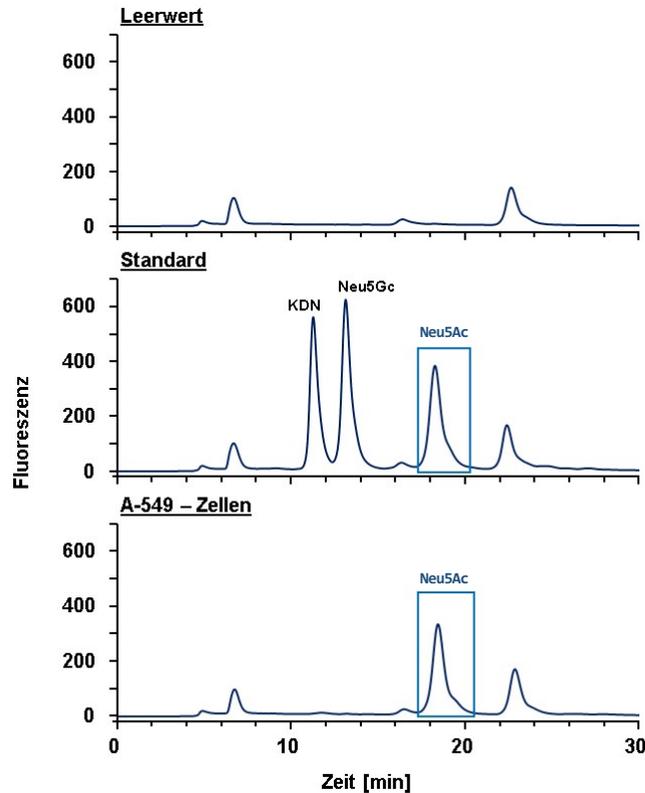


Abbildung 4.1 RP-HPLC unbehandelter homogener A549-Zellen

Im ersten Chromatogramm ist der Leerwert dargestellt. Die methodenbedingten Signale, die durch Reagenzien verursacht wurden, sind auch in den Chromatogrammen des Standards und der Zellen vorzufinden. Im Chromatogramm des Standards sind 3 Peaks eindeutig dargestellt: KDN, Neu5Gc und Neu5Ac. Neu5Ac ist blau umrahmt. Im Chromatogramm der A549-Zellen war lediglich der Peak für Neu5Ac zu identifizieren. Gradient: $t_{5\text{min}} = 100\% \text{ M1}$, $t_{20\text{min}} = 96\% \text{ M1}$, $t_{30\text{min}} = 65\% \text{ M1}$, $t_{40\text{min}} = 20\% \text{ M1}$, $t_{41\text{min}} = 0\% \text{ M1}$, $t_{50\text{min}} = 0\% \text{ M1}$, $t_{51\text{min}} = 100\% \text{ M1}$, $t_{64\text{min}} = 100\% \text{ M1}$. M1: ACN/MeOH/dH₂O/TFA (4:4:91,9:0,1 (v:v:v)); M2: ACN/MeOH/dH₂O/TFA (45:45:9,9:0,1 (v:v:v)). Flussrate: 0,25 ml/min.

Im Vergleich der drei Chromatogramme untereinander konnte die *N*-Acetylneuraminsäure als fester Bestandteil von A-549-Zellen nachgewiesen werden. Ein Hinweis auf andere Sialinsäuren lag nicht vor.

4.1.2 Nachweis metabolisierter *N*-Acetyl-Mannosaminanaloge

Nachdem Neu5Ac als physiologisch vorkommende Sialinsäure in A549-Zellen dargestellt werden konnte, wurde die Metabolisierung peracetylierter *N*-Acetyl-Mannosaminanaloge chromatographisch bestätigt.

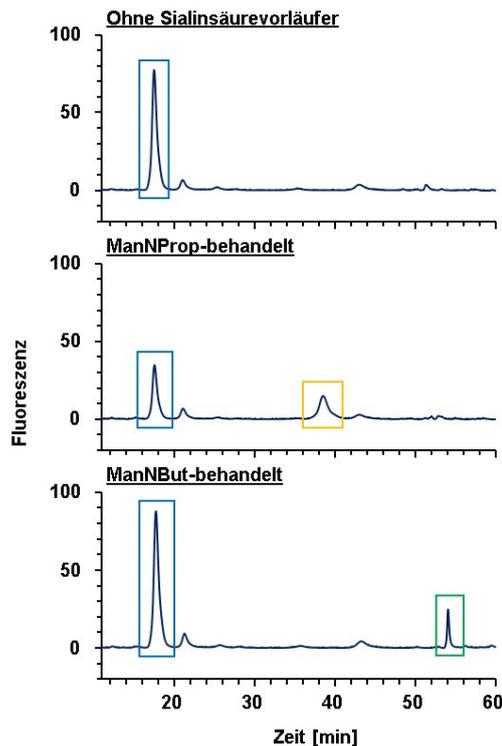


Abbildung 4.2 RP-HPLC homogenisierter A549-Zellen nach Behandlung mit peracetylierten *N*-Acetyl-Mannosaminanaloga

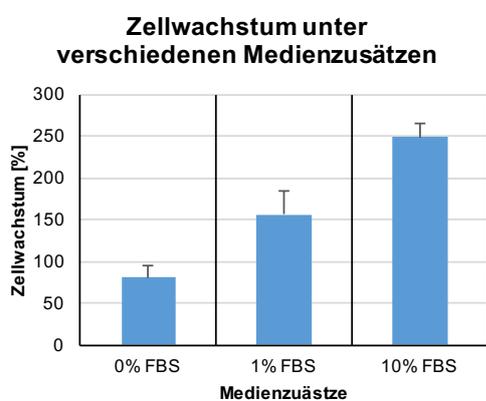
In der Abbildung sind die Chromatogramme unbehandelter Zellen und nach Behandlung mit *O*-Ac₄-ManNProp bzw. *O*-Ac₄-ManNBut dargestellt (siehe 3.3.4). Neu5Ac, blau markiert, war in allen drei Proben nachweisbar. Nach Behandlung mit den künstlichen Sialinsäurevorläufern erschien jeweils ein zusätzliches Signal. Das Signal nach Behandlung mit *O*-Ac₄-ManNProp ist orange hervorgehoben, das nach Behandlung mit *O*-Ac₄-ManNBut grün.

Die natürlich vorkommende Sialinsäure Neu5Ac wurde anhand des Standards in Kapitel 4.1.1 in unbehandelten A549-Zellen nachgewiesen. Nach Behandlung der A549-Zellen mit dem jeweiligen Mannosaminderivat wurde jeweils ein neues Signal detektiert. Die höheren Retentionszeiten der beiden Signale nach Inkubation mit *O*-Ac₄-ManNProp bzw. *O*-Ac₄-ManNBut deuten auf eine stärkere Interaktion mit der hydrophoben C18-Säule hin. Daher waren der Metabolismus und die Inkorporation der artifiziiellen Sialinsäurevorläufer mit verlängerter, hydrophober *N*-Acylseitenkette zu vermuten. Bayer konnte am Biochemischen Institut in Gießen nach Behandlung von A549-Zellen mit Mannosaminderivaten (*O*-Ac₄-ManNProp, *O*-Ac₄-ManNBut) anhand von ESI-MS- und ESI-MS/MS-Analysen die detektierten Strukturen, Neu5Prop und Neu5But, massenspektrometrisch verifizieren (Bayer et al., 2013). Das dargestellte Signal bestätigte somit das Vorhandensein der artifiziiellen Sialinsäuren Neu5Prop nach Inkubation mit *O*-Ac₄-ManNProp, sowie Neu5But nach Behandlung mit *O*-Ac₄-ManNBut.

4.1.3 Zellwachstum in Abhängigkeit des Kulturmediums

Fetales Kälberserum (FBS) ist für die Kultur von A549-Zellen ein essentieller Zusatz des Kulturmediums. Proteine und Wachstumsfaktoren ermöglichen die Zellteilung und die Vermehrung der Zellen. Dadurch kann auch die Verstoffwechslung künstlicher Sialinsäurevorläufer und somit der Ertrag artifizierlicher Sialinsäuren bei Veränderung der Zusammensetzung des Kulturmediums variieren. Um einen Überblick über das Zellwachstum zu gewinnen, wurden A549-Zellen im gleichen Medium aber mit unterschiedlichen Anteilen an FBS gezogen.

Abbildung 4.3 Wachstum von A549-Zellen unter verschiedenen Medienzusätzen



Es wurden 4×10^6 Zellen ausplattiert. Die Zellen wurden für 48 Stunden im jeweiligen Medium angesetzt und dann mittels Zählkammer nach Neubauer berechnet. Im Diagramm sind die Zusätze 0 %, 1 %, 10 % FBS gegen das Zellwachstum aufgetragen. Es handelt sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung, die aus drei unabhängigen Experimenten errechnet wurden.

Ohne fetales Kälberserum konnte keine Zellteilung stattfinden. Die Zellpopulation hat sich sogar verringert. Etwa ein Viertel der Zellen sind zugrunde gegangen. Bei einem Zusatz von 1 % FBS lag das Zellwachstum bei über 150 %. Die Zellzahl entsprach in etwa dem Doppelten ohne FBS. Zudem wurde das Wachstum unter normalen Bedingungen, also mit 10 % FBS berechnet. Das Zellwachstum lag mit fast 250 % etwa 100 % über der Zellpopulation, die mit 1 % FBS inkubiert wurde.

Je größer das Zellwachstum, desto mehr Sialinsäuren pro Kulturschale waren zu erwarten. Allerdings musste gleichzeitig auch der Metabolismus der künstlichen Sialinsäurevorläufer berücksichtigt werden. Um einen Zusammenhang zwischen Zellwachstum und Metabolisierung artifizierlicher *N*-Acetyl-Mannosaminanaloge gewinnen zu können, wurden A549-Zellen unter verschiedenen Nährstoffzusätzen im Medium (FBS) mit unterschiedlicher Konzentration des Sialinsäurevorläufers *O*-Ac₄-ManNProp inkubiert (siehe 4.1.4).

4.1.4 Metabolismus des artifiziellen Sialinsäurevorläufers O-Ac₄-ManNProp in Abhängigkeit von Konzentration und Kulturmedium

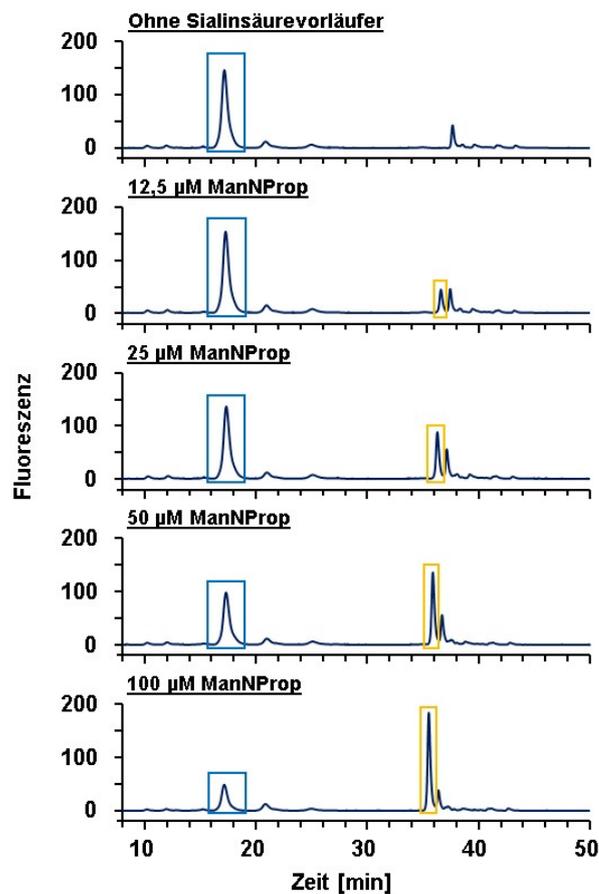


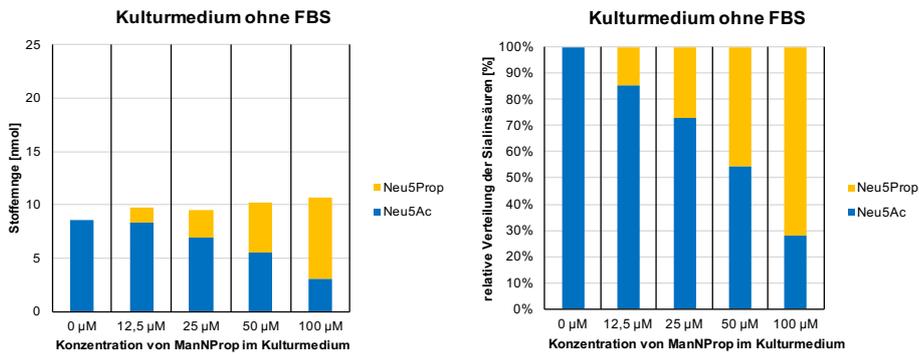
Abbildung 4.4 RP-HPLC homogenisierter A549-Zellen nach Inkubation mit peracetyliertem ManNProp

In der Abbildung ist chromatographisch die Aufnahme und Umsetzung des artifiziellen Sialinsäurevorläufers O-Ac₄-ManNProp dargestellt. Es wurden 2×10^6 A549-Zellen für 48 Stunden mit 10% FBS als Nährstoffzusatz angesetzt, wobei die Konzentrationen des Sialinsäurevorläufers O-Ac₄-ManNProp im Medium variierte. Nach 24 Stunden wurde das Medium mit Sialinsäurevorläufern gewechselt. Zusätzlich wurde eine Kontrolle ohne Sialinsäurevorläufer mitgeführt. Die Sialinsäuren Neu5Ac (blau) und Neu5Prop (orange) sind mit dem entsprechenden Farbcode markiert. Schon bei einer Konzentration von 12,5 μM wurde das Signal für Neu5Prop sichtbar und stieg bei Erhöhung der Konzentration auf 100 μM stetig an, während das Signal der physiologischen Sialinsäure Neu5Ac kleiner wurde.

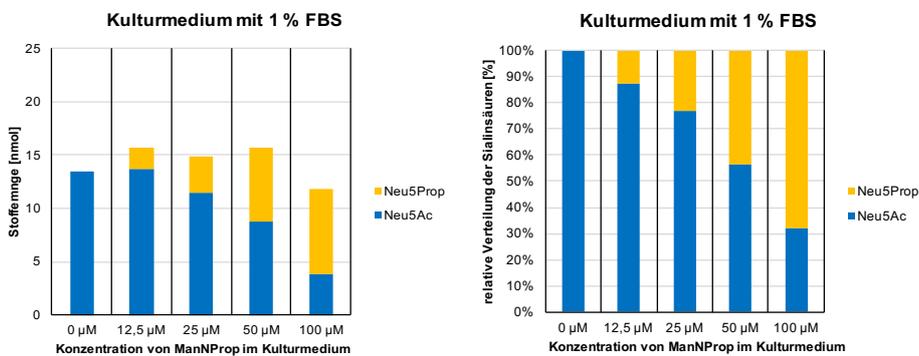
Gradient: $t_{5\text{min}} = 100\% \text{ M1}$, $t_{20\text{min}} = 96\% \text{ M1}$, $t_{30\text{min}} = 55\% \text{ M1}$, $t_{40\text{min}} = 10\% \text{ M1}$, $t_{41\text{min}} = 0\% \text{ M1}$, $t_{50\text{min}} = 0\% \text{ M1}$, $t_{51\text{min}} = 100\% \text{ M1}$, $t_{64\text{min}} = 100\% \text{ M1}$. M1: ACN/MeOH/dH₂O/TFA (4:4:91,9:0,1 (v:v:v)) ; M2: ACN/MeOH/dH₂O/TFA (45:45:9,9:0,1 (v:v:v)). Flussrate: 0,25 ml/min.

In der Abbildung 4.4 wird in den verschiedenen Chromatogrammen deutlich, dass mit dem Konzentrationsanstieg des artifiziellen Sialinsäurevorläufers O-Ac₄-ManNProp im Medium die Synthese von Neu5Prop stieg. Währenddessen sank das Vorhandensein von Neu5Ac zunehmend. In den nächsten Abbildungen wird hierauf genauer eingegangen.

Ohne FBS



1% FBS



10% FBS

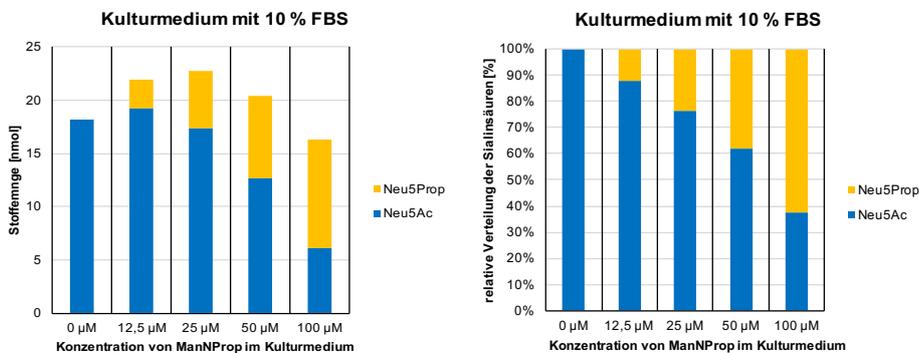


Abbildung 4.5 Inkubation mit $O\text{-Ac}_4\text{-ManNProp}$ bei unterschiedlichen Nährstoffzusätzen

Die Diagramme zeigen den Metabolismus von $O\text{-Ac}_4\text{-ManNProp}$, also die Synthese von Neu5Prop, in Abhängigkeit von der Substratkonzentration und dem FBS-Anteil am Kulturmedium. In der linken Hälfte der Abbildung ist jeweils die Stoffmenge [nmol] der beiden Sialinsäuren Neu5Ac und Neu5Prop, in der rechten der relative Anteil [%] von Neu5Ac und Neu5Prop pro Kulturschale dargestellt. In den Diagrammen entspricht eine Säule jeweils einer Kulturschale.

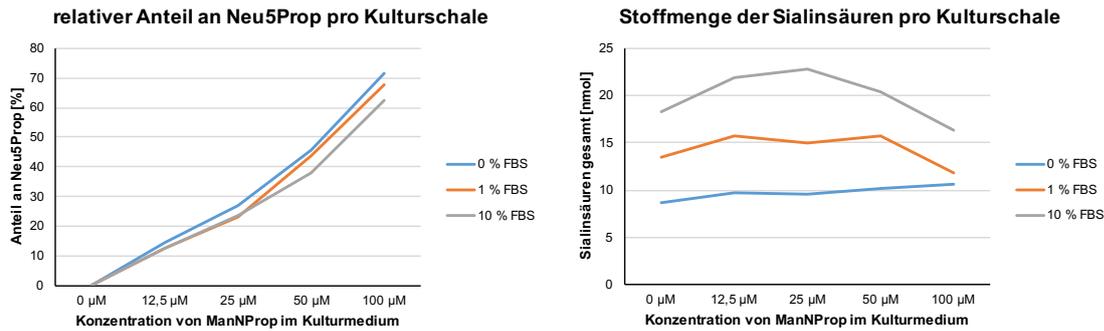


Abbildung 4.6 Übersicht des Metabolismus von O-Ac₄-ManNProp in A549-Zellen
Links: Hier ist der relative Anteil [%] von Neu5Prop in Abhängigkeit der Konzentration von O-Ac₄-ManNProp im Kulturmedium aufgeführt. Der Unterschied zwischen den verschiedenen Medien mit 0%, 1% bzw. 10% FBS wird sichtbar.
Rechts: Die Gesamtmenge der Sialinsäuren [nmol], die Summe aus Neu5Ac und Neu5Prop, steht im Bezug zu der Konzentration des Sialinsäurevorläufers. Die Stoffmenge der Sialinsäuren stieg mit dem Anteil an FBS im Medium.

Der Metabolismus und die Inkorporation des Sialinsäurevorläufers O-Ac₄-ManNProp war in den verschiedenen Medien konzentrationsabhängig. Mit steigender Konzentration nahm die Synthese von Neu5Prop in allen Medien zu, während die Synthese von Neu5Ac abnahm. Die Stoffmenge der Sialinsäuren wurde mit höherem Anteil an FBS im Medium größer, allerdings nahm dabei im Vergleich auch der prozentuale Anteil an Neu5Prop ab.

In den Abbildungen 4.5 und 4.6 ist die Zunahme des prozentualen Anteils von Neu5Prop deutlich zu erkennen. Im Medium ohne FBS wurde der höchste Anteil an Neu5Prop bei einer Konzentration von 100 μM gemessen: 72 % (1% FBS: 68 %, 10% FBS: 62 %). Bei einer Konzentration von 50 μM wurde der größte Unterschied im prozentualen Anteil von Neu5Prop zwischen den Medien mit 1 % FBS (44 %) und 10% FBS (38 %) gemessen. Die Gesamtmenge der Sialinsäuren nahm in allen drei Medien bei einer Konzentration zwischen 0 und 12,5 μM zu. Der Metabolismus war hier im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Bei einem Anteil von 10 % FBS stieg die Gesamtmenge sogar weiterhin an (bis zur Konzentration von 25 μM). Bei einem Anteil von 1 % und 10 % FBS am Kulturmedium war zwischen 50 und 100 μM ein Abfall der Gesamtmenge zu erkennen.

Die Gesamtmenge der Sialinsäuren blieb bis zu einer Konzentration von 50 μM in allen Ansätzen relativ konstant, während der Unterschied in der prozentualen Verteilung von Neu5Ac und Neu5Prop lag.

4.1.5 Vergleich des Metabolismus artifizierlicher *N*-Acetylmannosamin-Analoga in Abhängigkeit von Inkubationszeit und Kulturmedium

Mit den gewonnenen Erkenntnissen aus den Kapiteln 4.1.3 und 4.1.4 wurden verschiedene Möglichkeiten versucht und kombiniert, um ein Protokoll zu entwickeln, bei dem Aufwand und Ertrag stimmten. Neben vielen anderen Versuchen, sind hier die Protokolle der beiden Versuche dargestellt, die dahingehend am bedeutendsten waren und deren Vergleich sich am interessantesten gestaltete.

In den drei folgenden Abbildungen (4.7, 4.8, 4.9) wird die Stoffmenge [nmol] und die relative Verteilung [%] der Sialinsäuren in den Diagrammen gezeigt. In den linken Diagrammhälften wird ein Protokoll dargestellt, das 3×48 Stunden Zeit in Anspruch nahm. Dazu wurden die Zellen 1:3 aus einer großen Kulturflasche auf eine kleinere Kulturschale übertragen. Das Medium enthielt 10 % FBS und die artifizierten Sialinsäurevorläufer eine Konzentration von 50 µM im Medium. Die Inkubation dauerte 48 Stunden. Im zweiten Schritt wurden die Zellen erneut 1:3 geteilt und in neuem Medium (10 % FBS) mit Sialinsäurevorläufern (50 µM) auf Kulturschalen ausgesät. Die Inkubationszeit betrug wiederum 48 Stunden. Im dritten Schritt wurden die Zellen 1:3 geteilt und in Medium ohne FBS mit Sialinsäurevorläufern (50µM) für 48 Stunden inkubiert. Dann wurden die Zellen geerntet. Insgesamt nahm das Protokoll einen zeitlichen Rahmen von 144 Stunden in Anspruch, was 6 Tagen entspricht. Aus einer Kulturflasche konnten 27 Kulturschalen kultiviert werden (9 ohne Sialinsäurevorläufer; 9 O-Ac₄-ManNProp-behandelt; 9 O-Ac₄-ManNBut-behandelt).

Das Protokoll der rechten Diagrammhälfte wurde bereits in Kapitel 3.3.4 ausführlich erläutert, da dieses auch für die Versuche mit Neuraminidasen (siehe 3.5) und zur Anreicherung sialylierter Glykokonjugate (siehe 3.6) verwendet wurde.

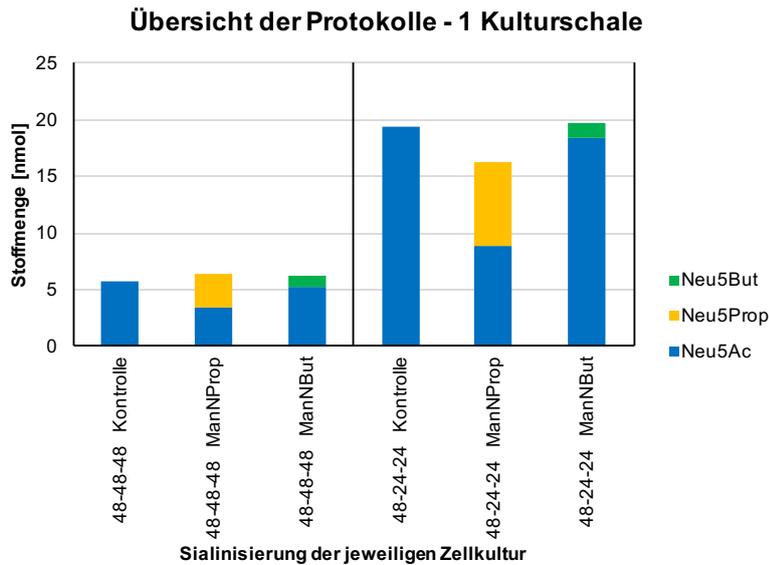


Abbildung 4.7 Zwei Protokolle im Vergleich – 1 Kulturschale

Im Diagramm sind 2 unterschiedliche Protokolle abgebildet, die im Rahmen der Optimierung von Inkorporation und Metabolismus artifizierender Sialinsäurevorläufer entwickelt wurden. Die Balken zeigen die Stoffmenge der Sialinsäuren geernteter Zellen, wobei ein Balken einer Kulturschale entspricht.

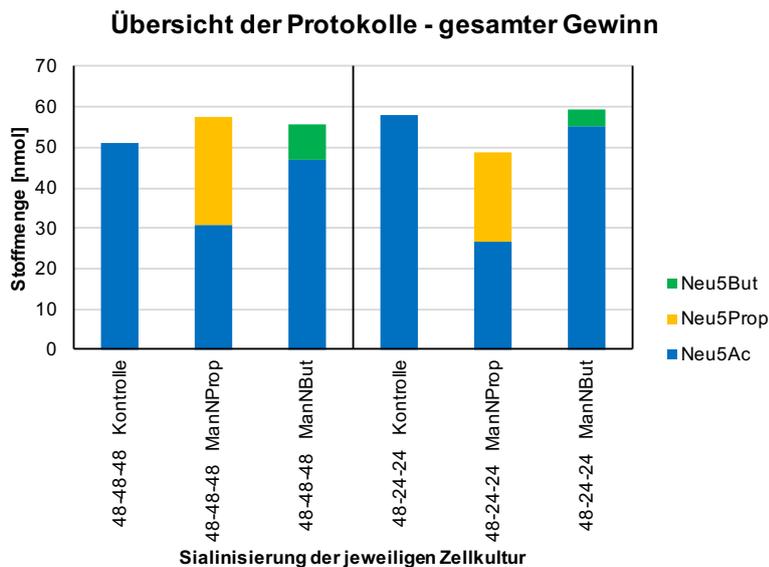


Abbildung 4.8 Zwei Protokolle im Vergleich – gesamter Gewinn

Das Diagramm veranschaulicht die gesamte Menge der jeweiligen Kulturschalen (Kontrolle-unbehandelt, O-Ac₄-ManNProp-behandelt, O-Ac₄-ManNBut-behandelt), die aus den beiden Protokollen hervorgingen. Durch das Passagieren der Zellen erhielt man im Zuge des linken Protokolls (3×48 Stunden) aus einer Kulturflasche 3×9 Kulturschalen (Kontrolle-unbehandelt, O-Ac₄-ManNProp-behandelt, O-Ac₄-ManNBut-behandelt). Ein Balken des linken Protokolls entspricht somit neun geernteten Kulturschalen. Beim Passagieren der Zellen nach dem rechten Protokoll wurden aus einer Kulturflasche 3×3 Kulturschalen (Kontrolle-unbehandelt, O-Ac₄-ManNProp-behandelt, O-Ac₄-ManNBut-behandelt) gewonnen. Ein Balken des rechten Protokolls entspricht drei geernteten Kulturschalen.

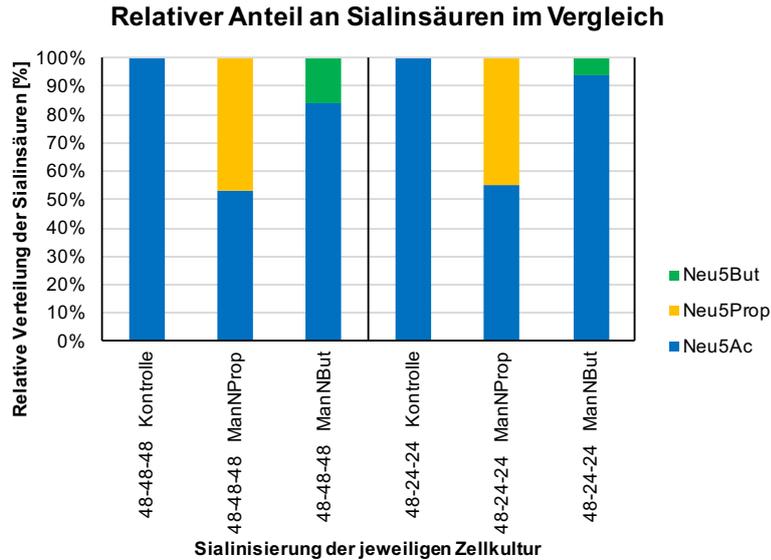


Abbildung 4.9 Zwei Protokolle im Vergleich – relativer Anteil der artifiziellen Sialinsäuren

Während die Synthese von Neu5Prop in vergleichbarem Verhältnis stand, unterschied sich die Synthese von Neu5But. Im linken Protokoll (3×48 Stunden) entsprach der relative Anteil von Neu5But mindestens dem Doppelten des rechten Protokolls.

Die Abbildungen 4.7-4.9 zeigen den wesentlichen Unterschied der Protokolle, die hier im direkten Vergleich stehen. In beiden Protokollen wurden die Zellen zunächst im Vollmedium (10 % FBS) mit ManNAc-Analoga kultiviert, um die Zellzahl zu Beginn zu steigern aber gleichzeitig auch eine Aufnahme und Metabolisierung der artifiziellen Sialinsäurevorläufer zu gewährleisten. Die anfänglich hohe Zellwachstumsrate war in beiden Protokollen für weitere Passagen notwendig, da sich die Zellen in Kulturmedien mit geringem bis keinem Zusatz von FBS nur begrenzt bzw. nicht teilten (siehe 4.1.3). Dadurch war nach späterer Passage und Inkubation in den Hungermedien eine ausreichende Zellpopulation für weitere Untersuchungen vorhanden. Hier sei aber besonders der Vergleich der Stoffmenge pro Kulturschale hervorzuheben. Die Menge der Sialinsäuren im rechten Protokoll (48-24-24 Stunden) war, mit Ausnahme der O-Ac₄-ManNProp-behandelten Zellen, mehr als dreimal so hoch (Abbildung 4.7). Der gesamte Ertrag beider Protokolle (Abbildung 4.8) war dagegen sehr ähnlich. Dabei müssen zum einen der Mehraufwand bzw. der Verbrauch und zum anderen der Verlust berücksichtigt werden. Im linken Protokoll (48-48-48 Stunden) wurden jeweils 9 Kulturschalen, im rechten (48-24-24 Stunden) nur 3 Kulturschalen geerntet. Je mehr Kulturschalen zu verarbeiten sind, desto größer wird auch der Verlust der Substanzmenge im Rahmen der Aufarbeitung. Außerdem werden mehr Verbrauchsmaterialien und Kulturmedium benötigt. Der Kosten-Nutzen- und Arbeits-Aufwand sprachen für das kürzere Protokoll

(48-24-24 Stunden). Das längere Protokoll nahm zudem sechs Tage in Anspruch und lässt sich dadurch nur begrenzt in die Laborwoche integrieren.

Die Sialinisierung der *O*-Ac₄-ManNProp-behandelten Kulturschalen war vergleichbar (50-55 %), während die Synthese von Neu5But im längeren Protokoll (48-48-48 Stunden) ausgeprägter war (Abbildung 4.9).

Für die folgenden Versuche entschied man sich für das kürzere Protokoll (siehe 3.3.4), das ertragreicher und effizienter war, wodurch vor allem wesentlich mehr Probenmaterial pro Kulturschale gewonnen werden konnte. Der angestrebte relative Anteil von 50 % Neu5Prop an der Gesamtmenge der Sialinsäuren wurde fast erreicht. Die nahezu gleiche Verteilung künstlicher und physiologischer Sialinsäuren ermöglichte eine genauere Aussage in Untersuchungen mit Neuraminidasen.

4.2 Abspaltung modifizierter Sialinsäuren von Glykokonjugaten homogenisierter A-549-Zellen durch Neuraminidasen verschiedener Influenza-A-Viren

4.2.1 Influenza-A-H1N1-Neuraminidase (A/California/04/2009)

In den nächsten drei Abbildungen (4.10 - 4.12) finden sich die Chromatogramme nach Behandlung der jeweiligen Probe mit der Neuraminidase des Influenza-A-Virus H1N1. Im oberen Chromatogramm konnten alle Sialinsäuren nach DMB-Markierung dargestellt werden. Das untere Chromatogramm bildet die reduzierte Probe ab. Hier sind lediglich die konjugierten Sialinsäuren zu sehen, da die DMB-Markierung ungebundener Sialinsäuren nach Reduktion der α -Ketogruppen nicht mehr möglich war. Fällt der Peak der jeweiligen Sialinsäure im unteren Chromatogramm kleiner aus als im oberen, entspricht die Differenz freien, nicht-konjugierten Sialinsäuren. Um nicht-konjugierte Sialinsäuren zu identifizieren, die vom Enzym abgespalten wurden, musste jeweils eine Kontrolle mitgeführt werden (siehe 3.5.3), die hier nicht dargestellt wurde.

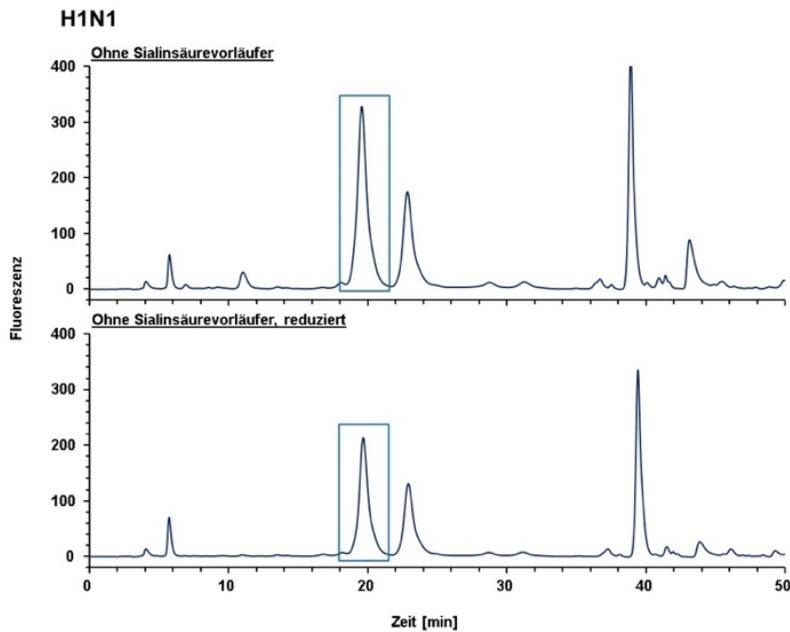


Abbildung 4.10 RP-HPLC unbehandelter homogenisierter Zellen nach Inkubation mit der Neuraminidase H1N1

Die Chromatogramme zeigen unbehandelte homogenisierte Zellen, die mit der Neuraminidase des Influenza-A-Virus H1N1 inkubiert wurden. Die Sialinsäure Neu5Ac ist blau markiert. Im Vergleich fiel der Neu5Ac-Peak des oberen Chromatogramms größer aus.

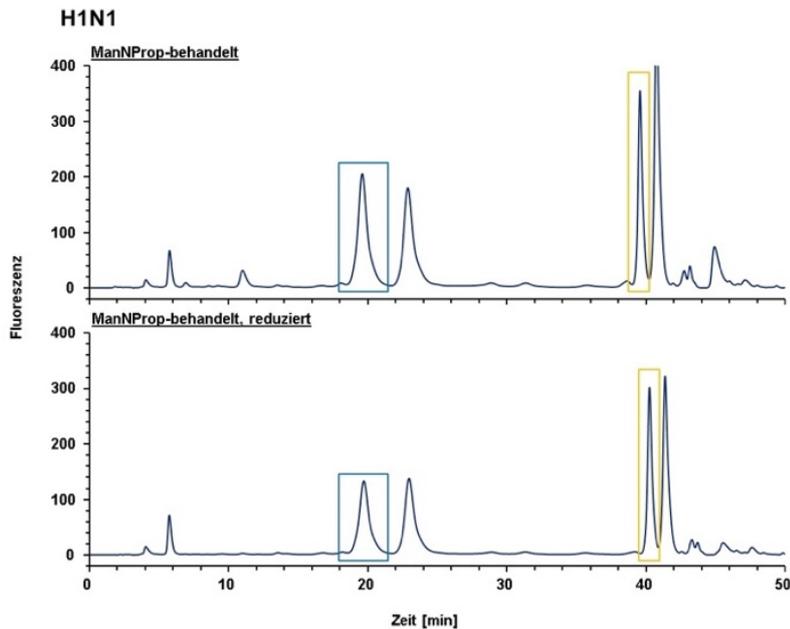


Abbildung 4.11 RP-HPLC O-Ac₄-ManNProp-behandelter homogenisierter Zellen nach Inkubation mit der Neuraminidase H1N1

Die Chromatogramme zeigen O-Ac₄-ManNProp-behandelte homogenisierte Zellen, die mit der Neuraminidase des Influenza-A-Virus H1N1 inkubiert wurden. Die Sialinsäure Neu5Ac ist blau markiert. Hier erschien zusätzlich der Neu5Prop-Peak (orange markiert) vor dem Reagenz-Peak. Während der Neu5Ac-Peak nach Reduktion kleiner ausfiel, war eine Veränderung des Neu5Prop-Peaks kaum festzustellen.

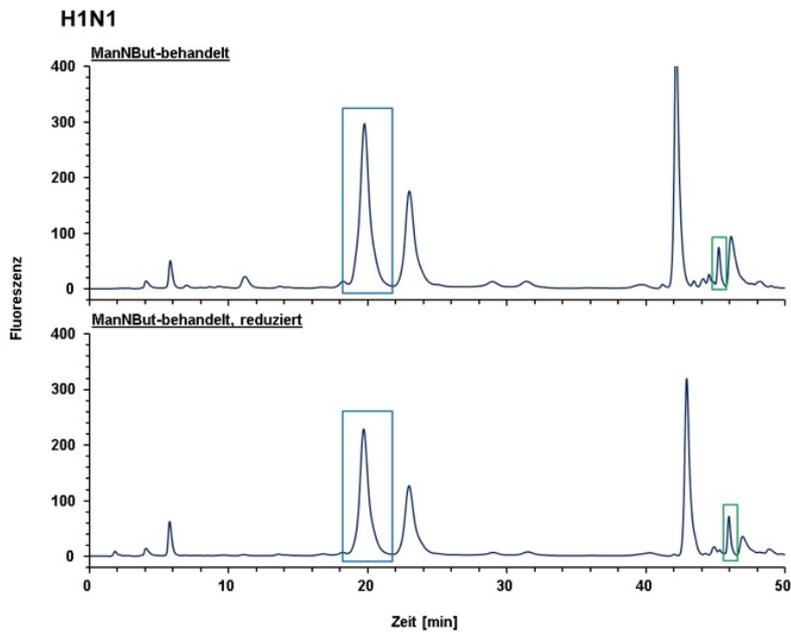


Abbildung 4.12 RP-HPLC O -Ac₄-ManNBut-behandelter homogenisierter Zellen nach Inkubation mit der Neuraminidase H1N1

Die Chromatogramme zeigen O -Ac₄-ManNBut-behandelte homogenisierte Zellen, die mit der Neuraminidase des Influenza-A-Virus H1N1 inkubiert wurden. Die Sialinsäure Neu5Ac ist blau markiert. Hier wird der Neu5But-Peak in grüner Markierung sichtbar. Während der Neu5Ac-Peak nach Reduktion kleiner erschien, war keine Veränderung des Neu5But-Peaks zu erkennen.

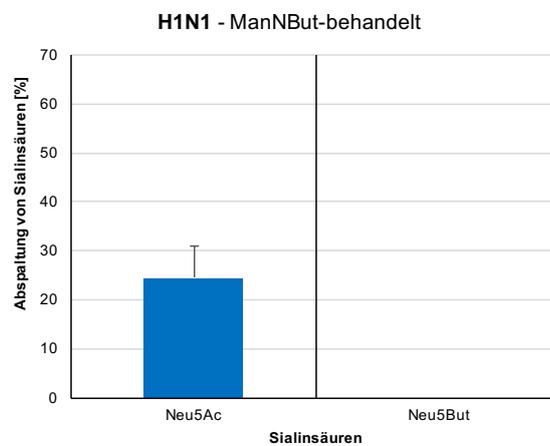
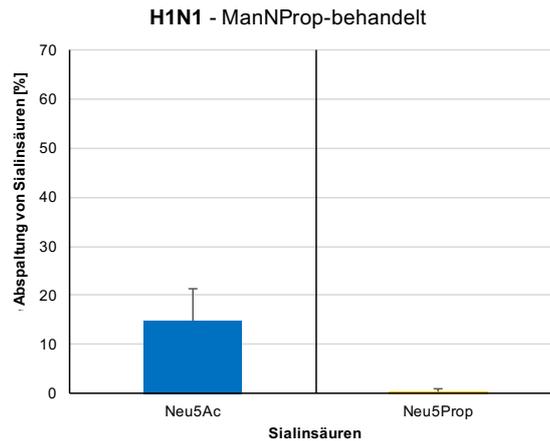
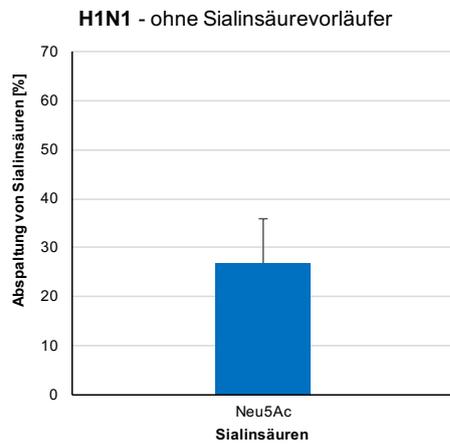


Abbildung 4.13 Influenza-A-H1N1-Neuraminidase (A/California/04/2009)

Die von der Neuraminidase abgespaltenen Sialinsäuren sind in Prozent abgebildet. Dabei wurden unbehandelte, O-Ac₄-ManNProp-behandelte und O-Ac₄-ManNBut-behandelte Zellproben mit der Neuraminidase (Virus H1N1) inkubiert. Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichung, die aus drei unabhängigen Experimenten errechnet wurden.

Die Neuraminidase H1N1 hat in allen homogenisierten Zellproben die Sialinsäure Neu5Ac abgespalten. Während der Anteil an abgespaltenen Neu5Ac in den Proben „ohne Sialinsäurevorläufer“ (27 %) und „O-Ac₄-ManNBut-behandelt“ sehr ähnlich war (24 %), fiel er in der O-Ac₄-ManNProp-behandelten Probe geringer aus (15 %). Die Abspaltung von Neu5Prop lag unter einem Prozent, während keine Abspaltung von Neu5But registriert wurde. Die Neuraminidase H1N1 spaltete das natürliche Substrat, die physiologische Sialinsäure Neu5Ac, ab, wobei künstliche Sialinsäuren nicht umgesetzt wurden.

4.2.2 Influenza-A-H3N2-Neuraminidase (N294S mutation) (A/Babol/36/2005)

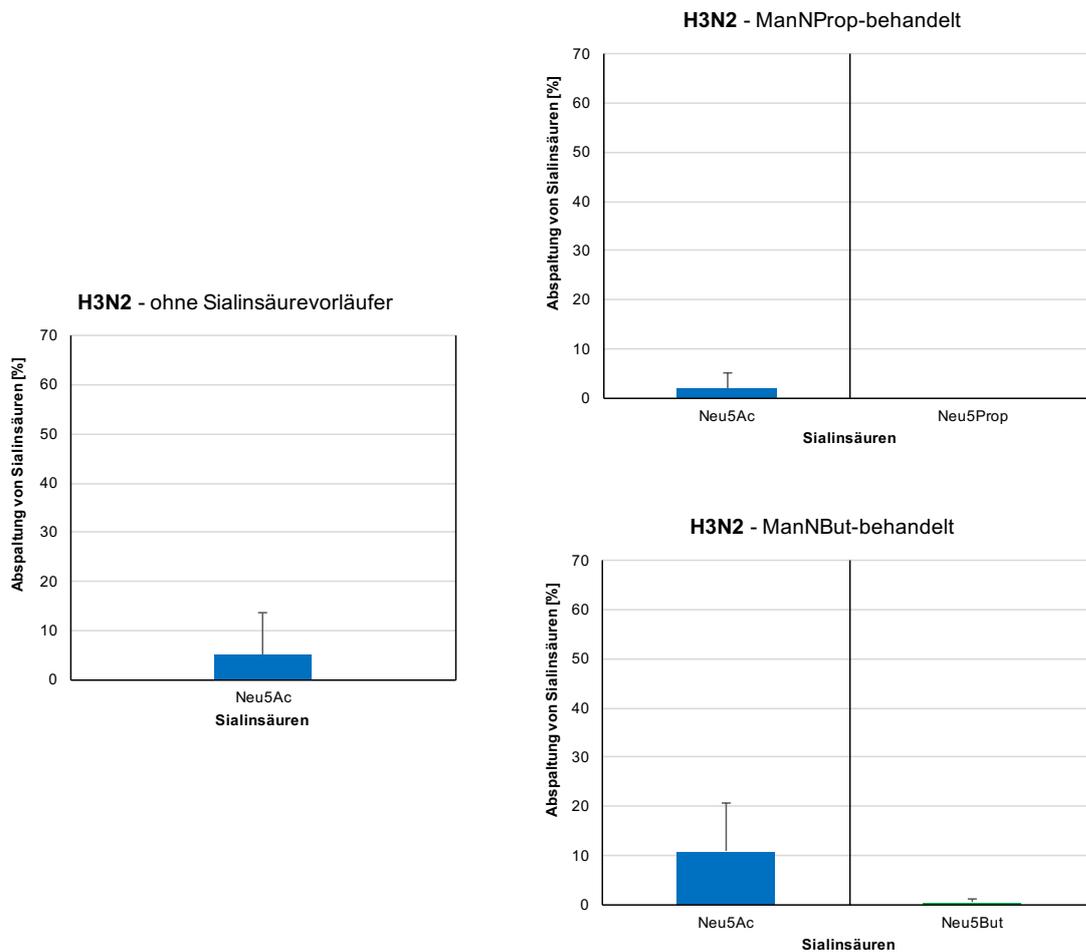


Abbildung 4.14 Influenza-A-H3N2-Neuraminidase (N294S mutation) (A/Babol/36/2005)

Die abgespaltenen Sialinsäuren sind in Prozent abgebildet. Unbehandelte, O -Ac₄-ManNProp-behandelte und O -Ac₄-ManNBut-behandelte Zellproben wurden mit der Neuraminidase (Virus H3N2) inkubiert. Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung, die aus drei unabhängigen Experimenten errechnet wurden.

Unter 6 % der Sialinsäure Neu5Ac wurden in den Proben „ohne Vorläufer“ (5 %) und „ O -Ac₄-ManNProp-behandelt“ (2 %) enzymatisch von Glykokonjugaten getrennt. In den O -Ac₄-ManNBut-behandelten homogenisierten Zellen stellte man eine höhere Umsatzrate von 11 % fest. Die Abspaltung der Sialinsäure Neu5But lag unter einem Prozent und ist vernachlässigbar gering. Die Neuraminidase H3N2 setzte somit auch nur die natürlich vorkommende Sialinsäure um. Im Vergleich zur Neuraminidase H1N1 fiel der Umsatz wesentlich geringer aus.

4.2.3 Influenza-A-H5N1-Neuraminidase (A/Anhui/1/2005)

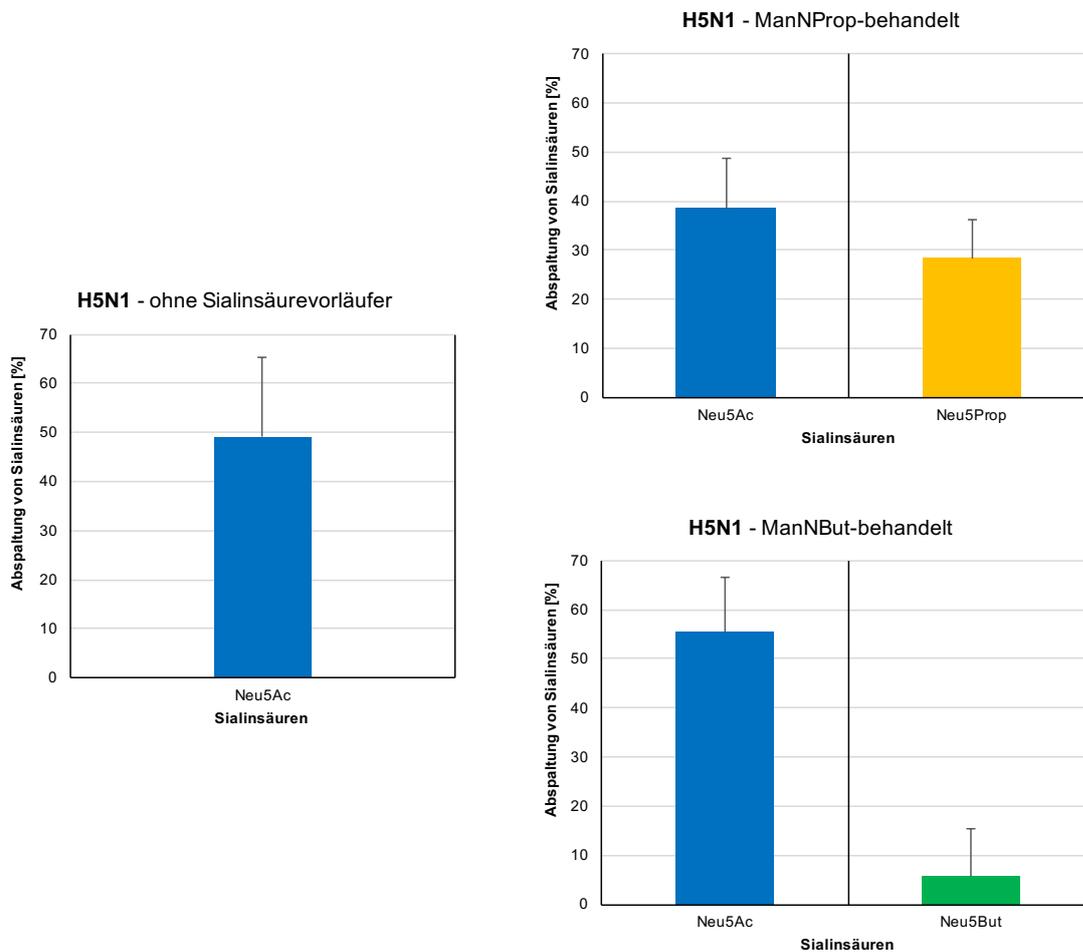


Abbildung 4.15 Influenza-A-H5N1-Neuraminidase (A/Anhui/1/2005)

Abgespaltene Sialinsäuren sind in Prozent sichtbar. Dabei wurden unbehandelte, O-Ac₄-ManNProp-behandelte und O-Ac₄-ManNBut-behandelte Zellproben mit der Neuraminidase (Virus H5N1) inkubiert. Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichung, die aus drei unabhängigen Experimenten errechnet wurden.

Die Aktivität der Neuraminidase H5N1 unterschied sich von H1N1 und H3N2. Der Anteil umgesetzter Substrate ist wesentlich höher. Die von Glykokonjugaten abgespaltene Sialinsäure Neu5Ac lag in den Proben „ohne Sialinsäurevorläufer“ bei 49 %, „O-Ac₄-ManNProp-behandelt“ bei 38 % und „O-Ac₄-ManNBut-behandelt“ bei 55 %. Zudem konnte jetzt auch eine Abspaltung der künstlichen Sialinsäuren von Glykokonjugaten festgestellt werden (Neu5Prop: 28 %, Neu5But: 6 %).

4.2.4 Influenza-A-H7N7-Neuraminidase (A/Netherlands/219/03)

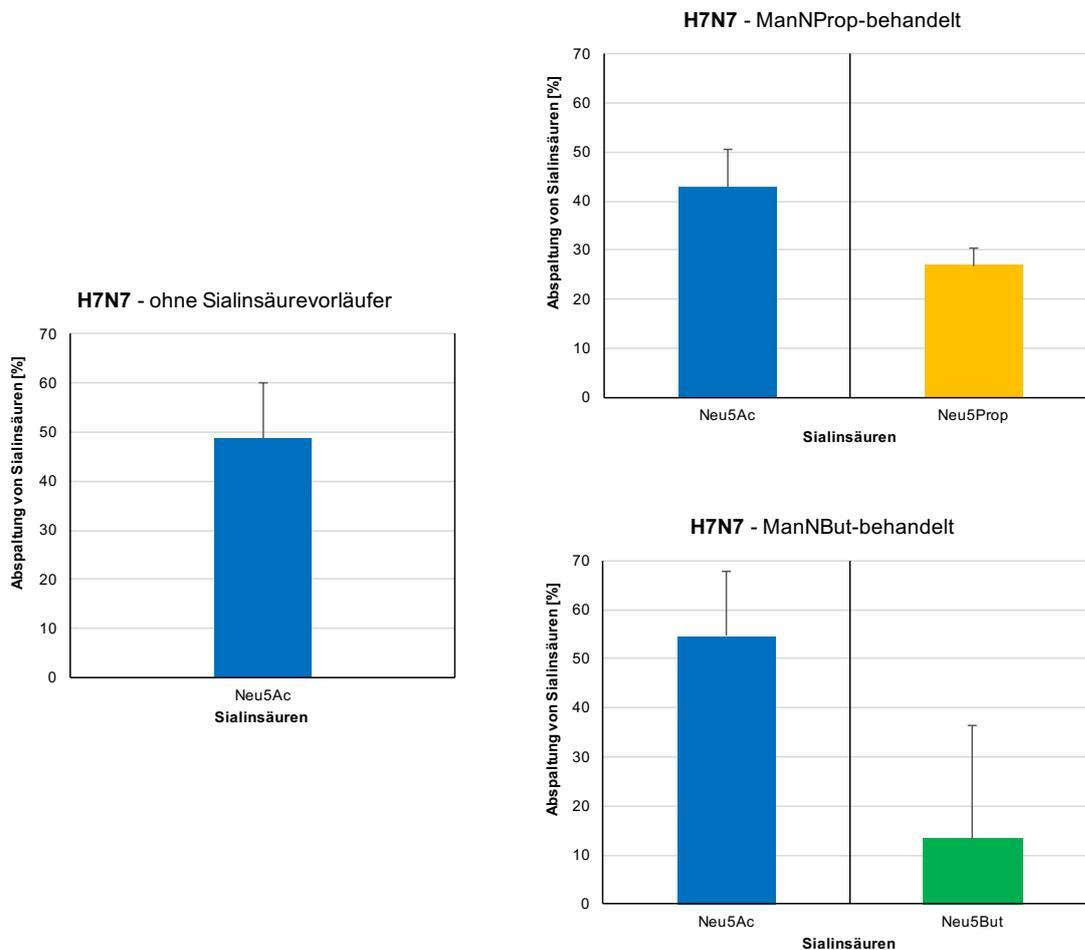


Abbildung 4.16 Influenza-A-H7N7-Neuraminidase (A/Netherlands/219/03)

Von der Neuraminidase abgespaltene Sialinsäuren sind in Prozent abgebildet. Unbehandelte, O-Ac₄-ManNProp-behandelte und O-Ac₄-ManNBut-behandelte Zellproben wurden mit der Neuraminidase (Virus H7N7) inkubiert. Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichung, die aus drei unabhängigen Experimenten errechnet wurden.

Die Abspaltung der Sialinsäuren gestaltete sich ähnlich der Neuraminidase H5N1. Die freigesetzte Sialinsäure Neu5Ac lag in den Proben „ohne Sialinsäurevorläufer“ bei 49 %, „O-Ac₄-ManNProp-behandelt“ bei 43 % und „O-Ac₄-ManNBut-behandelt“ bei 55 %. Auch künstliche Sialinsäuren konnten abgespalten werden (Neu5Prop: 27 %, Neu5But: 13 %).

Die Neuraminidase H3N2 hatte den geringsten Umsatz der physiologischen Sialinsäure. Der Anteil abgespaltener Neu5Ac der Neuraminidase H1N1 war deutlich höher aber auch hier konnte kein Umsatz von sialylierten Glykokonjugaten mit künstlichen Sialinsäuren festgestellt werden. Erst die Neuraminidasen der Viren H5N1 und H7N7 zeigten einen signifikanten Umsatz von Neu5Prop. Der Anteil der Neu5But gespaltenen

Sialinsäuren durch die Neuraminidasen H5N1 und H7N7 war nur sehr gering und ist wegen der hohen Standardabweichung vom Mittelwert nur bedingt aussagekräftig. Die von den Neuraminidasen H5N1 und H7N7 freigesetzten *N*-Acetylneuraminsäuren waren vergleichbar hoch. Alle vier Neuraminidasen spalteten bevorzugt die Sialinsäure Neu5Ac ab.

Die Versuche konnten zeigen, dass alle Neuraminidasen die künstlich veränderten Substrate (Glykokonjugate mit artifiziellen Sialinsäuren), im Vergleich zu den natürlichen Substraten, wesentlich schlechter bzw. überhaupt nicht (H1N1 und H3N2) umsetzen konnten. Da gerade die Neuraminidase H1N1 des häufiger zirkulierenden Virus keine künstlichen Substrate umsetzen konnte, war hier das Interesse groß, diese Substrate anzureichern und eine mögliche lungenspezifische Anwendung gegen das Virus zu untersuchen. Die Aufarbeitung und Anreicherung der sialylierten Glykokonjugate für virologische Versuche ist im folgenden Kapitel dargestellt.

4.3 Aufarbeitung und Anreicherung sialylierter Glykokonjugate

In diesem Kapitel werden die Schritte der Aufbereitung anhand der unbehandelten und O-Ac₄-ManNProp-behandelten Zellproben erläutert.

4.3.1 Anionenaustauscherchromatographie zur Anreicherung sialylierter Glykokonjugate

Die Aufarbeitung sialylierter Glykokonjugate erfolgte aus geernteten Zellen, die nach beschriebenem Protokoll mit peracetylierten ManNAc-Analoga behandelt wurden (siehe 3.3.4). Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Kapitel 3.6 erläutert.

Nach der enzymatischen Behandlung mit Trypsin wurden gewonnene sialylierte Glykokonjugate mittels Anionenaustauscherchromatographie weiter separiert, um Verunreinigungen von dem gewünschten Produkt zu trennen bzw. letztere anzureichern. Dazu wurde ein Gradient gesucht, bei dem die Konjugate der injizierten Probe möglichst früh aufgefangen werden konnten und sich auf einen kurzen zeitlichen Rahmen konzentrierten.

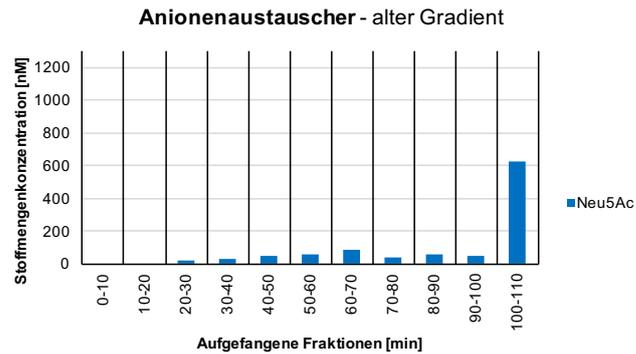


Abbildung 4.17 Alter Gradient, Anionenaustauschersäule

M1: Aqua dest, M2: 4M Ammoniumacetat; Gradient: $t_{0min} = 100\% \text{ M1}$, $t_{5min} = 100\% \text{ M1}$, $t_{20min} = 87\% \text{ M1}$, $t_{30min} = 83\% \text{ M1}$, $t_{45min} = 81\% \text{ M1}$, $t_{85min} = 79\% \text{ M1}$, $t_{110min} = 0\% \text{ M1}$, $t_{125min} = 0\% \text{ M1}$, $t_{126min} = 100\% \text{ M1}$. Zum Etablieren eines geeigneten Gradienten wurden zunächst unbehandelte Zellen aufgearbeitet. Das Diagramm zeigt die Stoffmengenkonzentration der Sialinsäure Neu5Ac in den aufgefangenen Fraktionen bis Minute 110. Die Fraktionen wurden im 10-Minuten-Takt aufgefangen und semiquantitativ analysiert. Bis zu Minute 20 wurden keine Sialinsäuren detektiert. Von Minute 20-100 zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung von Neu5Ac. Auffällig war die Fraktion von Minute 100-110. Hier stieg die Konzentration von Neu5Ac über 600 nM.

Die aufgefangenen Sialinsäuren konzentrierten sich im alten Gradienten auf Minute 100-110 (siehe Abbildung 4.17), was zunächst gut ist. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass zwischen Minute 100 und 110 der Salzgehalt des Gradienten sehr hoch war (Minute 110 = 100 % Ammoniumacetat) und sich unerwünschte Nebenprodukte aus der aufgetragenen Probe zunehmend in der Fraktion sammeln können. Der hohe Salzgehalt gegen Ende war notwendig, um die Probe vollständig von der Säule zu lösen.

Der neue Gradient wurde auf 90 Minuten gekürzt. Die Fraktionen wurden weiterhin im 10-Minuten-Abstand aufgefangen. Zwischen Minute 20 und 40 wurde der Anteil an Ammoniumacetat schneller erhöht, wobei der Anteil Ammoniumacetat erst bei Minute 60 bei 100 % lag.

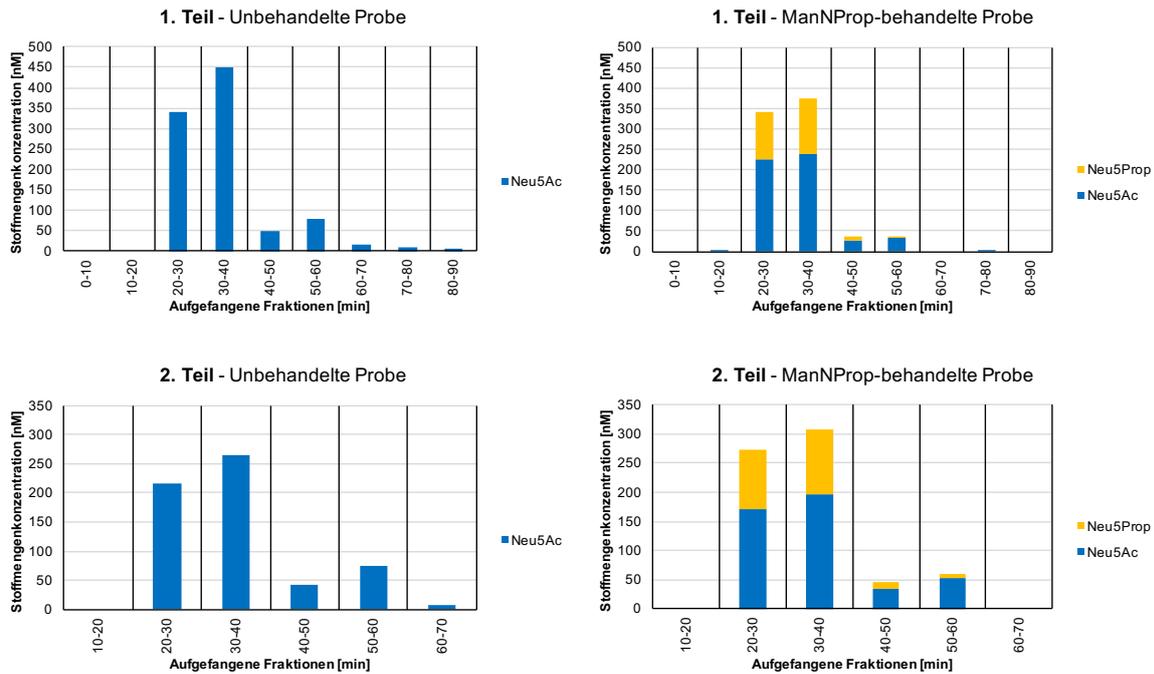


Abbildung 4.18 Etablierter Gradient, Anionenaustauschersäule

M1: Aqua dest, M2: 4M Ammoniumacetat; $t_{0\text{min}} = 100\% \text{ M1}$, $t_{5\text{min}} = 100\% \text{ M1}$, $t_{20\text{min}} = 87\% \text{ M1}$, $t_{35\text{min}} = 79\% \text{ M1}$, $t_{60\text{min}} = 0\% \text{ M1}$, $t_{70\text{min}} = 0\% \text{ M1}$, $t_{71\text{min}} = 100\% \text{ M1}$, $t_{90\text{min}} = 100\% \text{ M1}$. In den Diagrammen sind jeweils die unbehandelten und O-Ac₄-ManNProp-behandelten Proben dargestellt. Da 380 μl Probe nicht in einem Arbeitsschritt appliziert werden konnten, war es notwendig die Probe in zwei Teilen aufzutragen (1. Teil: 200 μl , 2. Teil: 180 μl ; siehe 3.6.3). Die Fraktionen wurden im 10-Minuten-Takt aufgefangen und semiquantitativ analysiert. Die Stoffmengenkonzentration der Sialinsäuren war zwischen Minute 20-40 am höchsten. Zusätzlich konnte in den Fraktionen der Minute 40-60 eine geringe Konzentration an Sialinsäuren beobachtet werden. Der Anteil an Neu5Prop war in den Fraktionen 20-40 höher als in 40-60. Das Konzentrationsmuster der Sialinsäuren in den applizierten Teilen gestaltete sich insgesamt sehr ähnlich. Die Konzentration des 1. Teils war höher, was mit dem applizierten Volumen korreliert.

Im Zuge der Anreicherung und Aufarbeitung der Proben nahm der Anteil an künstlichen Sialinsäuren (Neu5Prop) im Verhältnis zur natürlichen Sialinsäure ab. In Minute 20-40 konnte der Großteil der Sialinsäuren aufgefangen werden, wobei hier der Anteil an Ammoniumacetat im Vergleich zum alten Gradienten bei Minute 100-110 deutlich geringer war. Durch die geringere Konzentration von Ammoniumacetat im Laufmittelgemisch, wurden weniger Nebenprodukte in den Fraktionen aufgefangen und die Reinheit der Probe stieg. Zur Anreicherung der Glykokonjugate wurde daher dieser Gradient verwendet.

4.3.2 Stoffmengenverlust

Während der Aufbereitung der Zellproben und Anreicherung der Glykokonjugate wurden zur Kontrolle des Sialinsäuregehalts Aliquots entnommen und sialinsäureanalytisch untersucht (siehe 3.4.1).

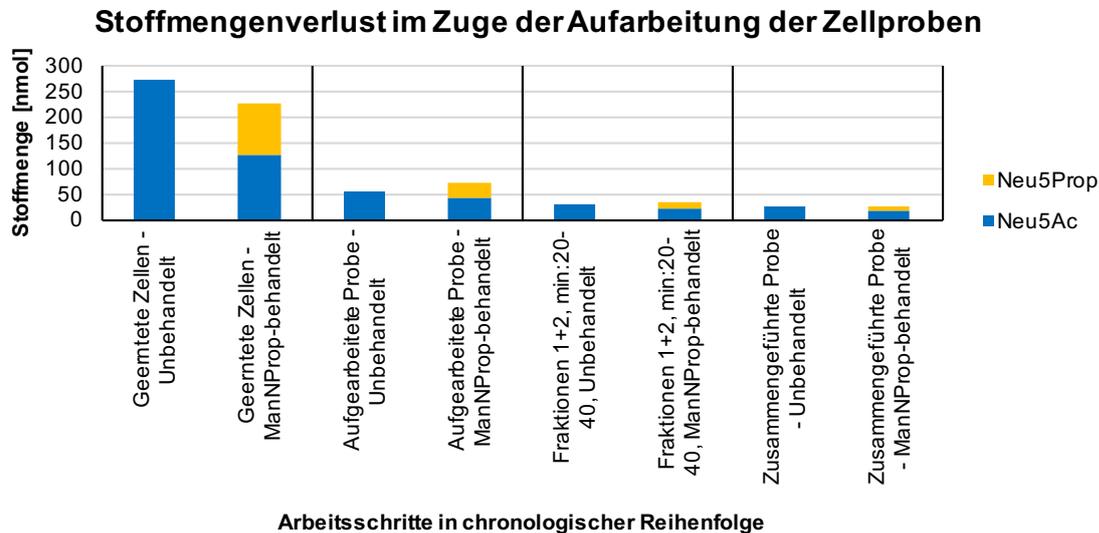


Abbildung 4.19 Stoffmengenverlust im Zuge der Aufarbeitung

Im Diagramm sind die vorhandenen Stoffmengen der jeweiligen Arbeitsschritte chronologisch aufgeführt. Der Verlust zwischen geernteten Zellen und aufgearbeiteter Probe war am größten und fiel zwischen aufgefangenen Fraktionen und zusammengeführten Proben am geringsten aus. Lediglich die aufgearbeiteten Proben und die Fraktionen wurden semiquantitativ ausgewertet, da der Sialinsäuregehalt in den Proben sehr unterschiedlich war.

Der größte Verlust an Sialinsäuren wurde in der Aufreinigung und im tryptischen Verdau der Zellproben verzeichnet. Der Celldisruptor öffnete die Zellstrukturen, wodurch ungebundene Sialinsäuren in Lösung gingen. Nach dem Zentrifugieren wurden diese bei Abnahme des Überstandes verworfen (siehe 3.6.1). Um die gewünschten Konjugate von Glykoproteinen anzureichern, wurden die von der Serinprotease abgetrennten Glykokonjugate durch die Massenträgheit in der Zentrifuge von den restlichen Zellbestandteilen getrennt (siehe 3.6.3). Die abgespaltenen Glykokonjugate wurden mit dem flüssigen Überstand aufgenommen, wobei ein Großteil anderer sialylierter Strukturen (Glykolipide, ungespaltene Proteine) aufgrund der Trägheit im Pellet verblieb. Der größte Verlust in der Aufarbeitung wurde also im ersten Schritt bei Öffnung der Zellstrukturen (ungebundene Sialinsäuren in Lösung) und nach Trypsinierung (sialylierte Zellstrukturen im Pellet) verzeichnet.

Nach ionenchromatographischer Separation (siehe 3.6.4) der Probe und Zusammenführung kam es in den verschiedenen Arbeitsschritten zu minimalen Stoffmengenverlusten, die in der Aufarbeitung wohl kaum zu vermeiden waren.

4.4 Einfluss aufgereinigter sialylierter Glykokonjugate auf das Influenza-A-Virus H1N1 (A/Hamburg/5/09)

4.4.1 Verschiedene Proben sialylierter Glykokonjugate

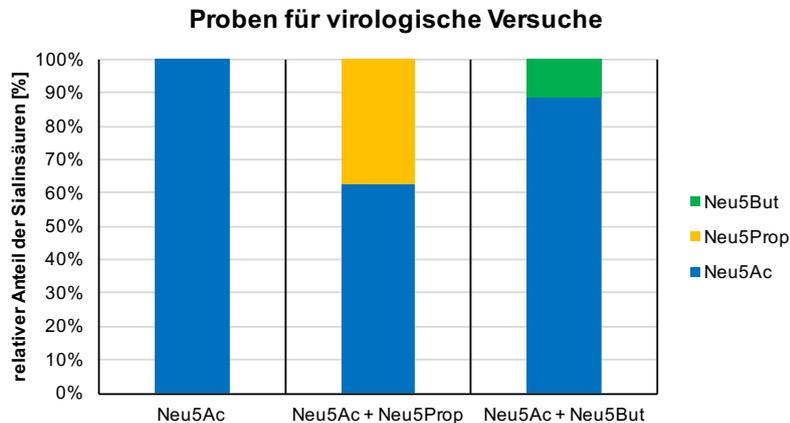


Abbildung 4.20 Proben für virologische Versuche

Dargestellt sind die aufgereinigten Proben sialylierter Glykokonjugate für virologische Versuche. Die drei Proben unterschieden sich hinsichtlich der Sialinsäuren. Während die erste Probe ausschließlich Neu5Ac enthielt, kam in den anderen beiden Proben zusätzlich jeweils eine künstliche Sialinsäure vor: Neu5Prop oder Neu5But.

Der Anteil von Neu5Prop am Gesamtgehalt der Sialinsäuren in der zweiten Probe betrug 37 %, der Anteil von Neu5But in der dritten Probe 11 %. In den virologischen Versuchen ist die Probe mit Neu5Ac blau dargestellt, mit Neu5Ac + Neu5Prop orange und mit Neu5Ac + Neu5But grün. Die Farbcodierung erleichtert die Übersicht.

Der Gehalt an Sialinsäuren wurde quantitativ exakt bestimmt, um in den folgenden Versuchen eine genaue Aussage über die verschiedene Wirkung der Proben treffen zu können.

4.4.2 Neuraminidase-Aktivitätstest (MUNANA-Fluoreszenz-Assay)

Zur Untersuchung des Einflusses der verschiedenen Glykokonjugate auf die enzymatische Aktivität der Neuraminidase wurden die Viruspartikel mit verschiedenen Substanzen vorinkubiert. Anhand des MUNANA-Fluoreszenz-Assays konnte ein inhibitorischer Effekt der Konjugate festgestellt werden.

Neuraminidase-Aktivitätstest

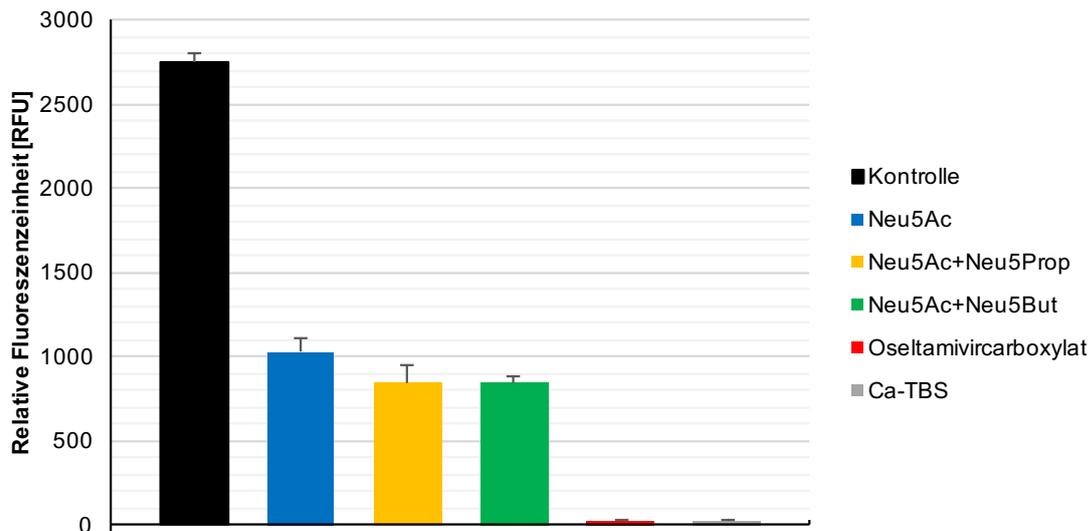


Abbildung 4.21 Neuraminidase-Aktivitätstest

Im Diagramm ist die Aktivität der Neuraminidase H1N1 (A/Hamburg/5/09) in relativer Fluoreszenzeinheit (RFU) abgebildet. Die Fluoreszenz stieg zunehmend mit Umsatz des MUNANA-Substrats, also der Aktivität des Enzyms. In der Negativkontrolle (schwarz) waren weder Glykokonjugate noch Oseltamivircarboxylat enthalten. In den Balken mit den Farben blau (Neu5Ac), orange (Neu5Ac + Neu5Prop) und grün (Neu5Ac + Neu5But) befanden sich die entsprechenden sialylierten Glykokonjugate. Der Positivkontrolle diente Oseltamivircarboxylat (rot), dem Lösungsmittelabgleich Calcium-TBS-Puffer (grau). Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung, die aus drei unabhängigen Experimenten errechnet wurden.

Die Aktivität der Neuraminidase unterschied sich nach Zugabe der sialylierten Glykokonjugate bzw. von Oseltamivircarboxylat (Konzentration je $0,1 \mu\text{M}$) deutlich von der Negativkontrolle. Die Negativkontrolle, die lediglich das verdünnte Virus in Calcium-TBS-Puffer enthielt, zeigte in den Versuchen die höchste Fluoreszenz und stellte die uneingeschränkte Aktivität der Neuraminidase dar (RFU = 2746). Bei Inkubation des Virus mit sialylierten Glykokonjugaten wurde eine Reduktion der Aktivität festgestellt, wobei die Fluoreszenz um weit mehr als die Hälfte abnahm. Zudem konnte ein Unterschied der Aktivität der Neuraminidase bei den verschiedenen Glykokonjugaten festgestellt werden. Im Vergleich zur natürlich vorkommenden Sialinsäure Neu5Ac (RFU = 1027), nahm die Aktivität durch das zusätzliche Vorhandensein künstlicher Sialinsäuren in den Proben (Neu5Ac + Neu5Prop: RFU = 851; Neu5Ac + Neu5But: RFU = 845) weiter ab. Die Glykokonjugate in Verbindung mit den künstlichen Sialinsäuren Neu5Prop und Neu5But zeigten also eine stärkere Inhibition der Neuraminidase als die natürlich vorkommende Sialinsäure Neu5Ac. Die mitgeführte Positivkontrolle Oseltamivircarboxylat (RFU = 27) und der Lösungsmittelabgleich (RFU = 27), Calcium-TBS, zeigten eine identische und vernachlässigbar geringe Intensität an Fluoreszenz.

Bei Zugabe von Oseltamivircarboxylat konnte somit von einer absoluten Hemmung der Neuraminidase ausgegangen werden. Es wurde kein Substrat umgesetzt.

4.4.3 Einfluss auf die Einzelzyklus-Replikation des Influenza-A-Virus H1N1 (A/Hamburg/5/09) in MDCK(H)-Zellen

Das Virus wurde mit den verschiedenen Proben vorinkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben, um die Auswirkung auf die initiale Infektion zu ermitteln (siehe 3.7.4).

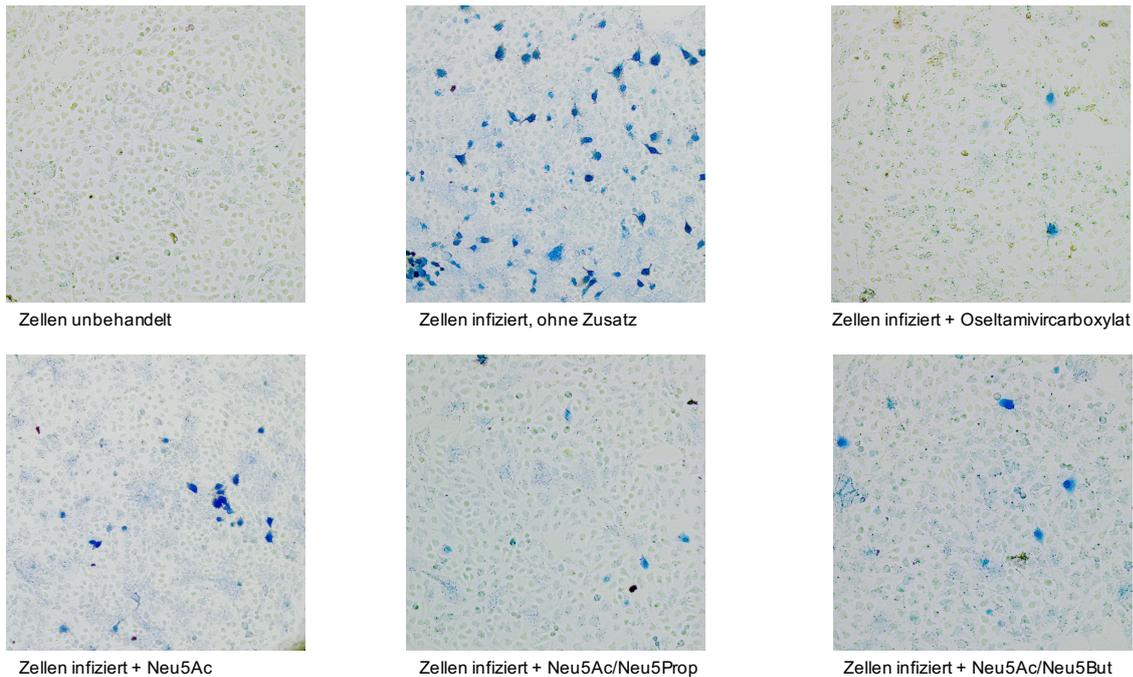


Abbildung 4.22 Lichtmikroskopische Aufnahmen von MDCK(H)-Zellen nach TrueBlue™-Färbung

In den lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden nach immunhistochemischer Färbung mit TrueBlue™ die durch Influenza-A-Virus H1N1 (A/Hamburg/5/09) infizierten Zellen sichtbar. Zellen, denen weder Virus noch Inhibitor zugegeben wurden, zeigten keine Färbung (1. Bild, oben links). Bei Inkubation mit Virus aber ohne Inhibitor (2. Bild, 1. Reihe) erschienen viele homogen verteilte Infektionsherde. Nach Inkubation mit Virus und Oseltamivircarboxylat sind lediglich sehr vereinzelt blau gefärbte, infizierte Zellen zu finden. Auch die Zugabe sialylierte Glykokonjugate (untere Bildreihe) zeigte eine reduzierte Infektionsrate. Bei Verwendung künstlicher Sialinsäuren, Neu5Prop oder Neu5But, fiel die initiale Infektion gegenüber Glykokonjugaten mit ausschließlich natürlich vorkommender Sialinsäure (Neu5Ac) geringer aus.

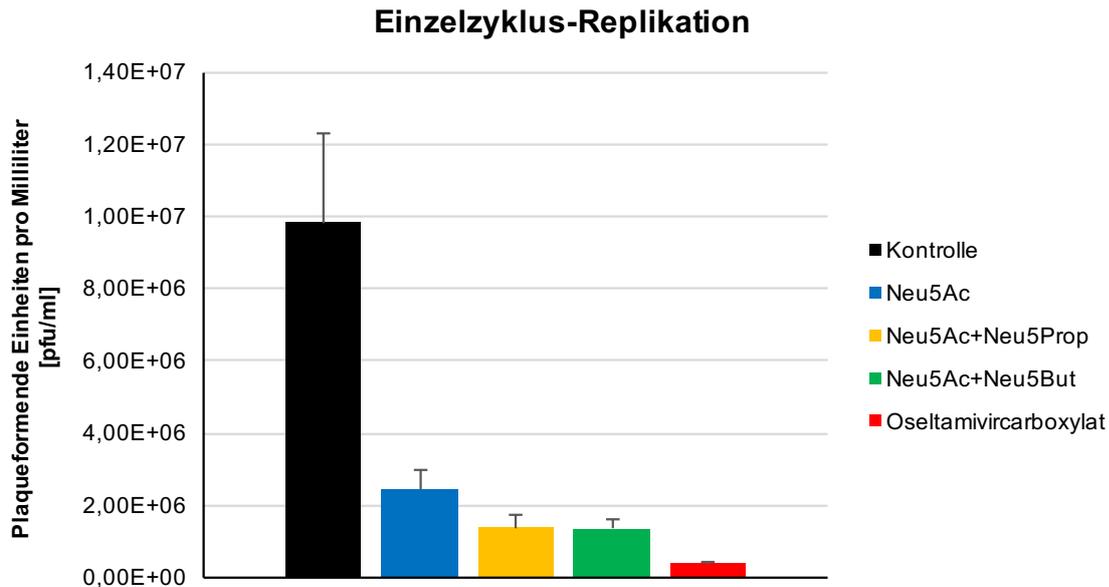


Abbildung 4.23 Einfluss der sialylierten Glykokonjugate auf die Erstinfektion

Das Diagramm stellt die Auswertung der Abbildung 4.22 nach Auszählung infizierter Zellen dar. Die Kontrolle (schwarz) zeigt die ungehemmte Infektion der MDCK(H)-Zellen. Bei Inkubation mit sialylierten Glykokonjugaten (blau, orange, grün) konnte die Infektion um ein Vielfaches reduziert werden. Unter Verwendung von Oseltamivircarboxylat (rot) sank der Virustiter auf unter 50 pfu/ml. Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichung, die aus drei unabhängigen Experimenten errechnet wurden.

In den Abbildungen 4.22 und 4.23 sind zusammenfassend die Ergebnisse nach initialer Infektion unter Einfluss sialylierter Glykokonjugate mit natürlichen bzw. künstlichen Sialinsäuren abgebildet. Die Infektion der Zellen ohne Zugabe eines Inhibitors erreichte den höchsten Wert an plaqueformenden Einheiten pro Milliliter ($9,8 \times 10^6$ pfu/ml). Nach Inkubation des Virus mit sialylierten Glykokonjugaten oder Oseltamivircarboxylat (Konzentration je $0,04 \mu\text{M}$), konnte eine starke Absenkung der infektiösen Partikel beobachtet werden. Auch zwischen den verschiedenen Glykokonjugaten stellte man eine Veränderung der infektiösen Viruspartikel fest. Bei Inkubation mit natürlichen Glykokonjugaten, die lediglich Neu5Ac trugen, waren die infektiösen Partikel auf ein Viertel der Kontrollgruppe gesunken ($2,5 \times 10^6$ pfu/ml). Eine weitere Senkung wurde durch Verwendung von Proben mit Glykokonjugaten erreicht, die sowohl natürliche als auch künstliche Sialinsäuren trugen. Glykokonjugate die neben Neu5Ac auch Neu5Prop ($1,4 \times 10^6$ pfu/ml) oder Neu5Ac und Neu5But ($1,3 \times 10^6$ pfu/ml) trugen, waren vergleichbar gering. Der geringste Virustiter wurde nach Inkubation mit Oseltamivircarboxylat festgestellt ($3,9 \times 10^5$ pfu/ml).

4.4.4 Einfluss auf die multizyklische Replikation des Influenza-A-Virus H1N1 (A/Hamburg/5/09) in Calu-3-Zellen

Die Zellen wurden zunächst mit dem Virus infiziert. Nach Infektion der Zellen wurde das Kulturmedium mit verschiedenen Substanzen inkubiert und der Virustiter nach 24, 48 und 72 Stunden mittels Plaque-Assay ausgewertet (siehe 3.7.3).

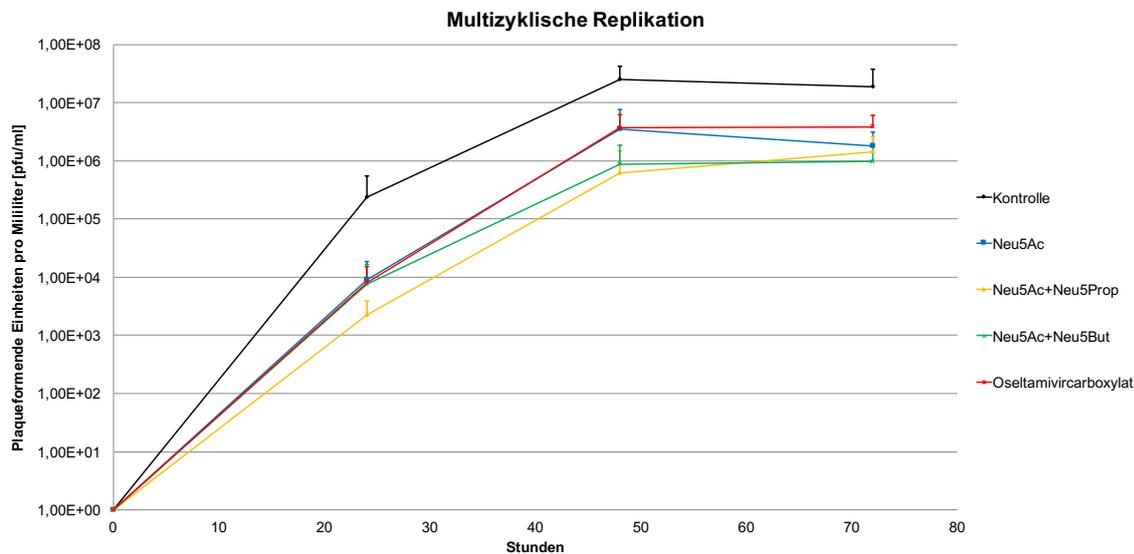


Abbildung 4.24 Virustiter unter Einfluss sialylierter Glykokonjugate

Im Diagramm sind die verschiedenen Virustiter unter Zugabe der Inhibitoren dargestellt. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden 50 µl des Überstandes abgenommen und der Virustiter [pfu/ml] bestimmt. Die Probe ohne Inhibitor (Negativkontrolle) ist schwarz dargestellt. Die sialylierten Glykokonjugate, abhängig von den enthaltenen Sialinsäuren, in blau, orange und grün. Oseltamivircarboxylat (rot) diente als Kontrollinhibitor. Die Konzentration aller Inhibitoren lag bei 0,04 µM. Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte + Standardabweichung, die aus drei unabhängigen Experimenten errechnet wurden. Wegen der logarithmischen Auftragung ist lediglich die positive Standardabweichung dargestellt.

Die multizyklische Replikation des Virus H1N1 zeigte eine Abnahme des Titer sowohl bei Behandlung mit dem Kontrollinhibitor (Oseltamivircarboxylat) als auch unter Zugabe der sialylierten Glykokonjugate, wobei das Glykokonjugat mit der künstlichen Sialinsäure Neu5Prop die Replikation des Virus insgesamt am stärksten einschränkte.

In Abbildung 4.24 kann der Verlauf nach Infektion in der Übersicht beobachtet werden. 24 Stunden nach Infektion der Zellen zeigte die Negativkontrolle den höchsten Titer ($2,4 \times 10^5$ pfu/ml). Die Messung der Kulturmedien nach Zugabe von Oseltamivircarboxylat ($8,1 \times 10^3$ pfu/ml), Glykokonjugaten mit natürlicher Sialinsäure Neu5Ac ($8,9 \times 10^3$ pfu/ml) und solchen, die zusätzlich die künstliche Sialinsäure Neu5But ($7,5 \times 10^3$ pfu/ml) trugen, ergaben sehr ähnliche Werte. Auffällig war hier der deutlich tiefere Titer nach Inkubation mit Glykokonjugaten, die die Sialinsäuren Neu5Ac und Neu5Prop trugen ($2,3 \times 10^3$

pfu/ml). Nach 48 Stunden waren der Titer des Mediums mit Oseltamivircarboxylat ($3,7 \times 10^6$ pfu/ml) und Glykokonjugaten mit natürlicher Sialinsäure Neu5Ac ($3,5 \times 10^6$ pfu/ml) nahezu identisch, während sich der Titer im Medium mit künstlich sialylierten Glykokonjugaten Neu5Ac und Neu5But ($8,7 \times 10^5$ pfu/ml) dem mit Neu5Ac und Neu5Prop ($6,2 \times 10^5$ pfu/ml) annäherte. Die Negativkontrolle zeigte bei 48 Stunden ($2,5 \times 10^7$ pfu/ml) als auch bei 72 Stunden ($1,9 \times 10^7$ pfu/ml) den höchsten Virustiter. Der Titer der Positivkontrolle (Oseltamivircarboxylat) blieb konstant ($3,9 \times 10^6$ pfu/ml). In den Kulturmedien, die mit Glykokonjugaten inkubiert wurden, konnten nach 72 Stunden geringere Titer gemessen werden: Neu5Ac ($1,8 \times 10^6$ pfu/ml); Neu5Ac und Neu5Prop ($1,4 \times 10^6$ pfu/ml); Neu5Ac und Neu5But ($9,7 \times 10^5$ pfu/ml).

5 Diskussion

5.1 Metabolismus künstlicher peracetylierter ManNAc-Analoga in A549-Zellen

Die Promiskuität der Enzyme des Sialinsäurestoffwechsels erlaubt die Einschleusung und Metabolisierung aliphatischer Strukturanaloga mit verlängerter N-Acylseitenkette *in vitro* (Kayser et al., 1992; Schwartz et al., 1983). Auch wenn die ManNAc-Kinase und Neu5Ac-Synthase die Umsetzung aliphatischer Strukturanaloga begrenzen, ist eine Erweiterung der Seitenkette mit bis zu sechs zusätzlichen C-Atomen möglich (Jacobs et al., 2001; Viswanathan et al., 2003).

Die Substratanaloga *O*-Ac₄-ManNProp und *O*-Ac₄-ManNBut wurden nach dem etablierten Protokoll von Nils Bayer synthetisiert (Bayer et al., 2013). Das Protokoll erlaubt eine quantitative Reaktionsausbeute, wodurch die Produkte keiner Reinigung bedürfen. Um die Membranpermeabilität der ManNAc-Analoga zu erhöhen und damit die Aufnahme bzw. die Umsetzung der Substrate in der Zelle zu steigern, wurden die freistehenden Hydroxylgruppen peracetyliert (Jones et al., 2004; Sarkar et al., 1995). Anhand von RP-HPLC-Analysen konnte der Metabolismus der veränderten Vorläufermoleküle chromatographisch dargestellt werden. Die hochspezifische Fluoreszenzmarkierung mittels DMB benötigt eine freie Keto- und Carboxylgruppe, die im Grunde nur das Sialinsäuremolekül liefert (Galuska et al., 2010; Hara et al., 1986). Der Nachweis von Sialinsäuren in A549-Zellen wurde anhand des Monosaccharid-Standards verifiziert. Die unbehandelte Probe zeigte im Vergleich zum Leerwert einen Peak, der mit der bekannten Retentionszeit von Neu5Ac des Monosaccharidstandards übereinstimmte. Die Chromatogramme der vorbehandelten Zellen mit den Strukturanaloga *O*-Ac₄-ManNProp und *O*-Ac₄-ManNBut beinhalteten neben dem Neu5Ac-Peak jeweils ein weiteres Signal mit erhöhter Retentionszeit. Das Signal nach Behandlung mit *O*-Ac₄-ManNProp erschien im Vergleich noch vor dem Signal der *O*-Ac₄-ManNBut behandelten Proben. Die chromatographischen Profile entsprachen denen, die bisher am Biochemischen Institut Gießen mit identischen Substratanaloga und gleicher Zelllinie anhand von ESI-MS- und ESI-MS/MS-Untersuchungen dargestellt wurden. Es handelte sich bei diesen Signalen um die Strukturen Neu5Prop und Neu5But (Bayer, 2016; Bayer et al., 2013; Galuska et al., 2010). Die Sialinsäureanaloga Neu5Prop und Neu5But wiesen, bedingt durch eine stärkere Interaktion der jeweiligen DMB-Konjugate mit der C-18-Säule, eine erhöhte Retentionszeit auf. Die verlängerte N-Acylseitenkette der Analoga hat einen zunehmend hydrophoben Charakter. Jede

zusätzliche Methylengruppe in der *N*-Acylseitenkette verlängerte die Retentionszeit des Substrates. Bayer konnte zudem die Inkorporation der artifiziellen Sialinsäuren Neu5Prop und Neu5But in neu synthetisierte Glykoproteine behandelter A549-Zellen nachweisen. Die Promiskuität einiger Sialyltransferasen erlaubte die Übertragung artifizieller Sialinsäureanaloge mit veränderter *N*-Acylseitenkette auf Glykoproteine (Bayer, 2016). Allerdings wird auch ein hemmender Effekt auf die Polysialyltransferase durch unnatürliche Substratanaloge beschrieben. So konnte ManNBut die Polysialylierung der Zelloberfläche reversibel inhibieren, während ManNProp keine Auswirkung zeigte (Mahal et al., 2001).

Die Substanzen *O*-Ac₄-ManNProp und *O*-Ac₄-ManNBut sind in Konzentrationen bis 100 µM gegenüber der A549-Zelllinie vollständig biokompatibel und bieten keinen Anhalt für Cytotoxizität (Bayer et al., 2013).

Die Fluoreszenzmarkierung hydrolysierter α -Ketosäuren durch DMB und anschließende chromatographischer Darstellung mittels RP-HPLC über eine C18-Säule ist eine hochsensitive Methodik. Sie ist Mittel der Wahl zur Detektion von Neuraminsäuren und erlaubt eine genaue Quantifikation. Die Limitation dieser Detektion liegt im Pikogrammbereich (Galuska et al., 2010; Hara et al., 1986). Die mögliche Darstellung im Spektrophotometer mittels Thiobarbitursäure ist weniger selektiv und sensitiv gegenüber Sialinsäuren. Es kommt dabei zu Interferenzen mit anderen 2-Deoxy-Zuckern, wie 2-Deoxy-Glucose und -Ribose (Aminoff, 1959; Warren, 1959). Eine UV-Detektion mittels HPLC stellt eine Alternative dar, ist aber hinsichtlich der Sensitivität nur limitierend anwendbar und erlaubt keine Darstellung im Pikomolbereich (Shukla and Schauer, 1982).

Um die Metabolisierung der Derivate anhand der Lungenzelllinie A-549 genauer beobachten zu können, wurde das Zellwachstum unter verschiedenen Medienzusätzen bestimmt und die Stoffmenge der Sialinsäuren mit variablen Konzentrationen des Sialinsäurevorläufers *O*-Ac₄-ManNProp sowie mit unterschiedlichen Medienzusätzen untersucht (siehe 4.1).

Der Gehalt an fetalem Kälberserum im Kulturmedium hatte direkten Einfluss auf das Zellwachstum. Ohne Zusatz von FBS verringerte sich die Zellzahl, während bei Zugabe von 1 % FBS die Kultur um etwa 50 %, bei Zusatz von 10 % FBS um etwa 150 % wuchs. Ähnlich verhielt sich auch der Gesamtgehalt der Sialinsäuren. Bei Zugabe von 1% FBS war der gesamte Sialinsäuregehalt im Vergleich zur Kultur ohne FBS um etwa 50% erhöht. Allerdings stieg der Sialinsäuregehalt bei Zugabe von 10 % FBS nur um etwa 100% im Vergleich zur Kultur ohne FBS an. Das Zellwachstum ist somit nicht direkt proportional zur Gesamtmenge der Sialinsäuren.

Nach Inkubation der Zellen mit dem Zuckervorläufermolekül *O*-Ac₄-ManNProp, blieb der Gesamtgehalt an Sialinsäuren (Neu5Ac+Neu5Prop) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen (Neu5Ac) relativ konstant. Vorhergehende Studien konnten nach Vorbehandlung von Zellen mit aliphatischen Präparaten, deren Ausgangssubstrat allerdings nicht peracetyliert war, gleiches beobachten (Galuska et al., 2010; Keppler et al., 1998). Der künstliche Sialinsäurevorläufer mit verlängerter *N*-Acylseitenkette konkurriert mit dem natürlichen Substrat um die Enzymbindung und ersetzt folglich das natürliche Substrat ManNAc der Zelle im Sialinsäuremetabolismus.

Der Anteil von Neu5Prop am Gesamtgehalt der Sialinsäuren variierte mit dem prozentualen Anteil an FBS und der Konzentration des Mannosaminderivates *O*-Ac₄-ManNProp im Kulturmedium. Je höher die Konzentration des künstlichen Derivates, desto mehr Neu5Prop und umso weniger Neu5Ac wurden quantifiziert (Galuska et al., 2010). Je weniger Zellkulturzusätze (FBS) das Medium enthielt, desto mehr NeuProp und weniger Neu5Ac wurden registriert. Das Maximum in der relativen Verteilung von künstlicher zu natürlicher Sialinsäure lag bei 72 % Neu5Prop zu 28 % Neu5Ac bei einer Konzentration von 100 µM *O*-Ac₄-ManNProp im Kulturmedium und ohne Zusatz von FBS. Voraussetzung einer hohen cytosolischen Konzentration künstlichen Substrates ist die Passage der Lipiddoppelmembran. Die Aufnahme über Monosaccharid-Transporter fällt gering aus. Um einen hohen Aufnahmefluss zu garantieren und die Konzentration im Cytosol und damit das Substratangebot zu erhöhen, muss die Passage des Moleküls über die Membran der Zelle erleichtert werden. Daher wurden die angewandten Präparate ManNProp und ManNBut peracetyliert (siehe 3.2). Die Peracetylierung steigert die Membranpermeabilität um ein Vielfaches (Jones et al., 2004). Die veresterten Derivate werden durch zelluläre Esterasen gespalten und anschließend in den Sialinsäurestoffwechsel eingeschleust (Sarkar et al., 1995).

Der Nährstoffzusatz nahm entscheidenden Einfluss auf die Sialinisierung der Zellen. Enthielt das Medium kein FBS waren weniger Zellen pro Kulturschale und dadurch ein höheres Substratangebot (*O*-Ac₄-ManNProp) pro Zelle vorhanden. Bei einem Zusatz von FBS stieg die Wachstumsrate erheblich an. Die Folge ist weniger Substrat pro Zelle. Zudem könnte ein mangelndes Nährstoffangebot der Zellen die Aufnahme artifizieller Sialinsäurevorläufer fördern, da das Verhältnis zwischen ManNAc-Analoga gegenüber Proteinen, Wachstumsfaktoren und Vitaminen erhöht ist.

Keppler et al. beschrieben eine Inkorporation von ManNProp zwischen 35 % (MDCK-II-Zellen) und 52 % (Vero-Zellen) (Keppler et al., 1998, 1995), während abhängig von der Zelllinie auch eine Aufnahme von bis zu 85 % der veränderten Sialinsäuren in Glykokonjugate beschrieben wurde (Mantey et al., 2001).

Die Aufnahme und der Metabolismus von *O*-Ac₄-ManNBut fiel deutlich geringer aus als von *O*-Ac₄-ManNProp. Die reduzierte Metabolisierung bzw. Inkorporation von *O*-Ac₄-ManNBut entspricht Beobachtungen vergleichbarer Versuche (Bayer et al., 2013; Keppler et al., 1998, 1995). Der Metabolismus verwendeter *O*-Ac₄-ManNPent-Analoga lag unter einem Prozent im relativen Vergleich zur physiologischen Sialinsäure Neu5Ac. Vermutlich sind in A549-Zellen die Enzyme, welche an der Sialinsäurebiosynthese beteiligt sind, gegenüber *N*-Acetyl-Modifikationen mit verlängerten Acylresten deutlich restriktiver als in bereits getesteten Zelllinien. Mit zunehmender Länge der Aminoacylkette wurde eine steigende Limitation der zellulären Enzymmaschinerie beobachtet. Die Arbeitsgruppe um Jacobs konnten das gleiche Phänomen beobachten (Jacobs et al., 2001). Kim et al. beobachteten zudem eine Abnahme des Sialinsäurehaushalts bei zunehmender Länge der *N*-Acylseitenkette (Kim EJ et al., 2004). Weshalb im Vergleich von 0 % zu 1 % FBS im Kulturmedium die Synthese von Neu5Prop nur minimal, aber die von Neu5But um das doppelte anstieg, konnte an dieser Stelle nicht geklärt werden.

Aus den gewonnen Erkenntnissen der Metabolisierung von *O*-Ac₄-ManNProp unter Berücksichtigung des Nährstoffmediums und der Konzentration der Sialinsäurevorläufer, wurde anhand verschiedener Inkubationszeiten ein Protokoll entwickelt, dass den Ertrag aber auch den Arbeitsaufwand für weitere Versuche optimal gestaltete (siehe 4.1.5). Weiterhin wurde ein Anteil von 50 % der künstlichen Sialinsäure Neu5Prop an dem Gesamthaushalt angestrebt, um die Abspaltung künstlicher Sialinsäuren durch virale Neuraminidasen zu untersuchen.

Es muss einschränkend darauf hingewiesen werden, dass sich die Analyse der Zellpellets auf die Detektion künstlicher und natürlicher Sialinsäuren beschränkte. Dadurch war es möglich, die Metabolisierung der verschiedenen ManNAc-Derivate zu den entsprechenden Sialinsäureanaloga darzustellen. Eine Aussage, welche Menge der verstoffwechselten ManNAc-Derivate in Glykoproteine oder aber in Glykolipide inkorporiert wurde, konnte an dieser Stelle nicht geklärt werden. Analysen von Proteinextrakten zeigten, dass die artifiziellen Sialinsäuren auch in neu synthetisierte Glykoproteine inkorporiert wurden und bestätigten deren nukleäre Aktivierung, sowie den Transfer durch Sialyltransferasen (Bayer, 2016).

Um eine Aussage zu treffen, welche Enzyme der Lungenzelllinie sich im Rahmen des Sialinsäurestoffwechsels restriktiv gegenüber verlängerten *N*-Acetyl-Modifikationen verhalten, wäre eine Markierung der Strukturanaloga oder aber eine Isolierung der einzelnen enzymatischen Schritte notwendig. Gerade das breite Spektrum der Sialyltransferasen (Harduin-Lepers et al., 1995) erschwert eine isolierte Darstellung solcher Enzyme, die permissiv bzw. restriktiv gegenüber einer liphatischen Verlängerung

der *N*-Acylseitenkette sind. Bereits eine Methylengruppe kann dabei ausschlaggebend sein (Mahal et al., 2001). Eine Datenbank permissiver Enzyme gegenüber artifiziellen Sialinsäuren könnte eine weitere Differenzierung veränderter Glykoproteine und –lipide ermöglichen, die zielgerichtet hinsichtlich der Sialinisierung untersucht werden könnten.

5.2 Abspaltung künstlicher Sialinsäuren durch humane Neuraminidasen

Neuraminidasen gehören zur Familie der sialinsäurespaltenden Enzyme. Sie spalten endständige Sialinsäureresiduen von Glykokonjugaten und sind in der Membran vieler pathogener Viren verankert. Die Neuraminidasen des Influenza-A-Virus sind essentiell für eine effiziente Infektion der Wirtszellen und beeinflussen den initialen Infektionsschritt sowie das Verlassen bereits infizierter Zellen. *In vitro* Versuche mit künstlichen Sialinsäureanaloga zeigten eine starke Reduktion der Virusinfektion nach Vorbehandlung der Zellen. Nach Integration von Sialinsäuren mit verlängerter *N*-Acyl-Seitenkette in oberflächliche Glykoproteine von MDCK-II-Zellen, nahm die Infektion um bis zu 80 % ab (Keppler et al., 1998). Auf der Suche nach neuen therapeutischen Ansätzen gegen Influenza-A-Viren wurde in dieser Arbeit der Einfluss veränderter Sialinsäuren mit verlängerter *N*-Acylseitenkette auf Neuraminidasen untersucht. Abgespaltene künstliche Sialinsäuren wurden durch eine modifizierte Methodik von Galuska detektiert (Galuska et al., 2010). Die entwickelte Methodik erlaubte eine sehr genaue Darstellung der verschiedenen Sialinsäuren im Chromatogramm und die Differenzierung der Spaltprodukte (siehe 3.5.3). Durch die Reduktion des Probenmaterials wurde bei freien bzw. abgespaltenen Sialinsäuren die Ketogruppe zu einer Hydroxylgruppe reduziert. Da für eine DMB-Markierung sowohl eine Keto- als auch eine Carboxylgruppe essentiell sind, war nach Reduktion der freien Sialinsäuren eine DMB-Markierung nicht mehr möglich. Die Ketogruppen gebundener und aktivierter Sialinsäuren werden durch den Ringschluss nicht reduziert und können nach Hydrolyse im Gegensatz zu den freien Sialinsäuren noch DMB-markiert werden. Im Chromatogramm erschienen somit aktivierte bzw. gebundene Sialinsäuren, während abgespaltene und freie Sialinsäuren nicht mehr sichtbar waren. Grundlegend für diese Methodik waren Beobachtungen von Warren, die zeigten, dass lediglich nicht aktivierte Sialinsäuren durch Natriumborhydrid reduziert wurden (Warren and Blacklow, 1962). Getestet wurden vier Neuraminidasen verschiedener Herkunft: Influenza-A-H1N1-Neuraminidase (A/California/04/2009), Influenza-A-H3N2-Neuraminidase (A/Babol/36/2005), Influenza-A-H5N1-Neuraminidase (A/Anhui/1/2005), Influenza-A-

H7N7-Neuraminidase (A/Netherlands/219/03). Homogenisierte A549-Zellen wurden nach Inkubation mit *O*-Ac₄-ManNProp und *O*-Ac₄-ManNBut mit den jeweiligen Neuraminidasen inkubiert. Der Anteil der detektierten Spaltprodukte unterschied sich im Vergleich der jeweiligen Subtypen. Die Neuraminidase H3N2 setzte nur einen geringen Anteil der Sialinsäure Neu5Ac um, der unter Berücksichtigung der Standardabweichung nicht signifikant war. Eine deutliche Steigerung zeigte die Neuraminidase des pandemischen H1N1 Virus. Der Umsatz von Neu5Ac lag zwischen 15 und 30 %. Eine Spaltung künstlicher Sialinsäuren Neu5Prop oder Neu5But wurde nicht registriert. Die beiden Subtypen H5N1 und H7N7 werden nur selten auf den Menschen übertragen und unterschieden sich in der Umsetzung der Substrate gegenüber H1N1 und H3N2. Das Diagramm beider Neuraminidasen war auffallend ähnlich. Insgesamt war der Umsatz der Enzyme wesentlich höher. Hinzu kam die Spaltung der künstlichen Sialinsäureanaloga Neu5Prop und Neu5But. 38 – 55 % des natürlichen Substrates Neu5Ac und 27 – 28 % des künstlichen Substrates Neu5Prop wurden gespalten. Ein geringer Umsatz von Neu5But konnte ebenfalls registriert werden. Im Überblick wird deutlich, dass insgesamt das natürliche Substrat bevorzugt gespalten wurde und eine Abnahme des Umsatzes mit zunehmender Länge der *N*-Acylseitenkette beobachtet werden konnte.

Berücksichtigend muss darauf hingewiesen werden, dass sich der prozentuale Anteil der gespaltenen Sialinsäuren auf den gesamten Gehalt der Sialinsäuren von A549-Zellen bezog. Eine Differenzierung, welcher Anteil der Sialinsäuren lipidgebunden, proteingebunden oder CMP-aktiviert waren und eine Aussage, ob alle möglichen spaltbaren Produkte durch die Neuraminidasen H5N1 bzw. H7N7 umgesetzt wurden, konnte hier nicht dargestellt werden. Hierfür müsste eine weiterführende Diagnostik der Homogenisate betrieben sowie isolierte Glykoproteine bzw. -lipide oder gar aktivierte Nukleotidzucker genau analysiert werden.

Bereits 1966 wurde die Spaltbarkeit von Substraten mit verlängerter *N*-Acylseitenkette anhand von α -Ketosiden untersucht. Meindl und Tuppy demonstrierten die Spaltbarkeit des Benzylketosids der *N*-Propionyl- α -D-Neuraminsäure durch die *Vibrio-cholerae*-Neuraminidase und das Influenza-A-Virus (Melbourne). Die Spaltung des Substrats war langsamer gegenüber den Ketosiden der *N*-Acetyl- und *N*-Glykolyl- α -D-neuraminsäure, während die Ketoside der *N*-Butyryl- und Benzoyl- α -D-neuraminsäure nicht umgesetzt wurden. Der jeweilige *N*-Acylrest hatte einen bedeutenden Einfluss auf die Affinität der Neuraminidasen für die unterschiedlichen α -Ketoside. Dabei reagierte die Neuraminidase des Influenza-A-Virus empfindlicher mit einem Affinitätsverlust von *N*-Acetyl über *N*-Glykolyl zu *N*-Propionyl (Meindl and Tuppy, 1966). Weitere Untersuchungen der *Vibrio-cholerae*-Neuraminidase mit dem potenten kompetitiven

Neuraminidase-Inhibitor 2-Desoxy-2,3-dehydro-*N*-acyl-Neuraminsäure zeigten die Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen der Carboxyl- bzw. *N*-Acetylgruppe. Eine Veresterung der Carboxylgruppe oder Absättigung mit Wasserstoff führte zum Verlust der Wirksamkeit. Die Verlängerung der *N*-Acetylgruppe zu einer *N*-Propionyl-, *N*-Butyryl- bzw. *N*-Benzoyl-Gruppe führte zu einem steigenden Hemmungsverlust gegenüber der *Vibrio-cholerae*-Neuraminidase (Meindl and Tuppy, 1969). Zudem demonstrierten Kayser et al. die Spaltung von Sialinsäuren radioaktiver Serumglykoproteine nach Markierung mit MaNAc oder ManNProp durch *Clostridium perfringens* und *Arthrobacter ureafaciens*. Es wurde eine geringere Abspaltung der mit ManNProp radioaktiv markierten Proteine registriert (Kayser et al., 1992). In den dargestellten Untersuchungen wird die Wichtigkeit der *N*-Acetylgruppe in Bezug auf die Interaktion mit den beschriebenen bakteriellen bzw. viralen Neuraminidasen hervorgehoben. Gerade die Verlängerung der *N*-Acylgruppe beeinflusste also im Besonderen die enzymatische Spaltung und Affinität der Neuraminidase zu dem Substrat. Die Versuche und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind vergleichbar mit den in diesem Abschnitt aufgeführten Studien der Vergangenheit. Der Unterschied bestand jedoch darin, dass lungenspezifische Glykokonjugate als Substrat für die viralen Neuraminidasen getestet wurden. Die verwendete Lungenzelllinie bietet somit eine bessere Möglichkeit, die Substratspaltung durch die Neuraminidase im respiratorischen Trakt nachzuahmen. Nicht nur die Struktur des Substrats, sondern auch die glykosidische Bindung der endständigen Sialinsäuren zur Galaktose der Glykokonjugate ist ein entscheidender Faktor für die enzymatische Umsetzung. Sauer et al. untersuchten die glykosidische Bindung endständiger Sialinsäuren verschiedener Zelllinien und Gewebe. A549-Zellen wurden mit den pflanzlichen Lectinen *Maackia amurensis* agglutinin (MAA) und *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) gefärbt, um zwischen α 2,3- und α 2,6-Verlinkung zu differenzieren. MAA bindet α 2,3-, SNA α 2,6-verlinkte Sialinsäuren. In der Studie stellte sich nur eine sehr geringe Färbung mit MAA dar, SNA verursachte dagegen eine deutliche Fluoreszenz (Sauer et al., 2014). Die Vermutung liegt nahe, dass Glykokonjugate von A549-Zellen hauptsächlich terminale α 2,6-glykosidisch gebundene Sialinsäuren tragen. Aviäre als auch humane Neuraminidasen können beide Bindungstypen hydrolysieren. Während die aviären Influenza-A-Neuraminidasen im Allgemeinen eine hohe Aktivität und Präferenz gegenüber α 2,3-sialylierten Zuckerresten besitzen, haben humane Influenza-A-Neuraminidasen eine geringere, aber vergleichbare Aktivität für α 2,3- und α 2,6-sialylierte Zuckerresiduen, wenn auch die Umsetzung von α 2,3-Substraten leicht präferiert wird (Kobasa et al., 1999; Li Y et al., 2011). Baum und Paulson beobachteten zwischen 1957 und 1987 einen Drift in der Spezifität der humanen Neuraminidase N2. Frühe Isolate der Neuraminidasen zeigten

eine strikte Spezifität für Neu5Ac- α 2,3-Gal, solche von 1967-1968 zusätzlich geringe Aktivität gegenüber Neu5Ac- α 2,6-Gal und Neuraminidasen von 1972 an eine vergleichbare Aktivität gegenüber beiden Substraten (Baum and Paulson, 1991). Vermutlich ist der genetische Drift der Neuraminidase mit der Adaptation des Hämagglutinins an Neu5Ac- α 2,6-Gal zu begründen, um eine effizientere Destruktion der Rezeptoren auf der Zelloberfläche infizierter Zellen zu ermöglichen und die Virusfreisetzung zu erleichtern, so Baum und Paulson. Die Erleichterung der Freisetzung neuer Viruspartikel würde wiederum die Infektionseffizienz steigern. Die Anpassung der Neuraminidase an das Hämagglutinin und die gleichzeitige Persistenz beider Spezifitäten könnte somit einen selektiven Vorteil neuer Viruspartikel bieten. Kobasa et al. stellten eine Veränderung der Aminosäuresequenz während des Drifts der Spezifität fest. Mit einer steigenden Spezifität für Neu5Ac- α 2,6-Gal tauschte parallel in Position 275 die Aminosäure Isoleucin zu Valin (Kobasa et al., 1999). Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigten aber die weiterhin vorhandene Präferenz verschiedener Neuraminidasen gegenüber α 2,3-verlinkten Sialinsäureresiduen (França de Barros et al., 2003; Garcia et al., 2014; Onsirakul et al., 2014).

Fasst man die Ergebnisse dieser Arbeit unter Einbeziehung der aufgeführten Quellen zusammen, ist zu vermuten, dass die getesteten Neuraminidasen der Viren H1N1 und H3N2 eine geringe Aktivität bzw. Spezifität gegenüber α 2,6-verknüpften Sialinsäuren besitzen und zudem empfindlich gegenüber einer aliphatischen Verlängerung der *N*-Acylgruppe reagieren. Im Gegenteil dazu waren die Neuraminidasen der Viren H5N1 und H7N7 wesentlich aktiver und zeigten einen höheren Substratumsatz. Darüberhinaus war die Empfindlichkeit gegenüber einer zusätzlichen Methylengruppe der *N*-Acylseitenkette deutlich herabgesetzt und ermöglichte einen hohen Umsatz von Neu5Prop. Der signifikante Aktivitätsunterschied der Viren, die häufiger im Umkreis der Menschen zirkulieren und Infektionen verursachen (H1N1/H3N2) und solcher, deren Übertragung nur selten zu beobachten ist (H7N7/H5N1), könnte vermutlich an der Balance zwischen den Oberflächenglykoproteinen Hämagglutinin und Neuraminidase der Influenza-Viren liegen (Wagner, Matrosovich et al., 2002). Eine starke Bindung neuer Viruspartikel über Hämagglutinin an oberflächlichen Sialinsäuren einer infizierten Zelle benötigt auf der anderen Seite eine aktive Neuraminidase, um eine effiziente Infektion neuer Wirtszellen zu ermöglichen. Andererseits spielt die Neuraminidase auch während der initialen Infektion eine wichtige Rolle. Eine hohe Aktivität könnte dabei helfen, die muzinreiche Schicht der Trachea zu durchdringen und dabei Oligosaccharide, die zu einer Absättigung der Hämagglutinin-Rezeptoren führen könnten, zu spalten. Dafür würde vor allem die bestehende Präferenz gegenüber α 2,3-verlinkten

Sialinsäureresiduen (s.o.) sprechen, denn auch im Mukus kommen vorwiegend Sialinsäuren in dieser Verlinkung vor (Couceiro et al., 1993).

Fortführend wäre es von Interesse, die veränderten Glykokonjugate der A549-Zellen zu isolieren und deren Aufbau genauer zu studieren. Proben mit Glykoproteinen oder -lipiden, die lediglich endständiges Neu5Prop bzw. Neu5But enthalten, könnten nicht nur mit humanen, sondern auch mit isolierten aviären oder porcinen Neuraminidasen getestet werden, um die Spaltbarkeit der Substrate weiter zu differenzieren. Als Referenz würden sich natürliche Substrate in verschiedenen glykosidischen Bindungen anbieten.

5.3 Anreicherung künstlich sialylierter Glykokonjugate

Die Inkubation homogenisierter A549-Zellen mit verschiedenen Neuraminidasen zeigte, dass der Metabolismus und die Inkoorporation künstlicher Sialinsäurevorläufer die enzymatische Reaktion der Neuraminidasen beeinflusste. Gerade die Neuraminidasen der häufiger zirkulierenden humanen Viren H1N1 und H3N2 konnten nur wenig bzw. kein künstliches Substrat umsetzen. Die Ergebnisse stärkten die Idee für einen therapeutischen Ansatz künstlich veränderter Glykokonjugate. In der Vergangenheit wurden Zellen nach Vorbehandlung mit künstlichen Sialinsäurevorläufern (ManNProp, ManNBut, ManNPent), die diese auch in Oberflächenglykokonjugate inkorporierten, virologisch untersucht. Die Elongierung der *N*-Acylseitenkette von Sialinsäuren in oberflächlichen Glykokonjugaten senkte die Infektion vorbehandelter MDCK-II-Zellen gegenüber Influenza-A-Viren (H3N2) (Keppler et al., 1998). Im Gegenteil dazu stieg nach Vorbehandlung von Vero-Zellen mit ManNProp und ManNBut die Infektion durch das Humane Polyomavirus 1 an, während die Zellen nach Behandlung mit ManNPent nahezu resistent reagierten (Keppler et al., 1995). Die therapeutische Anwendung künstlicher Sialinsäurevorläufer gegen das Influenza-A-Virus ist allerdings nur sehr schwer möglich, da Zellen die Vorläufer vorerst inkorporieren müssten, damit diese resistent gegenüber einer Infektion wären. Die zu inhalierende Menge und die Barriere des Mukus, abgesehen von nicht voraussehbaren Nebeneffekten, verhindern einen direkten therapeutischen Ansatz der ManNAc-Analoga. Um zu untersuchen, inwiefern künstlich sialylierte Glykokonjugate als therapeutischer Ansatzpunkt gegen Influenza A die Aktivität der Neuraminidase hemmen und die Replikation des Influenza-A-Virus beeinflussen, war deren Aufarbeitung und Anreicherung notwendig.

Das Probenmaterial für die Aufarbeitung künstlich sialylierter Glykokonjugate wurde aus vorbehandelten A549-Zellen gewonnen (siehe 3.6). Nach dem Lösen der Zellstrukturen

und dem enzymatischen Proteinverdau, konnten die trypsinierten Glykokonjugate aufgenommen werden. Die gewonnenen Glykokonjugate wurden mit einer DNAPac-PA100-Anionenaustauschersäule separiert und angereichert. Mit dem etablierten Laufgradienten konnten die gewünschten Fraktionen isoliert entnommen und von Nebenprodukten getrennt werden. Nach Gefriertrocknung im Lyophilisator und späterer Aufnahme in DPBS, wurden die Proben für virologische Versuche verwendet.

Sialylierte Glykokonjugate, die aus veränderten Oberflächenglykoproteinen gewonnen wurden, mussten von den restlichen Bestandteilen der Zellen getrennt werden, damit deren Wirkung gesondert beobachtet werden konnte. Durch das Lösen der Zellstrukturen und Trennung zwischen Pellet und trypsinierten Glykokonjugaten geht man gerade in den ersten Schritten der Aufarbeitung einen großen Verlust ein. Während CMP-aktivierte oder freie Sialinsäuren schon mit dem Öffnen der Zellstrukturen verloren gehen, verbleiben Glykolipide wie Glykosphingolipide und nicht gespaltene sialylierte Glykoproteine nach dem Zentrifugieren im Zellpellet (siehe 4.3.2). Die verlorenen bzw. verbliebenen Bestandteile konnten nicht aufgefangen werden, da sie die Ergebnisse verfälschen und unerwünschte Nebeneffekte verursachen könnten. Eine differenzierte Aussage über die Wirkung der Glykokonjugate wäre so nicht möglich. Die Auftrennung der verschiedenen Glykokonjugate und weitere Aufreinigung bzw. Anreicherung der Proben durch die verwendete Anionenaustauschersäule war notwendig, um Fraktionen mit möglichst hohem Gehalt künstlicher Sialinsäuren aufzufangen und die Reinheit der Probe zu erhöhen. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass das bisherige Verfahren keine vollständige Reinheit der sialylierten Glykokonjugate erlaubt, wodurch weiterhin ein Anteil an Nebenprodukten erhalten bleibt. Weitere Analysen und Trennverfahren könnten dahingehend eine vollständige Isolation und im Idealfall eine Reinheit von 1 hinsichtlich der jeweiligen Glykokonjugate erreichen.

Von dem ursprünglichen Gesamtgehalt der Sialinsäuren blieben nach den Aufarbeitungsschritten etwa 9-11 % der Stoffmenge in den aufgereinigten Proben für virologische Versuche über. Um den Gewinn zu optimieren, wäre zunächst an eine Isolierung der Glykokonjugate von sialylierten Glykolipiden zu denken, deren virologische Anwendung ebenfalls untersucht werden könnte. Würden sialylierte Glykokonjugate aus gewonnenen Glykoproteinen als auch Glykolipiden zur Anwendung gegen Influenza-A-Viren in Frage kommen, wäre es möglich, die Ausbeute deutlich zu steigern, indem sialylierte Proteine und Lipide der behandelten Zellen enzymatisch aufgereinigt werden.

Es wurden drei Proben zur Anwendung für virologische Versuche aufgearbeitet. Zum einen Glykokonjugate, die lediglich die natürliche Sialinsäure Neu5Ac (Probe 1) enthielten und zwei weitere Proben, die zudem auch aus künstlichen Sialinsäuren

bestanden. Der Anteil an Neu5Prop lag bei 37 % (Probe 2), der Anteil an Neu5But bei 11 % (Probe 3).

5.4 Künstlich sialylierte Glykokonjugate zur Anwendung gegen das Influenza-A-Virus

Um die virologische Anwendung der künstlichen Glykokonjugate beurteilen zu können, wurde der Einfluss auf die Aktivität der Neuraminidase, die Erstinfektion und die multizyklische Replikation des Influenza-A-Virus untersucht. Zum Vergleich wurde das Virostatikum Oseltamivircarboxylat in den Versuchen jeweils in gleicher Konzentration verwendet, während die künstlichen Glykokonjugate den natürlichen Glykokonjugaten gegenübergestellt werden konnten. Die Versuche wurden alle mit dem pandemischen Influenza-A-Virus H1N1 (A/Hamburg/5/09) durchgeführt. H1N1 führte in der Vergangenheit häufiger zu Pandemien und kommt auch beim Menschen vor. Vorausgehende Versuche mit Neuraminidasen zeigten, dass insbesondere H1N1 keine künstlichen aber natürliche Glykokonjugate spaltete. Daher war es von besonderem Interesse die Anwendung der aufgearbeiteten Konjugate an diesem Virus zu testen.

Die Aktivität der Neuraminidase wurde durch alle getesteten Substanzen gesenkt. Im Vergleich zur Kontrolle, führte die Zugabe der Glykokonjugate zu einem eindeutigen Aktivitätsverlust der Neuraminidase. Glykokonjugate, die künstliche Sialinsäuren enthielten, hemmten die Neuraminidase stärker als jene, die lediglich natürliche Sialinsäuren trugen. Nach Inkubation mit Oseltamivircarboxylat wurde keine Aktivität der Neuraminidase gemessen. Die Ergebnisse des Aktivitätstests waren vergleichbar mit denen der Erstinfektion im Zellkulturmodell. Hier wirkte das Virostatikum gegenüber den Glykokonjugaten etwas besser. Im Vergleich zur Kontrolle führten alle Präparate zu einer Senkung der Infektion bzw. des Virustiters. Der Unterschied zwischen natürlichen und künstlichen Präparaten wurde größer. Die Werte zwischen den Glykokonjugaten mit den künstlichen Sialinsäuren Neu5Prop und Neu5But blieben sehr ähnlich, obwohl die Probe mit Neu5But nur 11 % (vgl. Neu5Prop 37 %) künstliche Sialinsäuren in Bezug auf den Gesamtgehalt an Sialinsäuren enthielt. Im Rahmen der multizyklischen Infektion wurden die Präparate erst nach Infektion der Zellen hinzugegeben. Alle verwendeten Präparate führten zu einer Senkung des Virustiters über 72 Stunden. Im Zellversuch erzielten Oseltamivircarboxylat und Glykokonjugate mit natürlichen Sialinsäuren einen vergleichbaren Titer. Konjugate, die neben der natürlichen auch die künstliche Sialinsäure Neu5But enthielten, führten zu einer weiteren Absenkung des Virustiters bei 48 Stunden. Die besten Ergebnisse wurden nach Inkubation mit Glykokonjugaten, die

Neu5Prop enthielten, erzielt. Der gemessene Titer nach 24 und 48 Stunden war hier am niedrigsten. Nach 72 Stunden glichen sich die Werte an, obwohl der Kontrollwert weiterhin den höchsten Virustiter trug. Zwischen 48 und 72 Stunden sinkt in der Regel die Wirkung des Inhibitors oder bleibt konstant. Zum Unterbinden neuer Infektionen unberührter Wirtszellen wäre zu diesem Zeitpunkt eine erneute Applikation des Substrats notwendig, um den Titer weiterhin tief zu halten. Der Versuch der multizyklischen Replikation steht beispielhaft für den Verlauf eines grippalen Infektes. Hier würde die Einnahme des Medikamentes nach Auftreten der Symptome, also nach Infektion, erfolgen.

Keppler et al. untersuchten vorbehandelte MDCK-II-Zellen nach Infektion mit Influenza-A-Viren (Keppler et al., 1998). 18-35 % modifizierte Sialinsäuren mit verlängerter *N*-Acylseitenkette wurden in oberflächliche Glykokonjugate integriert. Das Derivat ManNProp wurde wesentlich besser metabolisiert bzw. inkorporiert als ManNBut. Glykokonjugate der Zelloberfläche trugen 35 % Neu5Prop aber nur 18 % Neu5But. Trotz der höheren Integration von Neu5Prop in Glykokonjugate der Zellen führte die Vorbehandlung der Zellen mit ManNBut zu einer höheren Resistenz gegenüber Influenza-A-Viren. Die Vorbehandlung mit ManNProp reduzierte die Infektion um 60 %, die mit ManNBut um 80 %. Die Gruppe um Keppler vermutete, dass die Verlängerung der *N*-Acylseitenkette ein sterisches Hindernis für den Hämagglutinin-Rezeptor darstellt. Mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen und molekularem Modeling (Insight II modeling software) wurde die Bindungsgrube des Glykoproteins Hämagglutinin visualisiert. Eine weitere Methylengruppe der Aminoacylseiteinkette, wie sie bei Neu5Prop vorkommt, erschien in der Darstellung zu groß und zeigte weg von der Proteinoberfläche. Die errechneten Energiekalkulationen für elongierte Liganden waren gegenüber dem natürlichen Bindungspartner Neu5Ac über 20 kcal/mol höher. Schlussfolgernd wurde von einer reduzierten Bindungsaffinität ausgegangen, die die Bindung des Influenza-A-Virus erschwert und die Infektion neuer Wirtszellen senkt. Allerdings stehen die errechneten Energiekalkulationen im Kontrast zu den von Sauter ermittelten Dissoziationskonstanten (Sauter et al., 1992). Mit Hilfe von nuklearer Magnetresonanzspektroskopie wurde das Bindungsverhalten verschiedener Derivate untersucht und deren Dissoziationskonstanten studiert. Durch Substitution oder Tausch der funktionellen Gruppen konnten sich die 2-Carboxylat-, 5-Azetamido und 8-Hydroxyl-Gruppe als wichtige Interaktionskomponenten in der Bindung zwischen Hämagglutinin und Sialinsäure herauskristallisieren. Einen geringeren Effekt bewirkten längere Kohlenstoffketten der 4-Hydroxylgruppe, die Entfernung der 7-Hydroxylgruppe und der Austausch der Methylgruppe durch eine Ethylgruppe der 5-Azetamidogruppe. Letzteres entspricht dem getesteten Derivat Neu5Prop. Die Dissoziationskonstante zwischen

5-*N*-Propionyl-Neu α 2Me war nahezu identisch mit Neu5Ac α 2Me (Sauter et al., 1992). In der Bindung zwischen Sialinsäure (Neu5Ac) und Hämagglutinin legt sich die Methylgruppe auf den aromatischen Ring Trp-153 des Hämagglutinins (Sauter et al., 1989; Weis et al., 1988). In gemessenen NMR-Spektren mit 5-*N*-Propionyl-Neu α 2Me kam es zu einer großen Hochfeld-Verschiebung der Methylen- und Methyl-Protonen der *N*-Propionyl-Ethyl-Gruppe bei Anwesenheit von Proteinen, was darauf hindeutete, dass auch die Ethylgruppe wie erwartet über dem Indolring (Trp-153) zum Liegen kam (Sauter et al., 1992). Die hydrophobe Wechselwirkung zwischen verlängerter Kohlenstoffkette und Indolring des Hämagglutinins zeigte, dass die Sialinsäure Neu5Prop mit dem viralen Oberflächenglykoprotein interagiert. In einem Influenza-A-Inhibitionstest mit verschiedenen Sialinsäureanaloga wurde ebenfalls die *N*-Acetylgruppe als wichtiger Bindungspartner charakterisiert, dessen hydrophobe Interaktion vermutet wurde (Kelm et al., 1992). Zusammenfassend stellen sich daher die Fragen, ob die zusätzliche Methylengruppe von Neu5Prop die Bindungsaffinität zu dem Hämagglutinin-Rezeptor des Virus so effektiv herabsetzte, dass die Infektion der MDCK-Zellen um 60 % absinken konnte (Keppler et al., 1998), wenn doch die von Sauter beschriebenen Dissoziationskonstanten (5-*N*-Propionyl-Neu α 2Me, Neu5Ac α 2Me) nahezu identisch waren und ob neben dem Hämagglutinin auch die Neuraminidase als Angriffsfläche für die erwähnten Sialinsäureanaloga diene.

Der initiale Infektionsschritt und die multizyklische Replikation im Zellkulturmodell der vorliegenden Arbeit erbrachten einen eindeutigen Unterschied in der Anwendung zwischen natürlichen Glykokonjugaten und solchen, die eine verlängerte *N*-Acylseitenkette trugen. Die Glykokonjugate mit verlängerter *N*-Acylseitenkette senkten in der Einzelzyklus- und multizyklischen Replikation den Virustiter effektiver. Weniger Zellen waren infiziert. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen von Keppler und Sauter (Keppler et al., 1998; Sauter et al., 1992), so liegt die Vermutung nahe, dass die verwendeten Glykokonjugate mit verlängerter Seitenkette auch oder sogar vorwiegend die Funktion der Neuraminidase beeinflussen. Keppler vermutete eine geschwächte Bindungsaffinität zwischen Sialinsäure mit verlängerter *N*-Acylseitenkette und Hämagglutinin, da die Bindungsgrube des Glykoproteins zu klein sei für eine zusätzliche Methylengruppe (Keppler et al., 1998). Sauter hingegen zeigte anhand von nuklearer Magnetresonanzspektroskopie eine fast identische Dissoziationskonstante zwischen 5-*N*-Propionyl-Neu α 2Me und Neu5Ac α 2Me mit Hämagglutinin (Sauter et al., 1992). Wäre die Affinität zwischen Hämagglutinin und Konjugaten mit verlängerter *N*-Acylseitenkette geringer bzw. gleichauf mit der Affinität zwischen Hämagglutinin und natürlichem Substrat, dürften sich in den Ergebnissen dieser Arbeit keine Unterschiede zwischen den getesteten Konjugaten abzeichnen, bzw. müsste sogar eine stärkere

Wirkung der natürlichen Konjugate zu beobachtet sein. In keinem der Versuche konnte eine bessere bzw. vergleichbare Wirkung der natürlichen Konjugate verzeichnet werden. Bemerkenswert ist vor allem, dass durch Zugabe von Glykokonjugaten mit einem Anteil von lediglich 11 % Neu5But der Virustiter der initialen Infektion mit der Probe, die 37 % Neu5Prop enthielt, vergleichbar war. Weiterhin spalteten die Neuraminidasen der Viren H1N1 und H3N2 keine künstlichen Sialinsäuren mit verlängerter *N*-Acylseitenkette von Glykokonjugaten. Zudem wurde eine signifikante Abnahme der Neuraminidaseaktivität nach Inkubation mit Glykokonjugaten registriert, wobei in den virologischen Versuchen immerzu das Virostatikum Oseltamivircarboxylat, ein freigegebener Neuraminidase-Inhibitor, vergleichsweise als Positivkontrolle mitgeführt wurde. Daher ist davon auszugehen, dass neben einer Absättigung der Hämagglutinin-Rezeptoren auf der Virusoberfläche die Aktivität der Neuraminidase durch die Glykokonjugate reduziert wurde. Aber wie kann gerade die initiale Infektion, also der erste Kontakt der Zelle mit dem Virus, durch Hemmung der Neuraminidase beeinflusst werden, wo doch mit dem initialen Replikationsschritt im Allgemeinen das Hämagglutinin verbunden wird?

Um die inhibierende Wirkung der Glykokonjugate während der initialen Infektion zu verstehen, soll hier insbesondere die Funktion der Neuraminidase während dieses Schritts erläutert werden. In der Vergangenheit wurde mit der initialen Infektion des Influenza-A-Virus vor allem das Hämagglutinin verbunden, welches sinnbildlich für den ersten Kontakt des Virus mit der Wirtszelle steht. Der Neuraminidase kam lediglich eine sialinsäurespaltende Funktion zu und wurde in dem initialen Infektionsschritt ausgeblendet. Eine der ersten Beobachtungen, die die Membranfusion unter Einfluss der Neuraminidase darstellte, geht auf das Jahr 1980 zurück (Huang et al., 1980). Huang et al. integrierten virale Glykoproteine in Liposome. Dabei stellte sich heraus, dass beide Proteine, aktiviertes Hämagglutinin und Neuraminidase, unerlässlich für ein Fusionieren der Liposome mit der Zellmembran waren. Ein Fehlen der Neuraminidase und auch Neuraminidaseinhibitoren verhinderten ebenfalls die Fusion. Matrosovich et al. untersuchten die initiale Infektion humaner Luftwegepithelzellen in Gegenwart von Oseltamivircarboxylat (Matrosovich et al., 2004). 7 Stunden nach Virusapplikation waren 20-500fach weniger Zellen infiziert. Die Anwendung des Neuraminidaseinhibitors zeigte, wie wichtig die Neuraminidase während der initialen Infektion ist. Eine mögliche Funktion der Neuraminidase, noch vor Kontakt des Virus mit der Zelle, könnte das Entfernen von Köderrezeptoren auf Muzinen, Zilien oder zellulärer Glykokalix sein, so Matrosovich. Eine Bindung der Köderrezeptoren würde den Viruszugriff auf funktionelle Rezeptoren der Wirtszelle behindern. Ohuchi et al. betrachteten die Bindung von Influenza-A-Viren unter Einfluss der Neuraminidaseinhibitoren Zanamivir und Oseltamivircarboxylat mit

dem Elektronenmikroskop (Ohuchi et al., 2006). Die Anwendung der Präparate hatte keinen Einfluss auf die Virusbindung, führte aber zu einer Beeinträchtigung des Viruseintritts. Ohuchi et al. diskutierten die elektronenmikroskopischen Aufnahmen im Vergleich zwischen Kontrolle und Inhibitor. Zur Bewegung auf der Oberfläche der Zielzellen schien eine aktive Neuraminidase notwendig. Womöglich dient die Neuraminidase als Transfer an der Zelloberfläche zu limitierenden Eintrittspunkten, an denen eine Endozytose möglich ist, wodurch die Infektionseffizienz des Virus gesteigert wird.

Die Beobachtungen von Huang (Huang et al., 1980) und Ohuchi (Ohuchi et al., 2006) konzentrierten sich auf die Endozytose, also die Verbindung zwischen Virus und Wirtszelle und den Einfluss der Neuraminidase auf diesen wichtigen initialen Schritt. Matrosovich (Matrosovich et al., 2004) beleuchtete zudem eine weitere mögliche Funktion, nämlich die Spaltung von Sialinsäuren als Köderrezeptoren, die den initialen Infektionsschritt verhindern könnten. Die Beobachtungen von Matrosovich et al. werden im Folgenden weiterführend diskutiert.

Betrachtet man den humanen Atemweg, der Angriffspunkt für Influenza-A-Viren, finden sich auf der Oberfläche jeder Zelle Oligosaccharide mit terminalen Sialinsäuren, die spezifisch mit Galactose glykosidisch verknüpft sind. Die Gruppe um Shinya untersuchte anhand verschiedener humaner Gewebeproben die oberflächlichen Sialinsäuren des respiratorischen Traktes (Shinya et al., 2006). Epithelzellen der nasalen Mukosa trugen vorwiegend α 2,6-verlinkte Sialinsäuren, wobei auch gelegentlich α 2,3-Verbindungen detektiert wurden. Im paranasalen Sinus, dem Pharynx, der Trachea und den Bronchien trugen epitheliale Zellen hauptsächlich α 2,6-Gal-verknüpfte Sialinsäuren. Aber auch epitheliale Zellen terminaler und respiratorischer Bronchiolen zeigten diese Verlinkung. Neu5Ac- α 2,3-Gal wurde auf nicht-ziliären Bronchialzellen zwischen respiratorischer Bronchiole und Alveolus, sowie auf einigen Alveolarzellen registriert. Weiterhin zeigten die Untersuchungen, dass humane Influenza-Viren, die α 2,6-verlinkte Sialinsäuren bevorzugt erkennen, bronchiale Epithelzellen und Alveolarzellen infizierten. Dagegen infizierten aviäre Viren, die α 2,3-verlinkte Sialinsäuren in der Bindung präferierten, keine bronchialen Epithelzellen aber Alveolarzellen.

Nicht nur die Zellen des respiratorischen Traktes beeinflussen über die Verknüpfung der Sialinsäuren die Infektion verschiedener Influenza-Viren. Auch der sie auskleidende respiratorische Mukus, der über ziliäre Zellen in Richtung Pharynx transportiert wird, dient einer natürlichen Protektion gegenüber fremden Keimen aus der Atemluft. Matrosovich und Klenk erläuterten die Anwendung natürlicher sialinsäuretragender Inhibitoren (Matrosovich and Klenk, 2003). Muzine sind der Hauptbestandteil des

respiratorischen Mukus und werden von Becherzellen und mukösen Zellen submuköser Drüsen produziert (Jeffery and Li, 1997). Die Oligosaccharidketten der Muzine sind reich an Sialinsäuren. Die große Diversität in Struktur und Zusammensetzung bietet Schutz gegen kohlenhydratbindende Mikroorganismen (Lamblin and Roussel, 1993). Cohen et al. untersuchten insbesondere die Interaktion zwischen Neuraminidase und Mukus der Trachea bzw. des Bronchus sowie zwischen Neuraminidase und Muzinen der Speicheldrüsen (Cohen et al., 2013). Das Influenza-A-Virus ging eine direkte Bindung mit Mukus bzw. Muzinen ein und trennte zudem aktiv endständige Sialinsäuren von Muzinen. Humane Muzine der Speicheldrüse, die darunterliegende Zellen bedeckten, konnten in Abhängigkeit der beinhaltenden Sialinsäuren Zellen gegenüber einer Infektion schützen. Die Wirkung erfuhr eine Steigerung bei Hemmung der Neuraminidase mit Oseltamivir. Humane Muzine der Speicheldrüse zeigten in Aktivitätsassays der Neuraminidase eine kompetitive Inhibition. Diese Untersuchungen deuteten eine besondere Funktion der Neuraminidase während der initialen Infektion, nämlich die Spaltung sialylierter Muzine, um die Infektion des Virus trotz vorhandener Mukus-Schutzschicht zu gewährleisten.

Couceiro et al. analysierten die Oberflächensialylierung humaner Trachea und registrierten eine Prädominanz α 2,6-verlinkter Sialinsäuren auf zilientrager Zellen, wohingegen Muzine vorwiegend α 2,3-verlinkte Sialinsäuren trugen (Couceiro et al., 1993). Das verwendete humane Influenza-A-Virus (H3N2), dessen Hämagglutinin-Rezeptor vorwiegend α 2,6-Verbindungen erkennt, ging eine feste Bindung mit dem Epithel der humanen Trachea ein, während die Variation des Virus mit Präferenz für α 2,3-Verbindungen nur eine geringe Bindungsprävalenz zum Epithel besaß und im Bereich intrazellulären Muzingranula lokalisiert war. Die Anwendung humaner Bronchial-Muzine stellte sich als potenter Virusinhibitor gegenüber der Bindung der Virusvariante zu trachealem Epithel dar, hatte aber keinen Einfluss auf die Bindung des parentalen Virus. Die Autoren vermuteten, dass bedingt durch die Sia- α 2,6-Gal Rezeptoren auf den Epithelzellen und inhibierende Sia- α 2,3-Gal verknüpfte Muzine, ein Selektionsdruck hin zu einer α 2,6-Prävalenz für humane Influenza-A-Viren besteht bzw. bestand.

Die verschiedenen Studien demonstrieren die natürliche Schutzfunktion sialylierter Glykokonjugate im Mukus, die eine natürliche Abwehrbarriere gegenüber Influenza-A-Viren übernehmen. Glykokonjugate, deren Sialinsäuren vorwiegend Sia- α 2,6-Gal verlinkt sind, könnten die protektive Wirkung des Mukus gegenüber einer Erstinfektion oder fortschreitenden Infektion des humanen Influenza-A-Virus verstärken. Neben den natürlichen Oligosacchariden im Mukus, die vorwiegend α 2,3-verlinkte Sialinsäuren tragen (Couceiro et al., 1993), würden α 2,6-verlinkte Strukturanaloga zusätzlich Schutz gegenüber den häufig zirkulierenden humanen Influenza-A-Viren bieten.

Die in dieser Arbeit hergestellten künstlich sialylierten Glykokonjugate senkten die Aktivität der Neuraminidase. Die getesteten Neuraminidasen konnten zudem die künstlichen Substrate schlechter umsetzen als das natürliche Substrat. Aller Wahrscheinlichkeit nach sind die endständigen Sialinsäuren α 2,6-verlinkt, was aus Versuchen im Zusammenhang mit der Oberflächensialylierung von A549-Zellen hervorging (Sauer et al., 2014). Neben den künstlichen Glykokonjugaten kamen auch natürliche Glykokonjugate in den getesteten Proben vor. Es ist davon auszugehen, dass neben einer Inhibition der viralen Neuraminidase auch die oberflächlichen sialinsäurebindenden Hämagglutinin-Moleküle humaner Influenza-Viren, die bevorzugt α 2,6-verlinkte Rezeptoren der Wirtszellen erkennen, abgesättigt werden. Die Wirkung der hergestellten künstlichen Konjugate erzielte im Rahmen der multizyklischen Replikation bessere Ergebnisse als der verwendete Neuraminidaseinhibitor Oseltamivircarboxylat. Insgesamt wird somit eine inhibierende Wirkung gegen die Neuraminidase und das Hämagglutinin des getesteten Virusstamms vermutet.

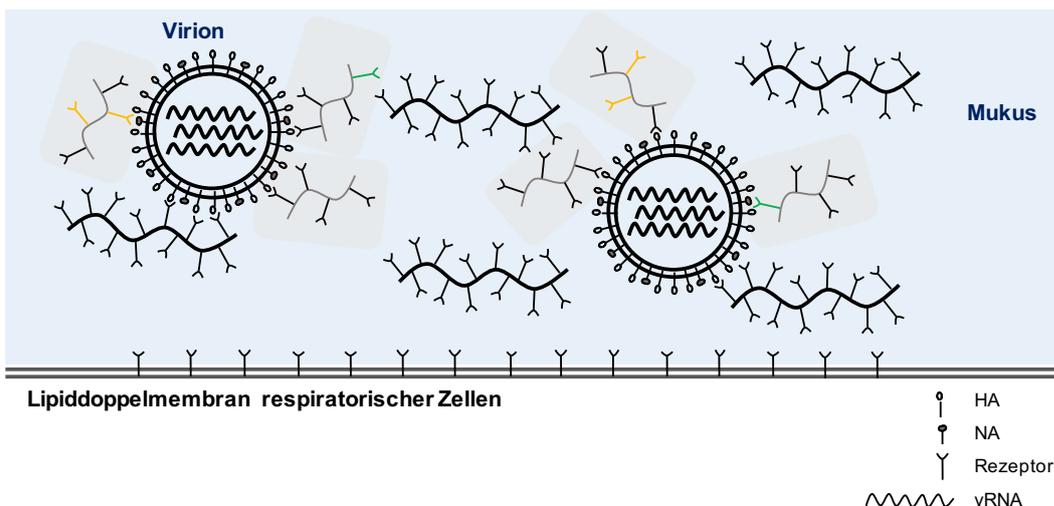


Abbildung 5.1 Wirkungsweise hergestellter Glykokonjugate

Schematische Darstellung der Wirkungsweise hergestellter Glykokonjugate. Die Rezeptoren entsprechen Neu5Ac (schwarz), Neu5Prop (orange) und Neu5But (grün). Sialinsäure tragende Muzine (langkettig, schwarzes Gerüst) binden protektiv oberflächliche Glykoproteine (Hämagglutinin) des Influenza-Virus und verhindern den direkten Kontakt mit Zellen des Atemweges. Die hergestellten sialylierten Glykokonjugate (kurzes graues Gerüst) sollen die protektive Wirkung des Mucus verstärken. Die bedingt-spaltbaren Substrate Neu5Prop (orange) und Neu5But (grün) senken vor allem die Aktivität der Neuraminidase. Gleichzeitig können die natürlichen Substrate (Neu5Ac, schwarz) als auch die künstlichen (Neu5Prop, Neu5But) die Hämagglutinin-Bindestellen besetzen. HA, Hämagglutinin; NA, Neuraminidase.

Abbildung 5.1 veranschaulicht die Wirkungsweise der Glykokonjugate, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Anwendung gegen Influenza-A-Viren hergestellt wurden. Es wird beispielhaft die mögliche Wirkung im Mucus des respiratorischen Epithels

dargestellt, also dem Ort, an dem das Influenza-A-Virus in der Regel den humanen Wirt infiziert. Neben den bereits vorhandenen, sialinsäuretragenden Muzinen (α 2,3-verlinkt), könnte die Anwesenheit künstlich sialylierter Glykokonjugate (α 2,6-verlinkt) die natürliche Abwehrfunktion des Körpers unterstützen. Während die Hämagglutinin-Bindestellen des Virus zusätzlich durch Neu5Ac, Neu5Prop oder Neu5But der künstlichen Konjugate vorübergehend besetzt werden können, sind es die beiden künstlichen Analoga Neu5Prop und Neu5But, die die Aktivität der Neuraminidase entscheidend einschränken würden. Eine Absättigung oberflächlicher Hämagglutinin-Rezeptoren, die vor allem α 2,6-verlinkte Bindungspartner präferieren und die Herabsenkung der Neuraminidase-Aktivität mit einem nicht-spaltbaren Substratanaloga könnten die Infektion des Virus *in vivo* verhindern. Zusammenfassend kann man sich die Wirkung wie folgt vorstellen: Ein Präparat, das ergänzend zu den Köderrezeptoren der Muzine wirkt und zudem die Aktivität der Neuraminidase einschränkt. Im initialen Schritt werden die Bindung zur Wirtszelle erschwert und die enzymatische Aktivität der Neuraminidase eingeschränkt. Das Befreien von Köderrezeptoren und die Endozytose bzw. der Transfer der Viren zu Eintrittsstellen werden verhindert. Weiterhin könnten die Präparate das Loslösen von bereits infizierten Wirtszellen verhindern und eine weitere Infektion neuer Zielzellen unterbinden.

Die Anwendung dieser künstlichen Glykokonjugate könnte über den Atemweg erfolgen, sodass sich die inhalierten Substrate auf dem Mukus ablegen. Neben einer prophylaktischen Anwendung, um einer Erstinfektion vorzubeugen, könnte das Spray ebenfalls nach Erstinfektion eingenommen werden, um eine weitere Ausbreitung zu vermeiden. Im Zellkulturmodell wurden unter Anwendung der hergestellten künstlichen Glykokonjugate beide Varianten demonstriert. Es bedarf weiterer Versuche, auch *in vivo*, um die mögliche Anwendung und Wirkung der künstlichen Glykokonjugate als potentielle Influenza-Inhibitoren weiter zu testen. Es sollen hier abschließend einige Gedanken aufgeführt werden, die darauf abzielen, die Wirkungsweise der Konjugate genauer zu untersuchen und deren Effekt zu optimieren.

Shen et al. diskutierten in einem Übersichtsartikel neue Influenza-A-Virus Inhibitoren auf der Basis des Hämagglutinins und verwiesen unter anderem auf kleine Inhibitoren, deren Struktur der Sialinsäure entsprechen (Shen et al., 2013). Da das Virus eine Vielzahl von HA-Glykoproteinen auf der Oberfläche trägt und eine multivalente Bindung zu den Rezeptoren der Wirtszellen eingeht, könnte die Wirkung monovalenter Sialinsäureanaloga durch eine polyvalente Präsenz gesteigert werden. Sun beschrieb, dass neben der Verlinkung auch der an die Sialinsäure anschließende Zucker (Galactose) sowie die Grundstruktur der sialylierten Oligosaccharide ausschlaggebend

für die Bindung des Virus und somit für die Inhibition seien (Sun, 2007). Getestete polyvalente sialylierte Oligosaccharide auf Makromolekülen konnten in der Vergangenheit gute Ergebnisse erzielen. Daher rückt die Entwicklung multivalenter sialylierter Oligosaccharide immer stärker in den Vordergrund. Ferner wird darauf hingewiesen, dass α 2,6-verlinkte Sialinsäurerezeptoren für die Mensch-zu-Mensch Übertragung unverzichtbar für eine effiziente Replikation des Virus seien und gerade deshalb multivalente α 2,6-verlinkte sialylierte Oligosaccharide eine effektive Wirkung gegen das Influenza-A-Virus erzielen könnten. Um die Wirkung weiter zu steigern, könnten, wie in den zusammenfassenden Arbeiten von Shen et al. und Sun (Shen et al., 2013; Sun, 2007) diskutiert, die Glykokonjugate an eine aktive Oberfläche gekoppelt werden, damit eine polyvalente Interaktion mit den Viruspartikeln entstehen und die inhibierende Wirkung gegenüber der Neuraminidase bzw. des Hämagglutinins weiter gesteigert werden könnte.

Eine andere Überlegung zur Steigerung der Wirkungseffektivität könnte auf einer Anhebung des prozentualen Anteils künstlicher Glykokonjugate in den Proben beruhen. Die vielversprechende Wirkung der Butylgruppe, die lediglich 11 % der sialylierten Glykokonjugate in den O-Ac₄-ManNBut-behandelten Proben trugen, könnte besonders den inhibitorischen Effekt gegenüber dem Virus verbessern. Die Inkubation der Zellen mit einer erhöhten Konzentration des Vorläufers O-Ac₄-ManNProp führte zu einer Steigerung der relativen Verteilung hin zu Neu5Prop (siehe 4.1.4). Damit der Verbrauch der künstlichen Vorläufermoleküle während der Inkubation der Zellen gering bleibt, müsste sich die Zellpermeabilität der Substrate erhöhen, um das Substratangebot im Zytoplasma zu steigern. Dadurch könnte auch bei geringer Substratkonzentration effektiv daran gearbeitet werden, den relativen Anteil der künstlichen Glykokonjugate weiter zu verbessern. Die Beobachtungen von Kim et al. zeigten gerade bei geringen Konzentrationen nach Verlängerung der Kohlenstoffkette an Hydroxylgruppen der Esterderivate eine signifikante Steigerung des Sialinsäurestoffwechsels (Kim EJ et al., 2004). Neben der, wie in dieser Arbeit, vorgenommenen Modifikation durch Veränderung von Inkubationszeit sowie von Konzentration der Substrate und des FBS im Kulturmedium, könnte der relative Sialinsäuregehalt nach Propylierung bzw. Butylierung bestimmt werden. Dadurch wäre nicht nur an eine Steigerung des relativen Anteils künstlicher Glykokonjugate zu denken, sondern gleichzeitig an eine Einsparung der verwendeten Vorläufermoleküle mit dem Ziel, das vorliegende Protokoll (siehe 3.3.4, 4.1) weiter zu verbessern. Daraufhin wären virologische Versuche mit Proben, die sich in ihrem prozentualen Anteil an künstlichen Derivaten unterscheiden, von besonderem Interesse.

Weiterhin sollte in Bindungsassays die Affinität bzw. Dissoziationskonstante der hergestellten Derivate für verschiedene virale Hämagglutinin-Moleküle verglichen werden. Auch wenn bereits andere Arbeitsgruppen die Affinität von Neu5Prop zu Hämagglutinin untersuchten und diskutierten (Keppler et al., 1998; Sauter et al., 1992) (s.o.), bleibt die Frage offen, ob der geringe Anteil an Neu5But in den hergestellten Konjugaten ausreichte, um die Neuraminidase des Virus so stark zu inhibieren oder ob die hydrophobe Seitenkette von Neu5But eine verstärkte Affinität gegenüber Hämagglutinin besitzt und damit inhibierend wirkt. Daher wäre ein Vergleich der sialylierten Glykokonjugate notwendig, um die Auswirkung der verlängerten *N*-Acylseitenkette zu untersuchen und die Wirkung der künstlichen Glykokonjugate in Bezug auf das Influenza-A-Virus weiter zu erforschen.

Betrachtet man die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit, stellen die künstlich sialylierten Glykokonjugate durchaus eine gute Möglichkeit dar, die Replikation des Influenza-A-Virus zu inhibieren. Weitere Analysen und mögliche Optimierungsvorschläge, wie sie in diesem Kapitel aufgeführt sind, könnten eine genauere Differenzierung des Wirkungsmechanismus erlauben und die Effizienz der Wirkstoffe verbessern.

6 Zusammenfassung

Auf der Zelloberfläche modulieren Sialinsäuren Zell-Zell- und Zell-Molekül-Interaktionen. In der endständigen Position oberflächlicher Glykoproteine und Glykolipide nehmen Sialinsäuren im Rahmen des viralen Replikationszyklus eine Schlüsselrolle ein. Die Substratpermissivität verschiedener Enzyme in der Sialinsäurebiosynthese erlaubt die chemische Veränderung sialinsäuretragender Glykokonjugate. Ziel dieser Arbeit war es, künstlich sialylierte Glykokonjugate anzureichern und diese als potentielle Virostatika zu untersuchen. Die hergestellten peracetylierten ManNAc-Analoga, OAc₄-ManNProp und OAc₄-ManNBut, dienten der Inkubation von A549-Zellen, wobei es möglich war, bis zu 72 % der natürlichen Sialinsäuren durch künstlich veränderte zu ersetzen. Es wurde unter verschiedenen Parametern ein Protokoll entwickelt, das gestattet, etwa die Hälfte der Sialinsäuren durch künstliche zu ersetzen und dabei gleichzeitig ermöglicht, eine erhebliche Stoffmenge an Sialinsäuren für weitere Versuche zu synthetisieren. Getestete Neuraminidasen verschiedener Influenza-A-Viren spalteten die natürlichen Sialinsäuren von A549-Zellsuspensionen, hatten aber deutliche Schwierigkeiten in der Umsetzung der künstlichen Konjugate mit Neu5Prop und Neu5But. Um eine mögliche inhibierende Wirkung der modifizierten Glykokonjugate gegenüber dem Influenza-A-Virus zu studieren, wurde weiterführend ein Protokoll entwickelt, das der Anreicherung der künstlich veränderten sialylierten Glykokonjugate mittels Anionenaustauschersäule diente. Die hergestellten Glykokonjugate zeigten in allen virologischen Versuchen einen inhibitorischen Effekt gegenüber dem Influenza-A-Virus. Dabei war der Effekt der künstlichen Glykokonjugate, die natürliche sowie künstliche Sialinsäuren enthielten, gegenüber den natürlichen Glykokonjugaten in allen Versuchsreihen stärker ausgeprägt. Die Aktivität der Neuraminidase wurde durch alle Präparate gesenkt. Zudem reduzierten die Präparate in den Versuchen der Einzelzyklus- und Multizyklus-Replikation des Influenza-A-Virus die Infektion von MDCK-Zellen bzw. Calu-3-Zellen. In den Versuchen der multizyklischen Replikation konnte das Präparat mit der künstlichen Sialinsäure Neu5Prop im Vergleich zu Oseltamivircarboxylat und den anderen getesteten Substanzen die beste Wirkung erzielen. Die gewonnenen Daten zeigen, dass die Verlängerung der N-Acylseitenkette an Sialinsäuren von Glykokonjugaten erheblichen Einfluss auf das Influenza-A-Virus hat und eine Steigerung des inhibitorischen Effekts der Konjugate bewirkt. Neben einer inhibierenden Wirkung gegenüber der Neuraminidase, ist auch eine Blockade der Hämagglutinin-Bindestellen wahrscheinlich.

7 Summary

Sialic acids modulate cell-cell and cell-molecule interactions on the cell surface. On the terminal position of oligosaccharide chains on superficial glycoproteins and glycolipids, sialic acids play a key role in the viral replication cycle. The substrate permissivity of various enzymes in sialic acid biosynthesis enables chemical modification of glycoconjugates carrying sialic acids. The aim of this study was to enrich artificially sialylated glycoconjugates and to investigate them as potential antivirals. The peracetylated ManNAc analogs, OAc₄-ManNProp and OAc₄-ManNBut, were applied to A549 cells, which enabled replacement of up to 72 % of the natural sialic acids with artificially modified ones. Using various parameters, I developed a protocol allowing the exchange of approximately 50 % of all sialic acids with artificial sialic acid residues. Simultaneously, it thereby provides the opportunity to synthesise a considerable amount of sialic acids for further experiments. While tested neuraminidases of various influenza A viruses cleaved the natural sialic acids of A549 cell suspensions, they showed reduced capacities to release Neu5Prop and Neu5But residues. In order to study a possible inhibitory effect of the modified glycoconjugates against the influenza A virus in more detail, a protocol was developed, which allowed an enrichment of artificially modified sialylated glycoconjugates using an anion exchange column. The produced glycoconjugates showed an inhibitory effect against the influenza A virus in all virological experiments. The effect of the artificial glycoconjugates, which contained both natural and artificial sialic acids, was superior to the natural glycoconjugates in all experiments. The neuraminidase activity was reduced by all substances. In addition, in the single cycle and multicycle influenza A virus replication studies, the substances showed reduced infection of MDCK cells and Calu-3 cells, respectively. In experiments of multicycle virus replication, the preparation containing artificial sialic acid Neu5Prop showed the best effect in comparison with oseltamivir carboxylate and the other substances tested. The data suggest that the extension of the N-acyl side chain in sialic acid residues of glycoconjugates has an impact on the influenza A virus and increases the inhibitory effect of the applied glycoconjugates. In addition to its inhibitory properties on neuraminidase, a blockade of haemagglutinin binding sites is likely.

8 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
Ala	Alanin
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CMAS	Cytidin-Monophosphat-Neu5Ac-Synthetase
CMP	Cytidin-Monophosphat
cRNA	Complementary RNA
CTP	Cytidin-Triphosphat
DANA	Neu5Ac2en; 2-Deoxy-2,3-dehydro- <i>N</i> -acetylneuraminic acid
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMB	1,2-Diamino-4,5-Methylenedioxybenzol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylene-Diamine-Tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Elektronenspray-Ionisations-Massenspektromie
ESI-MS/MS	Elektronenspray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie
FBS	Fetal Bovine Serum
Gal	Galactose
GBP	Glykan-bindendes-Protein
GG167	4-guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro- <i>N</i> -acetylneuraminic acid; 4-guanidino-Neu5Ac2en; Zanamivir
GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-Glucosamin
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
GNE	UDP-GlcNAc-2-Epimerase

GNP/MNK	UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase
GPI-Anker	Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anker
GS-4071	(3R,4R,5S)-4-acetamido-5-amino-3-pentan-3-yloxycyclohexene-1-carboxylic acid; Oseltamivir carboxylate
GS-4104	Ethyl (3R,4R,5S)-4-acetamido-5-amino-3-pentan-3-yloxycyclohexene-1-carboxylate; Oseltamivir
HA	Hämagglutinin
His	Histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
Ile	Isoleucin
KCl	Kaliumchlorid
KDN	2-Keto-3-Deoxy-D-Glycero-D-Galactonsäure
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Lys	Lysin
M1	Matrixprotein 1
M2	Matrixprotein 2
MAA	<i>Maackia amurensis</i> agglutinin
Man-6-P	Mannose-6-Phosphat
ManNAc	2-N-Acetyl-Mannosamin
ManNBut	2-N-Butyl-Mannosamin
ManNPent	2-N-Pentyl-Mannosamin
ManNProp	2-N-Propionyl-Mannosamin
MDCK	Mardin-Darby Canine Kidney
MEM	Modified Eagle's Medium
MeOH	Methanol
MGE	Metabolisches Glykoengineering
MNK	ManNAc-Kinase
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	Messenger RNA
MUNANA	2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-Acetyl-Neuraminsäure
N	Stickstoff
NA	Neuraminidase
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NANS	Neu5Ac-9-P-Synthase
NANP	Neu5Ac-9-P-Phosphatase

NaOH	Natriumhydroxid
NEP	Nuclear Export Protein
NEU	Neuraminidase
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5But	<i>N</i> -Butylneuraminsäure
Neu5Gc	<i>N</i> -Glykolyneuraminsäure
Neu5Prop	<i>N</i> -Propionylneuraminsäure
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NP	Nukleoprotein
NS2	Nichtstrukturprotein 2
OH	Hydroxyl
O-Ac ₄ -ManNAc	1,3,4,6- <i>O</i> -Tetraacetyl-2- <i>N</i> -Acetyl-Glucosamin
O-Ac ₄ -ManNBut	1,3,4,6- <i>O</i> -Tetraacetyl-2- <i>N</i> -Butyl-Glucosamin
O-Ac ₄ -ManNProp	1,3,4,6- <i>O</i> -Tetraacetyl-2- <i>N</i> -Propionyl-Glucosamin
O-But ₄ -ManNBut	1,3,4,6- <i>O</i> -Tetrabutyl-2- <i>N</i> -Butyl-Glucosamin
O-Prop ₄ -ManNProp	1,3,4,6- <i>O</i> -Tetrapropionyl-2- <i>N</i> -Propionyl-Glucosamin
PA	Saures Polymeraseprotein
PB1	Basisches Polymeraseprotein 1
PB2	Basisches Polymeraseprotein 2
PBS	Phosphate Buffered Saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS _{def}	Phosphate Buffered Saline Deficient
PEP	Phosphoenolpyruvat
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R ²	Abweichungskoeffizient
RFU	Relative Fluorescence Unit, relative Fluoreszenzeinheit
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein-Komplex
RP	Reversed Phase
RP-HPLC	Reversed Phase – High Performance Liquid Chromatography
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Sia	Sialinsäure
Siglecs	Sialic acid-binding immunoglobuline type-lectins
Ser	Serin
SNA	<i>Sambucus nigra</i> agglutinin
TBS	Tris Buffered Saline
TFA	Trifluoroacetic acid

TPCK	Tosyl Phenylalanyl Chloromethyl Keton
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UDP-GlcNAc	UDP- <i>N</i> -Acetyl-Glucosamin
UV	Ultraviolett
Val	Valin
vRNA	Virale RNA
vRNP	Viraler Ribunukleoprotein-Komplex

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Strukturelle Darstellung der Sialinsäuren	1
Abbildung 1.2	Sialinsäurebiosynthese.....	5
Abbildung 1.3	Übersicht - Metabolisches Glykoengineering der Sialinsäuren	9
Abbildung 1.4	Katalytischer Reaktionsmechanismus der Neuraminidase	15
Abbildung 1.5	Infektionszyklus des Influenza-Virus	17
Abbildung 3.1	Inkubation mit/ohne peracetylierte/n ManNAc-Analoga	32
Abbildung 3.2	HPLC	34
Abbildung 3.3	Kalibrierungsgerade der Standards.....	36
Abbildung 3.4	Übersicht zur Inkubation mit Neuraminidasen.....	37
Abbildung 3.5	Übersicht der Kontrolle	38
Abbildung 3.6	Beispielhafte Darstellung der relativen Zusammensetzung freier Sialinsäuren der Kontrolle im Vergleich zur enzymbehandelten Probe.....	39
Abbildung 4.1	RP-HPLC unbehandelter homogenisierter A549-Zellen.....	47
Abbildung 4.2	RP-HPLC homogenisierter A549-Zellen nach Behandlung mit peracetylierten <i>N</i> -Acetyl-Mannosaminanaloga	48
Abbildung 4.3	Wachstum von A549-Zellen unter verschiedenen Medienzusätzen.	49
Abbildung 4.4	RP-HPLC homogenisierter A549-Zellen nach Inkubation mit peracetyliertem ManNProp.....	50
Abbildung 4.5	Inkubation mit <i>O</i> -Ac ₄ -ManNProp bei unterschiedlichen Nährstoffzusätzen.....	51
Abbildung 4.6	Übersicht des Metabolismus von <i>O</i> -Ac ₄ -ManNProp in A549-Zellen	52
Abbildung 4.7	Zwei Protokolle im Vergleich – 1 Kulturschale	54
Abbildung 4.8	Zwei Protokolle im Vergleich – gesamter Gewinn	54
Abbildung 4.9	Zwei Protokolle im Vergleich – relativer Anteil der artifiziellen Sialinsäuren.....	55
Abbildung 4.10	RP-HPLC unbehandelter homogenisierter Zellen nach Inkubation mit der Neuraminidase H1N1	57
Abbildung 4.11	RP-HPLC <i>O</i> -Ac ₄ -ManNProp-behandelter homogenisierter Zellen nach Inkubation mit der Neuraminidase H1N1	57
Abbildung 4.12	RP-HPLC <i>O</i> -Ac ₄ -ManNBut-behandelter homogenisierter Zellen nach Inkubation mit der Neuraminidase H1N1	58
Abbildung 4.13	Influenza-A-H1N1-Neuraminidase (A/California/04/2009).....	59

Abbildung 4.14	Influenza-A-H3N2-Neuraminidase (N294S mutation) (A/Babol/36/2005).....	60
Abbildung 4.15	Influenza-A-H5N1-Neuraminidase (A/Anhui/1/2005).....	61
Abbildung 4.16	Influenza-A-H7N7-Neuraminidase (A/Netherlands/219/03)	62
Abbildung 4.17	Alter Gradient, Anionenaustauschersäule	64
Abbildung 4.18	Etablierter Gradient, Anionenaustauschersäule	65
Abbildung 4.19	Stoffmengenverlust im Zuge der Aufarbeitung	66
Abbildung 4.20	Proben für virologische Versuche.....	67
Abbildung 4.21	Neuraminidase-Aktivitätstest	68
Abbildung 4.22	Lichtmikroskopische Aufnahmen von MDCK(H)-Zellen nach TrueBlue™-Färbung	69
Abbildung 4.23	Einfluss der sialylierten Glykokonjugate auf die Erstinfektion	70
Abbildung 4.24	Virustiter unter Einfluss sialylierter Glykokonjugate.....	71
Abbildung 5.1	Wirkungsweise hergestellter Glykokonjugate	89

10 Literaturverzeichnis

- Air GM, Laver WG. (1989). The neuraminidase of influenza virus. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 6(4): 341–356.
- Aminoff D. (1959). The determination of free sialic acid in the presence of the bound compound. *Virology*, 7(3): 355–357.
- Angata T, Varki A. (2002). Chemical diversity in the sialic acids and related α -keto acids: an evolutionary perspective. *Chemical Reviews*, 102(2): 439–469.
- Assaad FA, Brès P, Chi-Ming C, Dowdle WR, Kendal AP, Kilbourne ED, Kit LS, Milouchine V, Nejmi S, Noble G, Oya A, Palese P, Schild CC, Scholtissek G, Skehel JJ, Webster RG, Yakhno M. (1980). A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bulletin of the World Health Organization*, 58(4): 585–591.
- Baltimore D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews*, 35(3): 235–241.
- Baum LG, Paulson JC. (1991). The N2 neuraminidase of human influenza virus has acquired a substrate specificity complementary to the hemagglutinin receptor specificity. *Virology*, 180(1): 10–15.
- Bayer NB. (2016). Etablierung eines standardisierten Protokolls für die Synthese von peracetylierten N-Acyl-Mannosamin-Derivaten als artifizielle Sialinsäurevorläufermoleküle und ihr Einfluss auf das angioproliferative Potenzial von humanen umbilicalen Endothelzellen [Dissertation]. Gießen: Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität.
- Bayer NB, Schubert U, Sentürk Z, Rudloff S, Frank S, Hausmann H, Geyer H, Geyer R, Preissner KT, Galuska SP. (2013). Artificial and natural sialic acid precursors influence the angiogenic capacity of human umbilical vein endothelial cells. *Molecules*, 18(3): 2571–2586.
- Bouvier NM, Palese P. (2008). The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 26(4): 49–53.
- Braam J, Ulmanen I, Krug RM. (1983). Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. *Cell*, 34(2): 609–618.
- Brewer CF, Miceli MC, Baum LG. (2002). Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(5): 616–623.

- Bullough PA, Hughson FM, Treharne AC, Ruigrok RWH, Skehel JJ, Wiley DC. (1994). Crystals of a fragment of influenza haemagglutinin in the low pH induced conformation. *Journal of Molecular Biology*, 236(4): 1262–1265.
- Cabezas JA, Calvo P, Eid P, Martin J, Perez N, Reglero A, Hannoun C. (1980). Neuraminidase from influenza virus A (H3N2). Specificity towards several substrates and procedure of activity determination. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 616(2): 228–238.
- Cohen M, Varki A. (2010). The sialome—far more than the sum of its parts. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 14(4): 455–464.
- Cohen M, Zhang X-Q, Senaati HP, Chen H-W, Varki NM, Schooley RT, Gagneux P. (2013). Influenza A penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase. *Virology Journal*, 10(1): 321.
- Comb GD, Roseman S. (1960). The sialic acids - the structure and enzymatic synthesis of N-acetylneuraminic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 235(9): 2529–2537.
- Conradt H, Bünsch A, Brossmer R. (1984). Preparation of 9-fluoro-9-deoxy-N-[2-¹⁴C]acetylneuraminic acid: activation and transfer onto asialo- α_1 -acid glycoprotein. *FEBS Letters*, 170(2): 295–300.
- Couceiro JNSS, Paulson JC, Baum LG. (1993). Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Research*, 29(2): 155–165.
- Davies WL, Grunert RR, Haff RF, McGahen JW, Neumayer EM, Paulshock M, Watts JC, Wood TR, Hermann EC, Hoffmann CE. (1964). Antiviral activity of 1-adamantanamine (amantadine). *Science*, 144(3620): 862–863.
- De Clercq E. (2006). Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5(12): 1015–1025.
- De Groot RJ. (2006). Structure, function and evolution of the hemagglutinin-esterase proteins of corona- and toroviruses. *Glycoconjugate Journal*, 23(1–2): 59–72.
- Doms RW, Lamb RA, Rose JK, Helenius A. (1993). Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology*, 193(2): 545-562.
- Du J, Meledeo MA, Wang Z, Khanna HS, Paruchuri VDP, Yarema KJ. (2009). Metabolic glycoengineering: sialic acid and beyond. *Glycobiology*, 19(12): 1382–1401.
- Du J, Almaraz RT, Tan E, Yarema KJ. (2013). Metabolic glycoengineering of sialic acids. In: Tiralongo J and Martinez-Duncker I, Eds. *Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function. Sialic Acid Glycoconjugates in Health and Disease* [eBook]. USA: Bentham Science Publishers, 476-511.

- Duesberg PH. (1968). The RNA's of influenza virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 59(3): 930–937.
- Duff KC, Ashley RH. (1992). The transmembrane domain of influenza A M2 protein forms amantadine-sensitive proton channels in planar lipid bilayers. *Virology*, 190(1): 485–489.
- Eckhardt M, Mühlenhoff M, Bethe A, Gerardy-Schahn R. (1996). Expression cloning of the golgi CMP-sialic acid transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15): 7572–7576.
- Effertz K, Hinderlich S, Reutter W. (1999). Selective loss of either the epimerase or kinase activity of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase due to site-directed mutagenesis based on sequence alignments. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(40): 28771–28778.
- Eisfeld AJ, Neumann G, Kawaoka Y. (2015). At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins. *Nature Reviews. Microbiology.*, 13(1): 28–41.
- Fontana J, Cardone G, Heymann JB, Winkler DC, Steven AC. (2012). Structural changes in influenza virus at low pH characterized by cryo-electron tomography. *Journal of Virology*, 86(6): 2919–2929.
- França de Barros J Jr, Sales Alviano D, Da Silva MH, Dutra Wigg M, Sales Alviano C, Schauer R, Dos Santos Silva Couceiro JN. (2003). Characterization of sialidase from an influenza A (H3N2) virus strain: kinetic parameters and substrate specificity. *Intervirology*, 46(4): 199–206.
- Galuska SP, Geyer R, Mühlenhoff M, Geyer H. (2007). Characterization of oligo- and polysialic acids by MALDI-TOF-MS. *Analytical Chemistry*, 79(18): 7161–7169.
- Galuska SP, Geyer H, Weinhold B, Kontou M, Röhrich RC, Bernard U, Gerardy-Schahn R, Reutter W, Münster-Kühnel A, Geyer R. (2010). Quantification of nucleotide-activated sialic acids by a combination of reduction and fluorescent labeling. *Analytical Chemistry*, 82(11): 4591–4598.
- Gamblin SJ, Skehel JJ. (2010). Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 285(37): 28403–28409.
- Garcia J-M, Lai JCC, Haselhorst T, Choy KT, Yen H-L, Peiris JSM, von Itzstein M, Nicholls JM. (2014). Investigation of the binding and cleavage characteristics of N1 neuraminidases from avian, seasonal, and pandemic influenza viruses using saturation transfer difference nuclear magnetic resonance. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 8(2): 235–242.
- Ghosh S, Roseman S. (1961). Enzymatic phosphorylation of N-acetyl-D-mannosamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47: 955–958.

- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5): 1417–1423.
- Gnanapragassam VS, Bork K, Galuska CE, Galuska SP, Glanz D, Nagasundaram M, Bache M, Vordermark D, Kohla G, Kannicht C, Schauer R, Horstkorte R. (2014). Sialic acid metabolic engineering: a potential strategy for the neuroblastoma therapy. *PLoS One*, 9(8): e105403.
- Gómez-Puertas P, Albo C, Pérez-Pastrana E, Vivo A, Portela A. (2000). Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *Journal of Virology*, 74(24): 11538–11547.
- Goon S, Schilling B, Tullius MV, Gibson BW, Bertozzi CR. (2003). Metabolic incorporation of unnatural sialic acids into Haemophilus ducreyi lipooligosaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(6): 3089–3094.
- Gregoriades A, Frangione B. (1981). Insertion of influenza M protein into the viral lipid bilayer and localization of site of insertion. *Journal of Virology*, 40(1): 323–328.
- Gross HJ, Brossmer R. (1988). Enzymatic introduction of a fluorescent sialic acid into oligosaccharide chains of glycoproteins. *European Journal of Biochemistry*, 177(3): 583–589.
- Gross HJ, Bünsch A, Paulson JC, Brossmer R. (1987). Activation and transfer of novel synthetic 9-substituted sialic acids. *European Journal of Biochemistry*, 168(3): 595–602.
- Grunert RR, McGahen JW, Davies WL. (1965). The in vivo antiviral activity of 1-adamantanamine (amantadine) I. Prophylactic and therapeutic activity against influenza viruses. *Virology*, 26(2): 262–269.
- Gulati S, Smith DF, Cummings RD, Couch RB, Griesemer SB, St. George K, Webster RG, Air GM. (2013). Human H3N2 influenza viruses isolated from 1968 to 2012 show varying preference for receptor substructures with no apparent consequences for disease or spread. *PLoS One*, 8(6): e66325.
- Hagiwara T, Kijima-Suda I, Ido T, Ohrai H, Tomita K. (1994). Inhibition of bacterial and viral sialidases by 3-fluoro-N-acetylneuraminic acid. *Carbohydrate Research*, 263(1): 167–172.
- Han S, Collins BE, Bengtson P, Paulson JC. (2005). Homomultimeric complexes of CD22 in B cells revealed by protein-glycan cross-linking. *Nature Chemical Biology*, 1(2): 93–97.

- Hara S, Yamaguchi M, Takemori Y, Nakamura M, Ohkura Y. (1986). Highly sensitive determination of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acids in human serum and urine and rat serum by reversed-phase liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography*, 377: 111–119.
- Harduin-Lepers A, Recchi M-A, Delannoy P. (1995). 1994, the year of sialyltransferases. *Glycobiology*, 5(8): 741–758.
- Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi M-A, Samyn-Petit B, Julien S, Delannoy P. (2001). The human sialyltransferase family. *Biochimie*, 83(8): 727–737.
- Harris A, Cardone G, Winkler DC, Heymann JB, Brecher M, White JM, Steven AC. (2006). Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50): 19123–19127.
- Haun G, Keppler OT, Bock CT, Herrmann M, Zentgraf H, Pawlita M. (1993). The cell surface receptor is a major determinant restricting the host range of the B-lymphotropic papovavirus. *Journal of Virology*, 67(12): 7482–7492.
- Higa HH, Rogers GN, Paulson JC. (1985). Influenza Virus hemagglutinins differentiate between receptor determinants bearing N-acetyl-, N-glycolyl-, and N,O-diacetylneuraminic acids. *Virology*, 144(1): 279–282.
- Hinderlich S, Stäsche R, Zeitler R, Reutter W. (1997). A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(39): 24313–24318.
- Hirschberg CB, Goodman SR, Green C. (1976). Sialic acid uptake by fibroblasts. *Biochemistry*, 15(16): 3591–3599.
- Horimoto T, Kawaoka Y. (2005). Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(8): 591–600.
- Horstkorte R, Rau K, Reutter W, Nöhring S, Lucka L. (2004). Increased expression of the selectin ligand sialyl-LewisX by biochemical engineering of sialic acids. *Experimental Cell Research.*, 295(2): 549–554.
- Hsu T-L, Hanson SR, Kishikawa K, Wang S-K, Sawa M, Wong C-H. (2007). Alkynyl sugar analogs for the labeling and visualization of glycoconjugates in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(8): 2614–2619.

- Huang RTC, Rott R, Wahn K, Klenk H-D, Kohama T. (1980). The function of the neuraminidase in membrane fusion induced by myxoviruses. *Virology*, 107(2): 313–319.
- Hurt AC, Holien JK, Parker M, Kelso A, Barr IG. (2009). Zanamivir-resistant influenza viruses with a novel neuraminidase mutation. *Journal of Virology*, 83(20): 10366–10373.
- Irie A, Koyama S, Kozutsumi Y, Kawasaki T, Suzuki A. (1998). The molecular basis for the absence of N-glycolylneuraminic acid in humans*. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(25): 15866–15871.
- Ito T, Couceiro JNSS, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, Donatelli I, Kida H, Paulson JC, Webster RG, Kawaoka Y. (1998). Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *Journal of Virology*, 72(9): 7367–7373.
- Jacobs CL, Yarema KJ, Mahal LK, Nauman DA, Charters NW, Bertozzi CR. (2000). Metabolic labeling of glycoproteins with chemical tags through unnatural sialic acid biosynthesis. *Methods in Enzymology*, 327: 260–275.
- Jacobs CL, Goon S, Yarema KJ, Hinderlich S, Hang HC, Chai DH, Bertozzi CR. (2001). Substrate specificity of the sialic acid biosynthetic pathway. *Biochemistry*, 40(43): 12864–12874.
- Jeffery PK, Li D. (1997). Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. *European Respiratory Journal*, 10(7): 1655–1662.
- Jones MB, Teng H, Rhee JK, Lahar N, Baskaran G, Yarema KJ. (2004). Characterization of the cellular uptake and metabolic conversion of acetylated N-acetylmannosamine (ManNAc) analogues to sialic acids. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(4): 394–405.
- Jourdian GW, Swanson AL, Watson D, Roseman S. (1964). Isolation of sialic acid 9-phosphatase from human erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 239(8): PC2714-2716.
- Kayser H, Zeitler R, Kannicht C, Grunow D, Nuck R, Reutter W. (1992). Biosynthesis of a nonphysiological sialic acid in different rat organs, using N-propanoyl-D-hexosamines as precursors. *Journal of Biological Chemistry*, 267(24): 16934–16938.
- Kean EL. (1991). Sialic acid activation. *Glycobiology*, 1(5): 441–447.
- Kelm S, Paulson JC, Rose U, Brossmer R, Schmid W, Bandgar BP, Schreiner E, Hartmann M, Zbiral E. (1992). Use of sialic acid analogues to define functional groups involved in binding to the influenza virus hemagglutinin. *European Journal of Biochemistry*, 205(1): 147–153.

- Kepler OT, Stehling P, Herrmann M, Kayser H, Grunow D, Reutter W, Pawlita M. (1995). Biosynthetic modulation of sialic acid-dependent virus-receptor interactions of two primate polyoma viruses*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(3): 1308-1314.
- Kepler OT, Herrmann M, von der Lieth CW, Stehling P, Reutter W, Pawlita M. (1998). Elongation of the N-acyl side chain of sialic acids in MDCK II cells inhibits influenza A virus infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(2): 437-442.
- Kepler OT, Horstkorte R, Pawlita M, Schmidt C, Reutter W. (2001). Biochemical engineering of the N-acyl side chain of sialic acid: biological implications. *Glycobiology*, 11(2): 11R-18R.
- Kido H, Yokogoshi Y, Sakai K, Tashiro M, Kishino Y, Fukutomi A, Katunuma N. (1992). Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(19): 13573-13579.
- Kim CU, Lew W, Williams MA, Liu H, Zhang L, Swaminathan S, Bischofberger N, Chen MS, Mendel DB, Tai CY, Laver WG, Stevens RC. (1997). Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *Journal of the American Chemical Society*, 119(4): 681-690.
- Kim EJ, Sampathkumar S-G, Jones MB, Rhee JK, Baskaran G, Goon S, Yarema KJ. (2004). Characterization of the metabolic flux and apoptotic effects of O-hydroxyl- and N-acyl-modified N-acetylmannosamine analogs in jurkat cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(18): 18342-18352.
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. (2011). *Virus Taxonomy, 1st Edition: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier.
- Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, Shiraishi K, Kawakami C, Kimura K, Hayden FG, Sugaya N, Kawaoka Y. (2004). Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet (London, England)*, 364(9436): 759-765.
- Klenk H-D, Wagner R, Heuer D, Wolff T. (2002). Importance of hemagglutinin glycosylation for the biological functions of influenza virus. *Virus Research*, 82(1-2): 73-75.
- Kobasa D, Kodihalli S, Luo M, Castrucci MR, Donatelli I, Suzuki Y, Suzuki T, Kawaoka Y. (1999). Amino acid residues contributing to the substrate specificity of the influenza A virus neuraminidase. *Journal of Virology*, 73(8): 6743-6751.

- Kornfeld S, Kornfeld R, Neufeld EF, O'Brien PJ. (1964). The feedback control of sugar nucleotide biosynthesis in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 52(2): 371–379.
- Kurniyati K, Zhang W, Zhang K, Li C. (2013). A surface-exposed neuraminidase affects complement resistance and virulence of the oral spirochaete *Treponema denticola*. *Molecular Microbiology*, 89(5): 842–856.
- Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X. (2004). Endocytosis of influenza viruses. *Microbes and Infection*, 6(10): 929–936.
- Lamb RA. (1983). The influenza virus RNA segments and their encoded proteins. In: Palese P, Kingsbury DW, Eds. *Genetics of influenza viruses*. Vienna: Springer-Verlag, 21-69.
- Lamblin G, Roussel P. (1993). Airway mucins and their role in defence against microorganisms. *Respiratory Medicine*, 87(6): 421–426.
- Lawrence SM, Huddleston KA, Pitts LR, Nguyen N, Lee YC, Vann WF, Coleman TA, Betenbaugh MJ. (2000). Cloning and expression of the human N-acetylneuraminic acid phosphate synthase gene with 2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononic acid biosynthetic ability. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(23): 17869–17877.
- Lazarowitz SG, Choppin PW. (1975). Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology*, 68(2): 440–454.
- Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG, Smith DB. (2018). Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*, 46(D1): D708–D717.
- Leser GP, Lamb RA. (2005). Influenza virus assembly and budding in raft-derived microdomains: a quantitative analysis of the surface distribution of HA, NA and M2 proteins. *Virology*, 342(2): 215–227.
- Lew W, Chen X, Kim CU. (2000). Discovery and development of GS 4104 (oseltamivir): an orally active influenza neuraminidase inhibitor. *Current Medicinal Chemistry*, 7(6): 663–672.
- Li W, Escarpe PA, Eisenberg EJ, Cundy KC, Sweet C, Jakeman KJ, Merson J, Lew W, Williams M, Zhang L, Kim CU, Bischofberger N, Chen MS, Mendel DB. (1998). Identification of GS 4104 as an orally bioavailable prodrug of the influenza virus neuraminidase inhibitor GS 4071. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(3): 647–653.

- Li Y, Cao H, Dao N, Luo Z, Yu H, Chen Y, Xing Z, Baumgarth N, Cardona C, Chen X. (2011). High-throughput neuraminidase substrate specificity study of human and avian influenza A viruses. *Virology*, 415(1): 12–19.
- Liu T, Guo Z, Yang Q, Sad S, Jennings HJ. (2000). Biochemical engineering of surface α 2-8 polysialic acid for immunotargeting tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(42): 32832–32836.
- Luchansky SJ, Hang HC, Saxon E, Grunwell JR, Yu C, Dube DH, Bertozzi CR. (2003). Constructing azide-labeled cell surfaces using polysaccharide biosynthetic pathways. *Methods in Enzymology*, 362: 249–272.
- Magesh S, Ando H. (2013). Synthesis of sialic acid-containing oligosaccharides and sialylmimetics. In: Tiralongo J and Martinez-Duncker I, Eds. *Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function. Sialic Acid Glycoconjugates in Health and Disease* [eBook]. USA: Bentham Science Publishers, 404-447.
- Mahal LK, Yarema KJ, Bertozzi CR. (1997). Engineering chemical reactivity on cell surfaces through oligosaccharide biosynthesis. *Science*, 276(5315): 1125–1128.
- Mahal LK, Charter NW, Angata K, Fukuda M, Koshland DE Jr, Bertozzi CR. (2001). A small-molecule modulator of poly- α 2,8-sialic acid expression on cultured neurons and tumor cells. *Science*, 294(5541): 380–381.
- Mantey LR, Keppler OT, Pawlita M, Reutter W, Hinderlich S. (2001). Efficient biochemical engineering of cellular sialic acids using an unphysiological sialic acid precursor in cells lacking UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase. *FEBS Letters*, 503(1): 80–84.
- Martin K, Helenius A. (1991). Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell*, 67(1): 117–130.
- Matrosovich MN, Klenk H-D. (2003). Natural and synthetic sialic acid-containing inhibitors of influenza virus receptor binding. *Reviews in Medical Virology*, 13(2): 85–97.
- Matrosovich MN, Gambaryan AS, Tuzikov AB, Byramova NE, Mochalova LV, Golbraikh AA, Shenderovich MD, Finne J, Bovin NV. (1993). Probing of the receptor-binding sites of the H1 and H3 influenza A and influenza B virus hemagglutinins by synthetic and natural sialosides. *Virology*, 196(1): 111-121.
- Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk H-D. (2004). Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *Journal of Virology*, 78(22): 12665–12667.
- Matrosovich MN, Matrosovich T, Garten W, Klenk H-D. (2006). New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Virology Journal*, 3(1): 63.

- Meindl P, Tuppy H. (1966). Darstellung und enzymatische Spaltbarkeit von α -Ketosiden der N-Propionyl-, N-Butyryl- und N-Benzoyl-D-neuraminsäure. *Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften*, 97(6): 1628–1647.
- Meindl P, Tuppy H. (1969). Über 2-Desoxy-2,3-dehydro-sialinsäuren, II. Kompetitive Hemmung der Vibrio-cholerae-Neuraminidase durch 2-Desoxy-2,3-dehydro-N-acyl-neuraminsäuren. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 350(2): 1088–1092.
- Meindl P, Bodo G, Palese P, Schulman J, Tuppy H. (1974). Inhibition of neuraminidase activity by derivatives of 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid. *Virology*, 58(2): 457–463.
- Miyagi T, Yamaguchi K. (2012). Mammalian sialidases: physiological and pathological roles in cellular functions. *Glycobiology*, 22(7): 880–896.
- Munksgaard PS, Skals M, Reinholdt J, Poulsen K, Jensen MR, Yang C, Leipziger J, Vorup-Jensen T, Praetorius HA. (2014). Sialic acid residues are essential for cell lysis mediated by leukotoxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Infection and Immunity*, 82(6): 2219–2228.
- Münster-Kühnel AK, Hinderlich S. (2013). Sialic acid biosynthesis in vertebrates. In: Tiralongo J and Martinez-Duncker I, Eds. *Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function. Sialic Acid Glycoconjugates in Health and Disease* [eBook]. USA: Bentham Science Publishers, 76-114, 79.
- Nayak DP, Hui EK-W, Barman S. (2004). Assembly and budding of influenza virus. *Virus Research*, 106(2): 147–165.
- Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S. (2009). Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Research*, 143(2): 147–161.
- O'Neill RE, Jaskunas R, Blobel G, Palese P, Moroiaru J. (1995). Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and for protein import. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(39): 22701–22704.
- O'Neill RE, Talon J, Palese P. (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *The EMBO Journal*, 17(1): 288–296.
- Oetke C, Hinderlich S, Brossmer R, Reutter W, Pawlita M, Keppler OT. (2001). Evidence for efficient uptake and incorporation of sialic acid by eukaryotic cells. *European Journal of Biochemistry*, 268(16): 4553–4561.
- Oetke C, Brossmer R, Mantey LR, Hinderlich S, Isecke R, Reutter W, Keppler OT, Pawlita M. (2002). Versatile biosynthetic engineering of sialic acid in living cells using synthetic sialic acid analogues. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(8): 6688–6695.

- Ohuchi M, Ohuchi R, Feldmann A, Klenk H-D. (1997). Regulation of receptor binding affinity of influenza virus hemagglutinin by its carbohydrate moiety. *Journal of Virology*, 71(11): 8377–8384.
- Ohuchi M, Asaoka N, Sakai T, Ohuchi R. (2006). Roles of neuraminidase in the initial stage of influenza virus infection. *Microbes and Infection*, 8(5): 1287–1293.
- Onsirisakul N, Nakakita S-I, Boonarkart C, Kongchanagul A, Suptawiwat O, Puthavathana P, Chaichuen K, Kittiniyom K, Suzuki Y, Auewarakul P. (2014). Substrate specificity of avian influenza H5N1 neuraminidase. *World Journal of Virology*, 3(4): 30–36.
- Page RC, Kornman KS. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000*, 14(1): 9–11.
- Palese P, Tobita K, Ueda M, Compans RW. (1974). Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology*, 61(2): 397–410.
- Pilatte Y, Bignon J, Lambré CR. (1993). Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: pathophysiological implications of sialidases in immunity. *Glycobiology*, 3(3): 201–218.
- Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA. (1992). Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*, 69(3): 517–528.
- Roehlecke C, Horstkorte R, Reutter W. (2013). Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells by the sialic acid precursor N-propanoylmannosamine. *Glycoconjugate Journal*, 30(8): 813–818.
- Roseman S, Jourdian GW, Watson D, Rood R. (1961). Enzymatic synthesis of sialic acid 9-phosphates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47: 958–961.
- Rossman JS, Lamb RA. (2011). Influenza virus assembly and budding. *Virology*, 411(2): 229–236.
- Rossman JS, Jing X, Leser GP, Lamb RA. (2010). Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell*, 142(6): 902–913.
- Roy S, Douglas CWI, Stafford GP. (2010). A novel sialic acid utilization and uptake system in the periodontal pathogen *Tannerella forsythia*. *Journal of Bacteriology*, 192(9): 2285–2293.
- Russell RJ, Kerry PS, Stevens DJ, Steinhauer DA, Martin SR, Gamblin SJ, Skehel JJ. (2008). Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(46): 17736–17741.

- Russel RJ, Gamblin SJ, Skehel JJ. (2013). Influenza glycoproteins: hemagglutinin and neuraminidase. In: Webster RG, Monto AS, Braciale TJ, Lamb RA, Eds. *Textbook of Influenza, 2nd Edition*. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd, 67-200.
- Rust MJ, Lakadamyali M, Zhang F, Zhuang X. (2004). Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(6): 567–573.
- Sampathkumar S-G, Li AV, Jones MB, Sun Z, Yarema KJ. (2006). Metabolic installation of thiols into sialic acid modulates adhesion and stem cell biology. *Nature Chemical Biology*, 2(3): 149–152.
- Sampathkumar S-G, Campbell CT, Weier C, Yarema KJ. (2006). Short-chain fatty acid-hexosamine cancer prodrugs: the sugar matters! *Drugs of the Future*, 31(12): 1099–1116.
- Sarkar AK, Fritz TA, Taylor WH, Esko JD. (1995). Disaccharide uptake and priming in animal cells: inhibition of sialyl Lewis X by acetylated Gal β 1- \rightarrow 4GlcNAc β -O-naphthalenemethanol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(8): 3323–3327.
- Sato C, Kitajima K. (2013). Disialic, oligosialic and polysialic acids: distribution, functions and related disease. *The Journal of Biochemistry*, 154(2): 115–136.
- Sauer A-K, Liang C-H, Stech J, Peeters B, Quéré P, Schwegmann-Wessels C, Wu C-Y, Wong C-H, Herrler G. (2014). Characterization of the sialic acid binding activity of influenza A viruses using soluble variants of the H7 and H9 hemagglutinins. *PLoS One*, 9(2): e89529.
- Sauter NK, Bednarski MD, Wurzburg BA, Hanson JE, Whitesides GM, Skehel JJ, Wiley DC. (1989). Hemagglutinins from two influenza virus variants bind to sialic acid derivatives with millimolar dissociation constants: a 500-MHz proton nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry*, 28(21): 8388–8396.
- Sauter NK, Hanson JE, Glick GD, Brown JH, Crowther RL, Park S-J, Skehel JJ, Wiley DC. (1992). Binding of influenza virus hemagglutinin to analogs of its cell-surface receptor, sialic acid: analysis by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and X-ray crystallography. *Biochemistry*, 31(40): 9609–9621.
- Saxon E, Bertozzi CR. (2000). Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science*, 287(5460): 2007–2010.
- Schauer R, Kamerling JP. (1997). Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids. In: Montreuil J, Vliegthart JFG, Schachter E, Eds. *Glycoproteins II, Volume 29, 1st Edition*. Amsterdam: Elsevier Science, 243-402.

- Schmidt C, Stehling P, Schnitzer J, Reutter W, Horstkorte R. (1998). Biochemical engineering of neural cell surfaces by the synthetic N-propanoyl-substituted neuraminic acid precursor. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(30): 19146–19152.
- Schwartz EL, Hadfield AF, Brown AE, Scartorelli AC. (1983). Modification of sialic acid metabolism of murine erythroleukemia cells by analogs of N-acetylmannosamine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 762(4): 489–497.
- Shen X, Zhang X, Liu S. (2013). Novel hemagglutinin-based influenza virus inhibitors. *Journal of Thoracic Disease*, 5(Suppl 2): 149–159.
- Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. (2006). Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, 440(7083): 435–436.
- Shiraishi K, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, Goto H, Sugaya N, Kawaoka Y. (2003). High frequency of resistant viruses harboring different mutations in amantadine-treated children with influenza. *The Journal of Infectious Diseases*, 188(1): 57–61.
- Shukla AK, Schauer R. (1982). Analysis of N,O-acylated neuraminic acids by high-performance liquid anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 244(1): 81–89.
- Sidorenko Y, Reichl U. (2004). Structured model of influenza virus replication in MDCK cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(1): 1–14.
- Smith GL, Hay AJ. (1982). Replication of the influenza virus genome. *Virology*, 118(1): 96–108.
- Smith PW, Sollis SL, Howes PD, Cherry PC, Starkey ID, Copley KN, Weston H, Scicinski J, Merritt A, Whittington A, Wyatt P, Taylor N, Green D, Bethell R, Madar S, Fenton RJ, Morley PJ, Pateman T, Beresford A. (1998). Dihydropyranocarboxamides related to zanamivir: a new series of inhibitors of influenza virus sialidases. 1. Discovery, synthesis, biological activity, and structure-activity relationships of 4-guanidino- and 4-amino-4H-pyran-6-carboxamides. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(6): 787–797.
- Stafford G, Roy S, Honma K, Sharma A. (2012). Sialic acid, periodontal pathogens and *Tannerella forsythia*: Stick around and enjoy the feast! *Molecular Oral Microbiology*, 27(1): 11–22.
- Stäsche R, Hinderlich S, Weise C, Effertz K, Lucka L, Moormann P, Reutter W. (1997). A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Molecular cloning and functional expression of UDP-N-acetyl-glucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(39): 24319–24324.

- Stegmann T. (2000). Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. *Traffic*, 1(8): 598–604.
- Steinhauer DA, Wharton SA, Skehel JJ, Wiley DC. (1995). Studies of the membrane fusion activities of fusion peptide mutants of influenza virus hemagglutinin. *Journal of Virology*, 69(11): 6643–6651.
- Stevens J, Blixt O, Glaser L, Taubenberger JK, Palese P, Paulson JC, Wilson IA. (2006). Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. *Journal of Molecular Biology*, 355(5): 1143–1155.
- Sun X-L. (2007). Recent anti-influenza strategies in multivalent sialyloligosaccharides and sialylmimetics approaches. *Current Medicinal Chemistry*, 14(21): 2304–2313.
- Suzuki Y, Sato K, Kiso M, Hasegawa A. (1990). New ganglioside analogs that inhibit influenza virus sialidase. *Glycoconjugate Journal*, 7(4): 349–356.
- Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland RE, Chambers TM, Kiso M, Ishida H, Kawaoka Y. (2000). Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *Journal of Virology*, 74(24): 11825–11831.
- Tanaka Y, Kohler JJ. (2008). Photoactivatable crosslinking sugars for capturing glycoprotein interactions. *Journal of the American Chemical Society*, 130(11): 3278–3279.
- Taubenberger JK, Morens DM. (2006). 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerging Infectious Diseases*, 12(1): 15–22.
- Taylor NR, Cleasby A, Singh O, Skarzynski T, Wonacott AJ, Smith PW, Sollis SL, Howes PD, Cherry PC, Bethell R, Colman P, Varghese J. (1998). Dihydropyranocarboxamides related to zanamivir: a new series of inhibitors of influenza virus sialidases. 2. Crystallographic and molecular modeling study of complexes of 4-amino-4H-pyran-6-carboxamides and sialidase from influenza virus types A and B. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(6): 798–807.
- Tiralongo J. (2013). Introduction to sialic acid structure, occurrence, biosynthesis and function. In: Tiralongo J and Martinez-Duncker I, Eds. *Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function. Sialic Acid Glycoconjugates in Health and Disease* [eBook]. USA: Bentham Science Publishers, 3-32.
- Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen L-M, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson JC, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC, Wilson IA, Donis RO. (2013). New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathogens*, 9(10): e1003657.

- Varghese JN, Colman PM. (1991). Three-dimensional structure of the neuraminidase of influenza virus A/Tokyo/3/67 at 2.2 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 221(2): 473–486.
- Varghese JN, Laver WG, Colman PM. (1983). Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature*, 303(5912): 35–40.
- Vimr ER, Kalivoda KA, Deszo EL, Steenbergen SM. (2004). Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(1): 132–153.
- Viswanathan K, Lawrence S, Hinderlich S, Yarema KJ, Lee YC, Betenbaugh MJ. (2003). Engineering sialic acid synthetic ability into insect cells: identifying metabolic bottlenecks and devising strategies to overcome them. *Biochemistry*, 42(51): 15215–15225.
- von Itzstein M. (2007). The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 6(12): 967–974.
- von Itzstein M, Wu W-Y, Kok GB, Pegg MS, Dyason JC, Jin B, Van Phan T, Smythe ML, White HF, Oliver SW, Colman PM, Varghese JN, Ryan DM, Woods JM, Bethell RC, Hotham VJ, Cameron JM, Penn CR. (1993). Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature*, 363(6428): 418–423.
- Wagner R, Matrosovich M, Klenk H-D. (2002). Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Reviews in Medical Virology*, 12(3): 159–166.
- Wagner R, Heuer D, Wolff T, Herwig A, Klenk H-D. (2002). N-glycans attached to the stem domain of haemagglutinin efficiently regulate influenza A virus replication. *Journal of General Virology*, 83(3): 601–609.
- Wakefield L, Brownlee GG. (1989). RNA-binding properties of influenza A virus matrix protein M1. *Nucleic Acids Research*, 17(21): 8569–8580.
- Walop JN, Boschman TAC, Jacobs J. (1960). Affinity of N-acetylneuraminic acid for influenza virus neuraminidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 44: 185–186.
- Wang C, Takeuchi K, Pinto LH, Lamb RA. (1993). Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block. *Journal of Virology*, 67(9): 5585–5594.
- Warren L. (1959). The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 234(8): 1971–1975.
- Warren L, Felsenfeld H. (1961). N-acetylmannosamine-6-phosphate and N-acetylneuraminic acid-9-phosphate as intermediates in sialic acid biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 5(3): 185–190.

- Warren L, Blacklow RS. (1962). Biosynthesis of N-acetylneuraminic acid and cytidine-5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid in *Neisseria meningitidis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 7(6): 433–438.
- Webster RG, Govorkova EA. (2014). Continuing challenges in influenza. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1323(1): 115–139.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*, 56(1): 152–179.
- Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC. (1988). Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature*, 333(6172): 426–431.
- Wiley DC, Skehel JJ. (1987). The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annual Review of Biochemistry*, 56(1): 365–394.
- Wingfield WL, Pollack D, Grunert RR. (1969). Therapeutic efficacy of amantadine HCl and rimantadine HCl in naturally occurring influenza A2 respiratory illness in man. *The New England Journal of Medicine*, 281(11): 579–584.
- Wrtil PR, Horstkorte R, Reutter W. (2016). Metabolic glycoengineering with N-acyl side chain modified mannosamines. *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(33): 9482–9512.
- Wu Y, Wu Y, Tefsen B, Shi Y, Gao GF. (2014). Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends in Microbiology*, 22(4): 183–191.
- Yang P, Major D, Rutishauser U. (1994). Role of charge and hydration in effects of polysialic acid on molecular interactions on and between cell membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(37): 23039–23044.

11 Publikation im Zusammenhang mit dieser Arbeit

Die Daten dieser Arbeit wurden bisher nicht publiziert. Während der Forschungszeit in den Laborräumen der Arbeitsgruppe um PD Dr. biol. hom. Sebastian Peter Galuska am Biochemischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen, war ich an der hier aufgeführten Publikation beteiligt:

Khosravi F, Michel V, Galuska CE, Bhushan S, **Christian P**, Schuppe H-C, Pilatz A, Galuska SP, Meinhardt A. (2016). Desialylation of spermatozoa and epithelial cell glycocalyx is a consequence of bacterial infection of the epididymis. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(34): 17717–17726.

12 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Ich möchte in diesem Abschnitt die Gelegenheit nutzen, um mich für die Unterstützung während dieser Arbeit zu bedanken.

Allen voran danke ich meinem Doktorvater PD Dr. Sebastian Peter Galuska, der mich liebevoll in die Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir die Möglichkeit gab, in dem interessanten Forschungsfeld Fuß zu fassen. Er war immer für mich da und guter Laune. Er war gleichzeitig wie ein Familienvater für unsere Arbeitsgruppe. Ich bin froh darüber und auch stolz, in einem so lebenswürdigen Team gelernt und geforscht zu haben. Die Betreuung durch Sebastian als Freund und Doktorvater war immer eine Besondere.

Danke an Farhad Khosravi und Farzali Husejnov für die ersten Einweisungen in labortechnisches und wissenschaftliches Arbeiten und neue Methodiken, welche mir die ersten Schritte im Labor wesentlich erleichtert haben. Vielen Dank an Kristina Zlatina. Du hast mir alles rund um die Zellbiologie geduldig beigebracht und es gab keine Frage, zu der du keine gute Lösung gefunden hast. Dein wissenschaftliches Know-how ist beeindruckend und dein Engagement war für alle eine große Stütze.

Danke Dr. Christina Galuska für die Unterstützung bei meinen Fragen zur Glykobiologie und der Umsetzung neuer Methodiken. Ich erinnere mich gerne an die lieben Gespräche während den Inkubationszeiten. Du warst eine super Tischnachbarin und der Ruhepol unserer Gruppe.

Ich möchte auch meinen Mitdoktoranden Jan Dambon, Natalia Panasenکو, Rhea Veelken, Ashkan Madani und Andrea Kühne danken. Die gemeinsame Zeit mit Euch war immer von guter Stimmung geprägt. Wir haben viel gemeinsam gelacht und Spaß gehabt. Unser positives Miteinander hat geholfen, frustrierende Momente zu vergessen und gab Kraft, mit Optimismus neue Versuche anzugehen. Die gemeinsamen Frühstücke, Mensagänge, Kaffeepausen und kurzweiligen Abenden werde ich nie vergessen.

Danke Peter Käse für die technische Unterstützung. Ich weiß ehrlich gesagt nicht mehr, wie viele SpeedVacs wir zwischen Laborräumen und Werkstatt hin und her getragen haben. Aber du hast es immer wieder geschafft, eine schnelle Lösung für den nächsten Tag zu finden.

Vielen Dank an Prof. Dr. Eva Friebertshäuser vom Virologischen Institut der Philipps-Universität Marburg für die großartige Zusammenarbeit. Die virologischen Versuche wären ohne Deine Hilfe und die Verfügbarkeit der Laborräume nicht möglich gewesen. Gemeinsam konnten wir Ideen besprechen und die Parameter auf unsere Versuche abstimmen. Danke Aybike, dass Du mich während der Versuche in Marburg unterstützt hast und Dir so viel Zeit für mich genommen hast. Danke Annika Arendt für die Beantwortung der vielen Fragen während meiner Zeit bei Euch.

Vielen Dank an meine Familie. Mein Vater Michael, meine Mutter Angelika und meine Schwester Sarah waren seit ich denken kann und auch besonders während der Zeit als Doktorand immer für mich da und haben mich in schwierigen Momenten unterstützt, aufgemuntert und motiviert. Danke an meine Omas Erna Christian und Ingrid Deiters sowie meine Tante Claudia Franz und Axel Gross. Ihr habt mich während meines Studiums und der Zeit im Labor unterstützt. Ohne Euch würde ich heute nicht hier stehen.

Zuletzt möchte ich meinen Liebsten danken. Danke Isabel und Nora. Ihr macht mich glücklich und zaubert mir ein Lächeln ins Gesicht. Ich bin so stolz, Euch an meiner Seite zu haben. Ich freue mich auf alles, was wir gemeinsam erleben.