

Analyse der Polysialylierung von humanen umbilikal Endothelzellen und deren Einfluss auf die Migration

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

vorgelegt von **Strubl, Sebastian**
aus Lauf a. d. Pegnitz

Gießen 2019

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

Leiter: Prof. Dr. Lienhard Schmitz

1. Gutachter: PD Dr. Sebastian P. Galuska

2. Gutachter: Prof. Dr. Ralph Schermuly

Tag der Disputation: 04.12.2019

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Glykane und Glykokonjugate.....	2
1.2	Polysialinsäuren.....	3
1.2.1	Struktur	3
1.2.2	Biosynthese	4
1.2.3	Physiologische Bedeutung	8
1.3	Angiogenese.....	12
1.3.1	Allgemeiner Überblick.....	12
1.3.2	Einfluss von Sialinsäuren	15
1.3.3	Einfluss von Polysialinsäuren	18
1.4	Ziel der Arbeit	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Biologische Materialien	20
2.1.1	Zelllinie	20
2.1.2	Enzyme.....	20
2.1.3	Antikörper	21
2.2	Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Zellkulturzusätze	23
2.2.1	Verbrauchsmaterialien.....	23
2.2.2	Chemikalien.....	23
2.2.3	Nährmedien und Zellkulturzusätze	23
2.3	Zellbiologische Methoden	24
2.3.1	Isolation und Kultur von human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).....	24
2.3.2	Zellzählung mittels Trypanblaufärbung und Zellzähler	26
2.3.3	Inkubation von HUVECs mit verschiedenen Stimulantien	26
2.4	Proteinanalytische Methoden	27
2.4.1	Zellhomogenisierung	27
2.4.2	Proteinbestimmung.....	28
2.4.3	Isolierung polysialylierter Proteine	28

2.4.4	Enzymverdau.....	30
2.4.5	SDS-Gelelektrophorese.....	31
2.4.6	Western Blot	32
2.4.7	Immunfärbung und Entwicklung von Western Blots	33
2.4.8	Peptidmassenfingerabdruck	34
2.5	Histologische Methoden	34
2.5.1	Zellfixierung	34
2.5.2	Immunfluoreszenzfärbung	34
2.6	RT-PCR	35
2.7	Migration Assay	37
3	Resultate	39
3.1	Polysialylierung von HUVECs.....	39
3.1.1	PolySia-Nachweis in HUVECs	39
3.1.2	Lokalisation von PolySia in HUVECs	41
3.1.3	Bestimmung der Polysialyltransferasen	42
3.1.4	Identifizierung des polysialylierten Proteins.....	43
3.2	Polysialylierung des HUVEC-Überstands.....	45
3.2.1	PolySia-Nachweis im Überstand von HUVECs	45
3.2.2	Vergleich der PolySia-Konzentration von Zelllysate und –Überstand ..	47
3.3	Analyse zur funktionellen Bedeutung von PolySia in HUVECs	49
3.3.1	Stimulation von HUVECs mit Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	49
3.3.2	Stimulation von HUVECs mit basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)	53
3.3.3	Stimulation mit künstlich hergestellten Sialinsäurevorläufern.....	54
3.3.4	Migration Assay	56

4 Diskussion	58
4.1 Expression von PolySia in HUVECs	58
4.2 Sekretion von PolySia durch HUVECs	59
4.3 Funktionelle Bedeutung von PolySia in HUVECs	62
4.4 Ausblick	66
5 Zusammenfassung	69
6 Summary	70
7 Abkürzungsverzeichnis	71
8 Abbildungsverzeichnis	73
9 Referenzen	74
10 Publikationen und Kongressbeiträge	87
11 Eidesstattliche Erklärung	88
12 Danksagung	89

1 Einleitung

Die Bildung funktioneller Kompartimente in einem Organismus erfordert mechanischen Zusammenhalt, sowie gegenseitige Kommunikation von Zellen. Grundlage dieser Zellinteraktionen sind Protein-Protein-Wechselwirkungen auf Zelloberflächen. Glykane als postrtranslationale Modifikation dieser Proteine sind essentiell, um solche Wechselwirkungen zu regulieren. Innerhalb dieser Glykane nehmen Sialinsäuren und deren Polymere eine außerordentliche Rolle ein. Während dies im neuronalen System bereits ausführlich erforscht wurde ist weniger in anderen Systemen bekannt. Hierzu zählt das Blutgefäßsystem und seine Entstehung, die Angiogenese - ein Forschungsgebiet das in Zeiten der Volkskrankheiten Krebs und ischämischer Blutkreislaufstörungen von großer Bedeutung ist. Nachdem u.a. unsere Arbeitsgruppe zeigen konnte, dass Sialinsäuren einen funktionellen Einfluss auf die Angiogenese haben, entstand hieraus die Hypothese, dass auch Polysialinsäuren (PolySia) funktionell relevant sein könnten. Auf dieser Grundlage untersucht folgende Arbeit die Existenz und den Einfluss von PolySia auf Endothelzellen. Zunächst soll eine theoretische Darstellung der Sialinsäurepolymere sowie eine Einführung in den Prozess der Angiogenese gegeben werden.

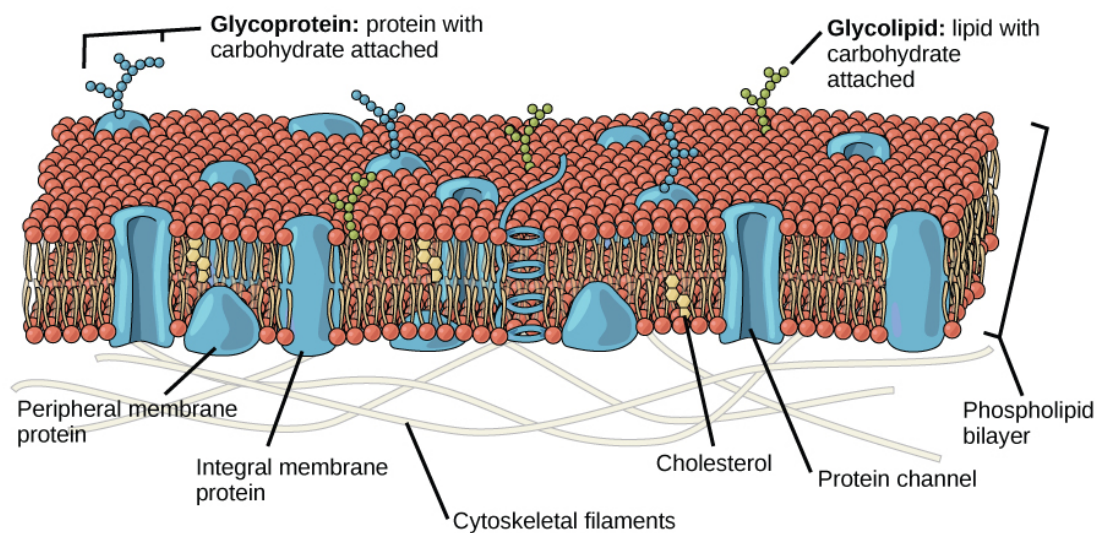


Abbildung 1 Schematische Darstellung einer Biomembran (OpenStax 2018) (CC-BY)

1.1 Glykane und Glykokonjugate

Glykane sind Ketten aus Monosachariden, die in Art und Zahl variieren können. Unzählige Makromoleküle können mit Glykanen modifiziert werden. Man unterscheidet 2 Hauptgruppen von Glykokonjugaten: Glykolipide und durch posttranslationale Modifikation entstandene Glykoproteine (Abb. 1) (Varki et al. 2015).

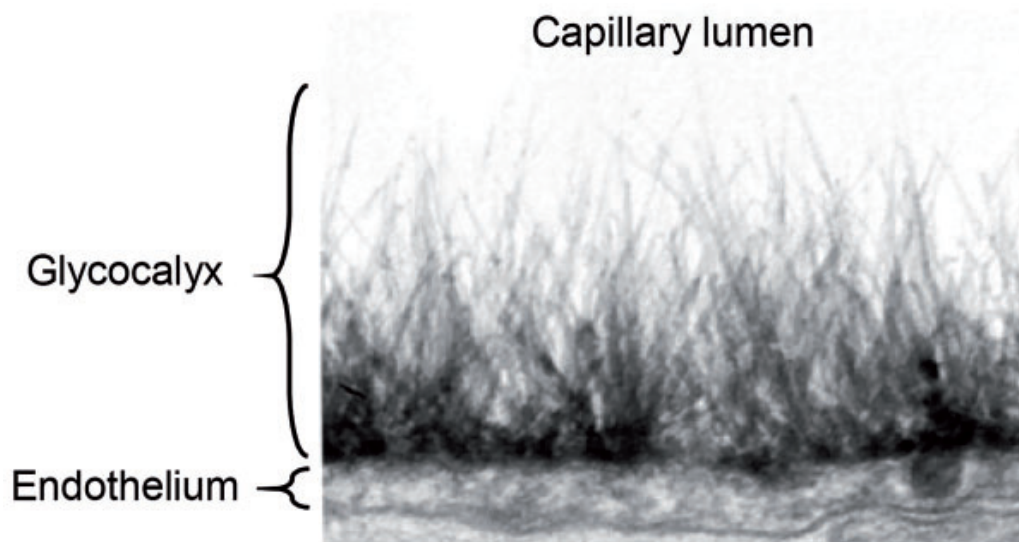


Abbildung 2 Glykokalix einer Endothelzelle (Oshima et al. 2018)(CC-BY-NC).

Intrazelluläre Glykoproteine regulieren z.B. diverse Signalkaskaden (Ohtsubo et al. 2006, Hart et al. 2011), während extrazelluläre Formen durch ihre exponierte Lokalisation in der Glykokalix eine zentrale Rolle bei Interaktionen zwischen Zellen mit Nachbarzellen, extrazellulärer Matrix, freien Molekülen oder fremden Organismen spielen (Abb. 2). Man unterscheidet hierbei zwei unterschiedliche Formen der Verbindung von Protein und Glykan. Die O-Glykosylierung entsteht durch eine kovalente Bindung der Glykosylgruppen des Glykans mit den Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin (Ser) und Threonin (Thr) des Proteins. Dieser Prozess findet im endoplasmatischen Retikulum sowie im Golgi-Apparat statt. Die N-Glykosylierung dagegen entsteht durch die kovalente Verknüpfung einer Vorläuferstruktur mit der Aminosäure Asparagin. Dieser Schritt findet ausschließlich im endoplasmatischen Retikulum statt. Anschließend können die Glykane fortlaufend durch unterschiedliche Glykosyltransferasen im Golgi-Apparat verlängert werden. Einen besonderen Stellenwert innerhalb der Glykane besitzen die Sialinsäuren als terminale Sialylreste an äußerster Position von Glykanen (Stanley et al. 2009, Varki et al. 2015).

1.2 Polysialinsäuren

1.2.1 Struktur

PolySia sind Homopolymere aus Sialinsäuren. Sialinsäuren wurden im letzten Jahrhundert erstmals im Mucos und zeitgleich im Gehirn beschrieben. Definitorisch werden alle Monosacharide als Sialinsäuren bezeichnet, die von der Neuraminsäure abstammen (Blix et al. 1957). Sie bestehen aus einem Grundgerüst aus 9-C-Atomen und sind durch eine Carboxylgruppe an C1, sowie eine Ketogruppe an C2 charakterisiert (Angata et al. 2002). Die grundlegende Neuraminsäure kommt in der Natur nicht vor. N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) ist die verbreitetste Sialinsäure (Abb. 3). Insgesamt sind bis heute mehr als 50 verschiedene Formen der Sialinsäuren bekannt (Kelm et al. 1997, Angata et al. 2002). Die Variabilität beruht hierbei auf dem Fehlen bzw. der Substitution von Amino- und Hydroxylgruppen an C4, C5, C7, C8 und C9 durch z.B. Acetyl-, Lactoyl-, Methyl-, Sulfonyl- und Phosphatgruppen (Angata et al. 2002).

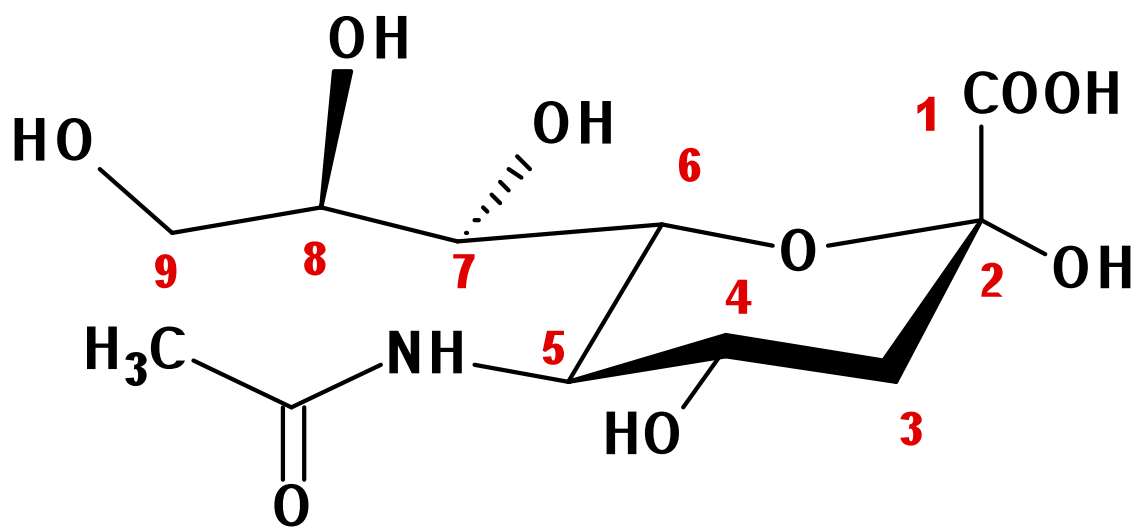


Abbildung 3 Struktur von N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac)

Die Struktur wurde mit ChemSketch Version C10E41 erstellt.

Aus dieser Vielzahl von Monosialylresten können nur wenige Sialinsäuren, bei der Bildung von Homopolymeren beobachtet werden. Zu den Häufigsten gehören die N-Acetylneuramin- und die N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) (Muhlenhoff et al. 1998). Man teilt die Homopolymere in Di-, Oligo-, und PolySia ein (Finne 1982, Galuska et al. 2006). Die Kettenlänge von PolySia kann mehr als 60 Monosialylreste umfassen (Abb. 4) (Finne 1982, Galuska et al. 2008). Genauso wie Monosialylreste findet sich PolySia in terminaler Position diverser O- und N-Glykane. Neben der Variation der Kettenlänge

und Grundbausteine wird die strukturelle Vielfalt durch unterschiedliche Verknüpfungsmöglichkeiten ($\alpha 2,4$, $\alpha 2,5$ Glycolyl, $\alpha 2,8$, $\alpha 2,9$, alternierend $\alpha 2,8/9$) erweitert (Martinez-Duncker 2013). In Säugern sind bisher nur $\alpha 2,8$ -verknüpfte Neu5Ac-Polymere bekannt (Sato 2004). Zusätzlich existieren diverse strukturelle Modifikationsmöglichkeiten der PolySia. Hierzu zählt z.B. die Laktonisierung, die durch eine reversible Veresterung von Carboxyl- und Hydroxylgruppe benachbarter Sialinsäuren unter sauren Bedingungen zustande kommt und auf diese Weise die negativ geladene Carboxylgruppe maskiert. Folglich wird die Hydrophilie des Homopolymers reduziert und die negative Gesamtladung der PolySia-Kette reguliert, ohne die Kettenlänge zu verändern (Riboni et al. 1986, Kielczynski et al. 1994, Cheng et al. 1998, Cheng et al. 2004).

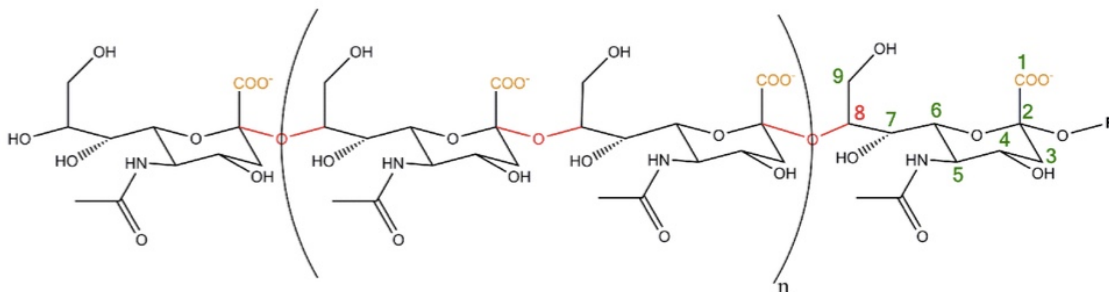


Abbildung 4 Struktur von PolySia

Dargestellt sind $\alpha 2,8$ -verknüpfte N-Acetylneuraminsäurereste. Abbildung aus (Galuska et al. 2017) (CC-BY).

1.2.2 Biosynthese

1.2.2.1 Sialinsäuren

Sialinsäuren können in Wirbeltieren selbst synthetisiert werden. Grundlage hierfür ist UDP-N-Acetyl-D-Glucosamin (UDP-GlcNAc), das innerhalb des Kohlehydratstoffwechsels gebildet wird. Innerhalb 5 enzymatischer Reaktionen entsteht durch Aufspalten jeweils einer energiereichen Bindung aus dem Ausgangssubstrat die aktivierte Sialinsäureform CMP-Neu5Ac (Abb. 5):

Zuerst wird UDP-GlcNAc zu N-Acetyl-D-Mannosamin unter Freisetzung von UDP epimerisiert. Hierauf schließt sich die Phosphorylierung unter ATP-Verbrauch an C6 des ManNAc an, sodass ManNAc-6-Phosphat entsteht (Corfield et al. 1982). Diese beiden Schritte werden durch ein bifunktionales Enzym namens UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (GNE) katalysiert (Hinderlich et al. 1997). Dieses stellt das Schlüsselenzym dar, da das Endprodukt CMP-Neu5Ac über einen negativen

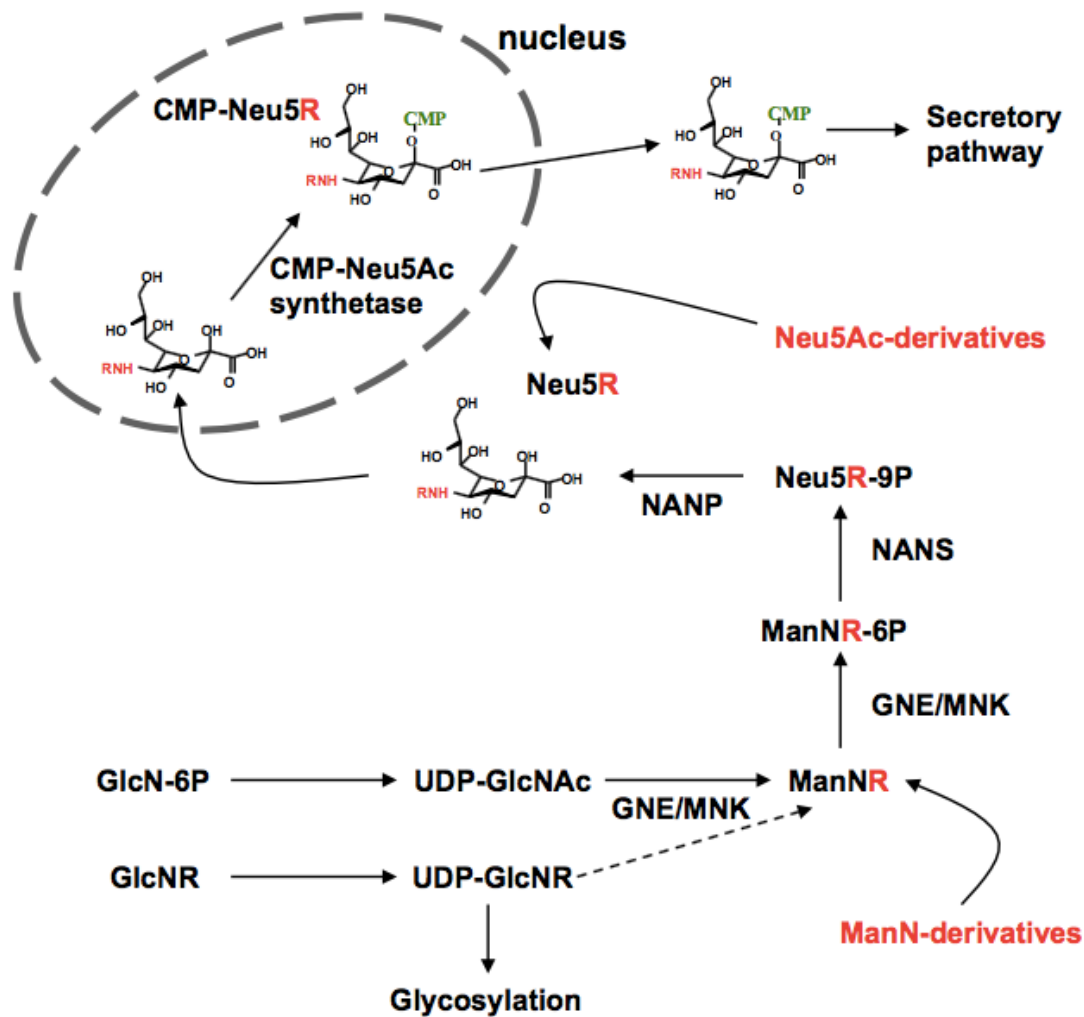


Abbildung 5 Sialinsäurebiosynthese bei Menschen

GNE/MNK, UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase; NANS, Neu5Ac-9-Phosphat-Synthase; NANP, N-Acetylneuraminat-9-Phosphatase. Modifiziert nach (Bayer et al. 2013) (CC-BY).

Feedback-Loop ihre Aktivität und damit die Biosynthese reguliert (Kornfeld et al. 1964). Anschließend wird mittels der Neu5Ac-9-Phosphat-Synthase ManNAc-6-Phosphat unter Verbrauch von Phosphoenolpyruvat zu Neu5Ac-9-Phosphat kondensiert. Eine spezifische Phosphatase spaltet hierauf die Phosphatgruppe ab, sodass Neu5Ac entsteht (Tanner 2005). Diese 4 Reaktionen spielen sich im Zytosol der Zelle ab. Schließlich muss das strukturell vollkommene Neu5Ac aktiviert werden, um auf Glykokonjugate transferiert werden zu können. Dies geschieht durch eine Reaktion mit Nukleotiden, wie Cytidintriphosphat (CTP), vermittelt durch das Enzym CMP-Neu5Ac-Synthetase. Während diese Aktivierung für alle anderen Monosacharide ebenfalls im Zytosol statt findet, wird die Neu5Ac-Aktivierung im Nucleus vollzogen (Kean 1991). Das daraus entstandene aktive CMP-Neu5Ac kann daraufhin über den spezifischen Transporter SLC35A1 (CMP-Neu5Ac-Golgi-Transporter) in den Golgi-Apparat

transferiert werden. Hier kann es zur Substitution der Hydroxylgruppen kommen, ehe es als Sialinsäuredonor für entstehende Glykokonjugate dient (Harduin-Lepers et al. 2001).

1.2.2.2 Sialyltransferasen

Der Transfer der Sialinsäuren auf Glykonkonjugate wird von Sialyltransferasen vollzogen. Diese sind transmembranäre Glykoproteine im trans-Golgi-Netzwerk (Harduin-Lepers et al. 2001, Patel et al. 2006). Ihre Gemeinsamkeit liegt in der Übertragung von Sialinsäuren auf unterschiedliche Akzeptormoleküle. Hierfür besitzen alle Transferasen die hoch konservativen Sialylierungsmotive (SiaM)-L (large) und (SiaM)-S (small), sowie (SiaM)-VS (very small). Erstere beiden binden die aktive Sialinsäure als Donor. (SiaM)-S ist zusätzlich für die Bindung des Akzeptors zuständig (Datta et al. 1995, Datta et al. 1998). Letztere Domäne ermöglicht die katalytische Aktivität des Enzyms (Kitazume-Kawaguchi et al. 2001). Als Akzeptormoleküle können auf der einen Seite vor allem Galaktose, GlcNAc und GalNAc verwendet werden, die über die Hydroxylgruppe α -glykosidisch mit den Sialinsäuren verbunden werden. Dies kann in C3-Position (α 2,3-Sialyltransferasen) oder in C6-Position (α 2,6-Sialyltransferasen) geschehen. Auf der anderen Seite können Sialinsäuren selbst als Akzeptormolekül vorkommen. So entstehen mittels α 2,8-Sialyltransferasen Sialinsäuredi- und oligomere (ST8Sia I, III, V, VI), aber auch Sialinsäurepolymere (Angata et al. 2000, Sato et al. 2000).

1.2.2.2 Polysialinsäuren

Die strukturelle Grundvoraussetzung für die Polysialylierung eines Glykans sind terminale Sialinsäuren, die α 2,3- oder α 2,6 glykosidisch mit Galaktose verbunden sind. Diese wiederum ist meist in β 1,4-Form an einem GlcNAc der zentralen Pentasacharid-Struktur Man3GlcNAc2 eines multiantenären N-Glykans verknüpft (Liedtke et al. 2001, von Der Ohe et al. 2002, Wuhler et al. 2003). Diese Basis wird schließlich durch die Polysialyltransferasen ST8SiaII und IV mittels Neu5Ac-Bausteinen in α 2,8-glykosidischer Bindung verlängert (Abb. 6) (Angata et al. 2003).

Diese Enzyme unterscheiden sich von den restlichen Sialyltransferasen durch ein zusätzliches Strukturmotiv (PST-Domäne), welches wahrscheinlich die Interaktion mit der naszierenden PolySia-Kette ermöglicht (Nakata et al. 2006). Hierbei zeigt ST8SiaIV eine größere Polymerisationstendenz (60 Monosialylreste) als ST8SiaII (40 Monsialylreste) *in vitro* (Kitazume-Kawaguchi et al. 2001, Angata et al. 2002). Die Polysialyltransferasen werden dabei den Umständen entsprechend unabhängig

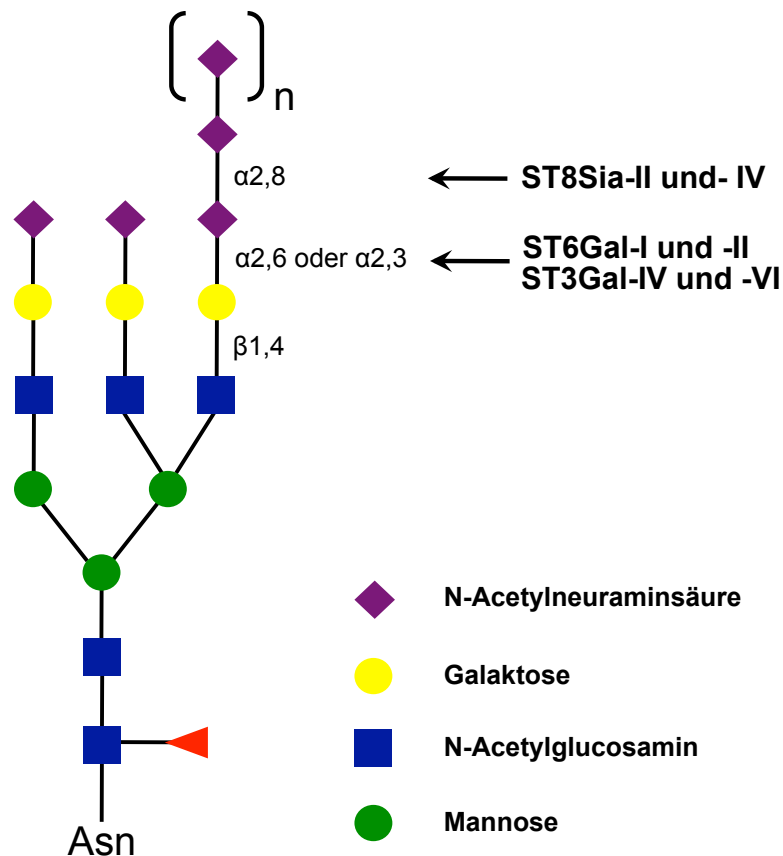


Abbildung 6 Schema eines polysialylierten N-Glykans

Die Abbildung zeigt ein diantennäres N-Glykan mit einer naszierenden PolySia-Kette. Es verdeutlicht die Ansatzpunkte der jeweiligen Sialyltransferasen. Erstellt nach (Bhide et al. 2017).

voneinander reguliert und exprimiert (Angata et al. 2003). Weiterhin können die Transferasen neben Glykokonjugaten auch die N-Glykane der Polysialyltransferasen selbst durch Autopolysialylierung polysialylieren (Muhlenhoff et al. 1996). Die Folgen einer Ausschaltung beider Transferasen in Mäusen leiten schließlich zur physiologischen Bedeutung von Sialinsäuren und PolySia über: Die Mäuse weisen schwere Defekte, vor allem im neuronalen System, auf und enden frühzeitig in einem letalen Phänotyp (Weinhold et al. 2005).

1.2.3 Physiologische Bedeutung

1.2.3.1 Sialinsäuren

Sialinsäuren beeinflussen als terminale Residuen auf Glykonkonjugaten maßgeblich die Interaktion von Zellen mit ihrer Umwelt (Abb. 7) (Angata et al. 2002, Schauer 2009).

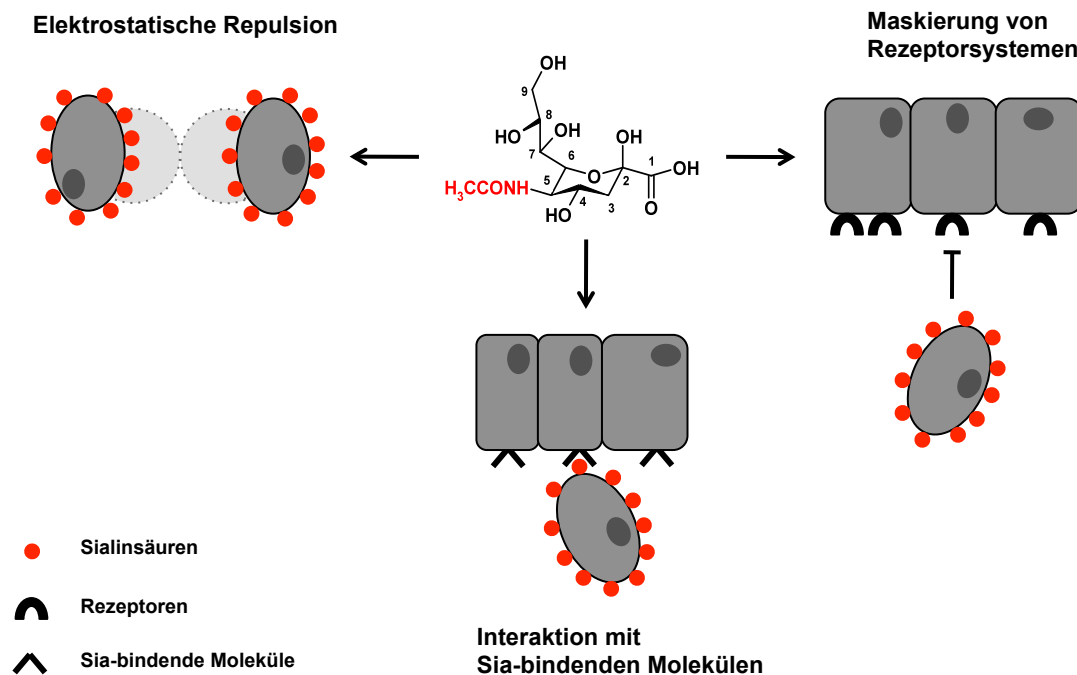


Abbildung 7 Schematische Darstellung der Funktionen von Sialinsäuren

Sialinsäuren (**Rot**) wirken neben ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften (**Oben links**) auch direkt durch ihre molekulare Struktur. So sind sie in der Lage Rezeptorsysteme, wie z.B. den bFGF-Rezeptor, zu maskieren (**Oben rechts**) oder aber mit bestimmten Molekülen, wie z.B. Selektinen zu interagieren (**Unten**). Abbildung erstellt nach (Martinez-Duncker 2013).

Dies beruht zum einen auf ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften. Sialinsäuren besitzen durch ihre C1-Carboxylgruppe einen sauren Charakter und versetzen dadurch Glykokonjugate in eine negative Ladung (Kelm et al. 1997, Schauer 2004). Zusätzlich werden durch gezielte Modifikationen, wie z.B. durch Acetylierung/Deacetylierung der funktionellen Gruppen weitere Bindungseigenschaften der Glykokonjugate modifiziert (Chen et al. 2006). Zum anderen beeinflussen Sialinsäuren biologische Signaltransduktionsmechanismen auf direkter molekularer Ebene. Hierbei können die Monosialylreste Rezeptorsysteme gänzlich maskieren (Bratosin et al. 1995) oder aber durch Interaktion mit Sia-bindenden Proteinen diverse Signalwege regulieren. Zu den Sia-bindenden Proteinen zählen vor allem Vertreter der Selektine. Selektine sind vor allem in Adhäsionsprozessen involviert (Bevilacqua et al. 1993). Nicht zuletzt regulieren Sialinsäuren als Bestandteil von Glykanen die Faltung,

Stabilität, sowie Halbwertszeit von Glykoproteinen auf Zellen und im Serum mit erheblichen Einfluss auf pathologische Zustände (Aminoff et al. 1977, Sillanauke et al. 1999, Piagnerelli et al. 2005, Sorensen et al. 2009).

1.2.3.2 Polysialinsäuren

PolySia ist aktuell als posttranslationale Modifikation von sieben Glykoproteinen bekannt. Hierzu zählen das Transmembranprotein CD36, welches in polysialylierter Form in humaner Muttermilch identifiziert wurde (Yabe et al. 2003), ein spannungsabhängiger Natriumkanal, der im adulten Rattenhirn isoliert werden konnte (Zuber et al. 1992), Neuropilin-2 als polysialyliertes Rezeptorprotein auf humanen dendritischen Zellen (Curreli et al. 2007), sowie das E-Selektin Ligand 1 in murinen Gliazellen (Werneburg et al. 2016). Weiterhin konnte in unserer Arbeitsgruppe das synaptische Adhäsionsmolekül SynCam1 im postnatalen Mäusehirn und die Polysialyltransferase ST8Siall im Sperma von Säugern detektiert werden (Galuska et al. 2010, Simon et al. 2013). Das neuronale Adhäsionsmolekül NCAM auf neuronalen und immunologischen Zellen stellt dabei das erste und best beschriebene polysialylierte Glykoprotein dar (Finne 1982, Finne et al. 1983, Muhlenhoff et al. 2009). An Hand dessen konnte maßgeblich die Bedeutung von PolySia nachvollzogen werden (Abb. 8):

Als Kette einzelner negativ geladener Sialinsäure-Reste verleiht PolySia dem Glykokonjugat eine vielfach höhere negative Gesamtladung als einzelne terminale Sialinsäuren. Dies führt zu stärkeren elektrostatischen Repulsionen homophiler polysialylierter Proteine, sodass Zelladhäsionsprozesse negativ beeinflusst und Zell-Zell-Interaktionen reguliert werden (Abb. 8) (Rutishauser et al. 1988, Fujimoto et al. 2001, Hinsby et al. 2004). Am Beispiel von NCAM kann je nach Polysialylierungsgrad die homophile Interaktion von zwei NCAM-Molekülen nur erschwert, völlig aufgehoben oder so ausgeprägt beeinflusst sein, dass auch andere Adhäsionsmoleküle, wie z.B. N-Cadherine beeinträchtigt werden (Yabe et al. 2003, Johnson et al. 2005). Dies wiederum könnte heterophile Interaktionen polysialylierter Proteine begünstigen (Hinsby et al. 2004).

PolySia wirkt nämlich nicht nur durch seinen repulsiven Charakter, sondern ist in der Lage direkt mit einigen nachgewiesenen Molekülen zu interagieren. Hierzu gehören Signalrezeptoren, wie z.B. die Glutamaterezeptoren N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) und α -Amino-3-Hydroxy-Methylisoxazol-Propionsäure (AMPA) (Vaithianathan et al. 2004, Hammond et al. 2006). PolySia-Bindung führt am NMDA-Rezeptor zu einer Abschwächung der Glutamat-induzierten Wirkung während am AMPA-Rezeptor die Wirkung verstärkt wird.

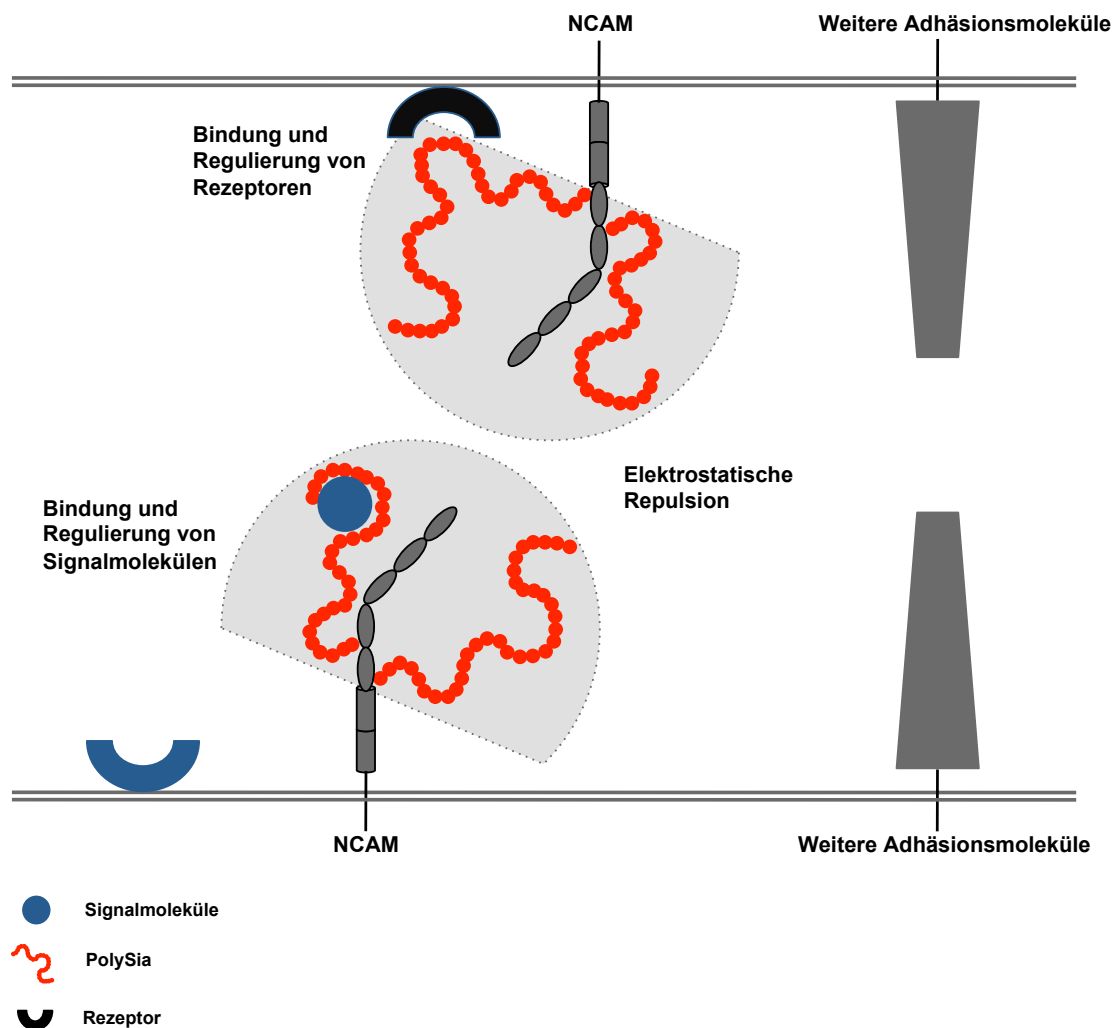


Abbildung 8 Übersicht der Funktion von PolySia an Hand von polysialyliertem NCAM.

PolySia führt zu vielfach höheren elektrostatischen Repulsionen von Glykoproteinen wie z.B. NCAM als Sialinsäuren (**Hellgraue Halbkreise**). Dies kann je nach Polysialylierungsgrad zur Beeinflussung weiterer Adhäsionsmoleküle führen (**Graue Zylinder**).

Des weiteren kann PolySia Rezeptoren (schwarzer Rezeptor), wie z.B. die Glutamaterezeptoren binden und so die Interaktion mit entsprechenden Liganden beeinflussen.

Nicht zuletzt kann PolySia auch auf direktem Wege Signalmoleküle (**Blauer Kreis**), wie z.B. bFGF binden und so deren Interaktion mit entsprechenden Rezeptoren (**Blauer Rezeptor**) regulieren. Abbildung erstellt nach (Sato et al. 2013).

Weiterhin konnten auch direkte Interaktionen mit Signalmolekülen, wie z.B. brain-derived neurotrophic factor (BDNF) oder basic fibroblast growth factor (bFGF) nachgewiesen werden (Kanato et al. 2008, Ono et al. 2012).

Zusammengefasst lässt sich PolySia als wichtiger Regulator von Adhäsions- und Signaltransduktionsmechanismen definieren, indem es Adhäsionsmoleküle maskiert und mit zahlreichen Molekülen interagiert. Dies wurde vor allem für die Neurogenese

und synaptische Plastizität von Axonen nachgewiesen (Bonfanti 2006, Rutishauser 2008). Neben dem großen Stellenwert im neuronalen System scheint PolySia allerdings von globaler Bedeutung zu sein.

PolySia-NCAM wurde unter anderem in der Entstehung verschiedenster weiterer Organsysteme, wie z.B. des Herzens, der Lunge, und des Magen-Darm-Trakts detektiert (Lackie et al. 1990, Lackie et al. 1991, Lackie et al. 1994, Galuska et al. 2017). Darüber hinaus sind auch Auswirkungen der Polysialylierung auf diverse pathologische Prozesse bewiesen. Das Metastasierungspotential von neuroendokrinen Tumoren z.B. wird durch die Existenz von PolySia verstärkt (Daniel et al. 2001).

1.3 Angiogenese

1.3.1 Allgemeiner Überblick

1.3.1.1 Physiologische Bedeutung und Ursachen

Die übergeordnete Funktion von Gefäßen ist die Zufuhr von Nährstoffen, Sauerstoff und parakrinen Hormonen, bei gleichzeitigem Abtransport von Metaboliten (Risau et al. 1995). Blutgefäße können sowohl in der Embryogenese (Def. Vaskulogenese), als auch im adulten Organismus entstehen (Risau 1997, Gerhardt 2008). Letzteres wird Angiogenese bezeichnet und definiert das Wachstum neuer Blutgefäße aus Bestehenden durch Sprossungsprozesse. Im gesunden Organismus ist dies bei einer Teilungsrate von 0,01% aller Endothelzellen selten (Carmeliet et al. 2000, De Smet et al. 2009) und geschieht z.B. im weiblichen Ovarialzyklus sowie in Wundheilungsprozessen (Risau et al. 1995, Risau 1997). Des Weiteren beobachtet man Angiogenese in diversen pathologischen Prozessen.

Bei der Entstehung letaler Neoplasien z.B. ist bewiesen, dass nicht die Zellentartung allein ausschlaggebend ist, sondern erst die Kombination mit einer Angiogenese-Induktion zu massivem Tumorwachstum und Metastasen-Potential führt, indem es bessere Nährstoffversorgung, sowie Ausschwemmung der Tumorzellen ermöglicht (Folkman 1971, Gimbrone et al. 1972, Eddy et al. 1973, Brem et al. 1976).

Dieser Prozess wird in der Onkologie „Angiogenic Switch“ genannt (Carmeliet et al. 2000, Folkman 2002). Es scheint, dass hierbei die genetische Mutation des Tumors das Gleichgewicht angiogenetischer Wachstumsfaktoren zu Gunsten der proangiogenetischen Seite verschiebt (Bouck et al. 1996, Streit et al. 1999, Hanahan et al. 2000). Durch diese Erkenntnisse wird heutzutage verstärkt ein gemeinsamer und vor allem spezifischerer „Kampf“ gegen Tumor- und Endothelzelle angestrebt (Rosen 2000, Folkman 2006). Dieses Prinzip angiogeentischer Wachstumsfaktor-Verhältnisse ist dabei nicht nur für Neoplasien wichtig, sondern stellt eine allgemeingültige Grundlage für die Initiierung angiogenetischer Mechanismen dar.

In nicht neoplastischen Erkrankungen z.B. können endogene Stressreaktionen wie hypoxische Zustände, aber auch inflammatorische Prozesse ebenfalls das Gleichgewicht von pro- und antiangiogenetischen Faktoren verändern und so zu rapidem Gefäßwachstum oder abnormen Remodelling führen (Folkman 1995, Carmeliet et al. 2000). Dies lässt sich in arteriosklerotischen Erkrankungen (pAVK) und COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung), genauso wie in Arthritiden und Psoriasis nachweisen (Pinedo et al. 1998, Coussens et al. 1999, Rabinovitch 1999, Carmeliet et al. 2000). Viele Krankheitsbilder verdeutlichen somit die klinische

Relevanz der Angiogenese und deren Potential als Angriffspunkt für Therapeutika (Ferrara et al. 1999, Isner et al. 1999, Streit et al. 1999, Carmeliet et al. 2000).

Es lässt sich zusammenfassen, dass neben genetischen Mutationen (Streit et al. 1999) endogene Stressreaktionen wichtige Ursachen für die Induktion der Angiogenese sind. Diese Ursachen beeinflussen pro- und antiangiogenetische Wachstumsfaktorkonzentrationen und initiieren darüber entsprechende Angiogenese-Mechanismen. Im Folgenden soll ein Überblick über diese grundlegenden Mechanismen gegeben werden.

1.3.1.2 Mechanismus der Angiogenese

Längst sind bei weitem noch nicht alle angio-stimulativen Wachstumsfaktoren bekannt. Innerhalb inflammatorischer Prozesse z.B. konnten in den letzten Jahren einige Mediatoren, wie z.B. TNF α (Tumornekrose Faktor α) identifiziert werden, die angiogenetisches Potential besitzen, indem sie nachweislich Endothelzellen aktivieren und die Angiogenese stimulieren bzw. prohibieren (Lokmic et al. 2006, Petrovic et al. 2007, Sainson et al. 2008). Am frühesten jedoch konnte erkannt werden, dass metabolischer Stress in Form einer unzureichenden Oxygenierung von Gewebe zu vermehrter Neovaskularisation führt. Die Arbeitsgruppe um Eli Keshet konnte 1992 schließlich beweisen, dass hierbei Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Hypoxie-abhängig induziert und dadurch das Verhältnis zu Gunsten proangiogenetischer Faktoren verschoben wird (Adair et al. 1990, Shweiki et al. 1992, Gerhardt 2008).

VEGF gilt seitdem als zentraler und best erforschtester proangiogenetischer Wachstumsfaktor (Ferrara et al. 2003, Ruhrberg 2003). Es bildet eine Gruppe aus 5 Liganden (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, Plazenta-Growth Factor), die u.a. von Endothel- und Tumorzellen exprimiert werden kann (Fukumura et al. 1998, Carmeliet et al. 2000). Sie binden an eine Gruppe dreier Rezeptoren (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3), die ausschließlich auf Endothelzellen existieren. Auf diese Weise steigert VEGF z.B. die vaskuläre Permeabilität (Murohara et al. 1998, Yla-Herttuala et al. 2007), verstärkt die Proliferations- und Migrationsrate von Endothelzellen (Gerhardt 2008, Dowlati 2010) und nimmt so eine zentrale Stellung im Mechanismus der Angiogenese ein (Ruhrberg et al. 2002, Gerhardt et al. 2003). Dieser Mechanismus besteht aus mehreren Schritten (Risau 1997, Gerhardt 2008):

- Endothelzelldifferenzierung zu Tip-, Stalk-, und Phalanx-Zellen
- Migration, Proliferation und Elongation der Gefäßsprossungen
- Fusion, Lumenbildung und Remodelling der Gefäßsprossungen

VEGF bildet hierbei einen essentiellen Konzentrationsgradienten, entlang dessen die Endothelzelldifferenzierung und diese Sprossungsprozesse statt finden (Abb. 9) (Ruhrberg et al. 2002, Gerhardt 2008). Dieser Gradient entsteht durch Transkriptionsregulation, die Vielfalt von gesplittenen Isoformen und Rezeptoren, sowie durch Cell-Surface-Retention und Interaktionen mit VEGF-bindenden Molekülen (Stone et al. 1995, Provis et al. 1997, West et al. 2005, Gerhardt 2008).

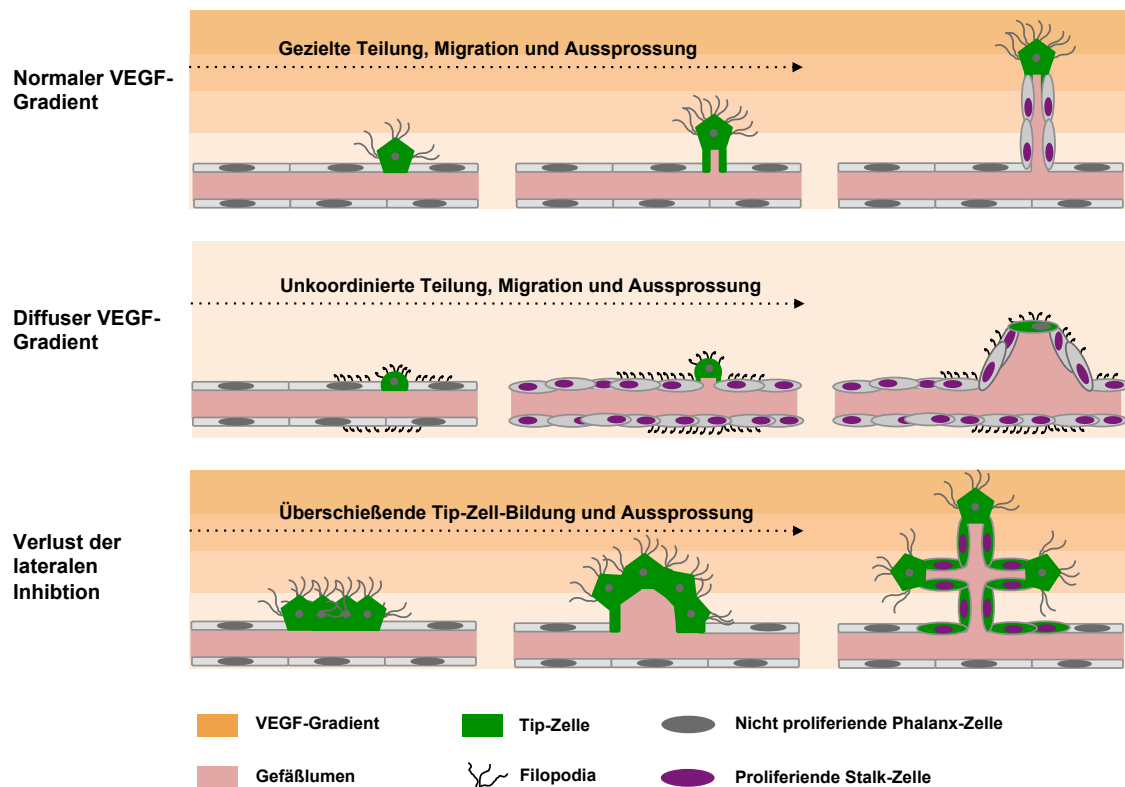


Abbildung 9 Schematische Darstellung der VEGF abhängigen Sprossungsprozesse

Ein gerichteter VEGF-Gradient (Orangene Abstufung) führt zur Induktion einer selektiven Tip-Zelle, die mit Hilfe von Filopodiae koordiniert entlang des Gradienten migriert. Gleichzeitig kommt es zur gezielten Ausbildung von Stalk-Zellen, die durch Proliferation die Sprossung verlängern und Lumen ausbilden. So entstehen lange und gezielte Gefäßaussprossungen.

Diffuse VEGF-Konzentration führt dagegen zur langsamen unselektiven Zelldifferenzierung und Zellteilung, die in kurzen atrophischen Gefäßsprossungen resultieren.

Ein Verlust der lateralen Inhibition durch z.B. Blockade des Dll4-Notch-Systems führt zu einer überschießenden Tip-Zell-Differenzierung mit exzessiven ungerichteten Gefäßaussprossungen. Abbildung erstellt nach (Gerhardt 2008).

Hohe VEGF-Level scheinen z.B. die Differenzierung von Endothelzellen zu Tip-Zellen zu induzieren (Hellstrom et al. 2007, Roca et al. 2007, Suchting et al. 2007). Diese Zelle steht an vorderster Front von Gefäßsprossungen und leitet die Migration entlang navigierender Stimuli (Ruhrberg et al. 2002, Gerhardt et al. 2003). Gleichzeitig initiieren

hohe VEGF-Level eine laterale Inhibition der Nachbarzellen, sodass diese zu so genannten Stalk-Zellen differenzieren und der Gefäßelongation, sowie Lumenformation dienen (Gerhardt 2008, De Smet et al. 2009). Dies wird dadurch vermittelt, dass die Tip-Zelle das Notch-Signalling-System der Nachbarzelle aktiviert (Ferrara et al. 2003, Roca et al. 2007, Dowlati 2010), wodurch der Haupt-VEGF-Rezeptor VEGFR-2 herunter reguliert und zusätzlich der VEGFR-1 Rezeptor, mit einer vielfach höheren Bindungsaffinität, als VEGF-Falle hochreguliert wird. Auf diese Weise scheint mittels des VEGF-Gradienten den Stalk-Zellen absichtlich VEGF entzogen zu werden und so eine gerichtete Angiogenese zu ermöglichen (Suchting et al. 2007, Boulton et al. 2008). Nach Ausbildung fertiger Gefäße und Netzwerke gehen die Endothelzellen in ruhende Phalanx-Zellen über, die einen stabilen Blutfluss gewährleisten (De Smet et al. 2009).

1.3.2 Einfluss von Sialinsäuren

Endothelzellen sind hierbei stark glykosyliert. Die Glykosylierung hat Einfluss auf viele der oben besprochenen Mechanismen der Angiogenese (Gitay-Goren et al. 1992, Stringer 2006, Xu et al. 2011). Abnorme Glykosylierungsmuster sind nicht nur Kennzeichen neoplastischer Gewebe, sondern triggern nachweislich die Tumor-Angiogenese und Metastasierung (Dall'Olio et al. 2001, Chen et al. 2011).

So konnte nachgewiesen werden, dass proangiogenetische Stimuli wie z.B. Hypoxie, TNF α und VEGF, die Glykosylierung der Zellen dynamisch modifizieren, indem sie auf transkriptioneller Ebene vor allem auch Glykosyltransferasen regulieren (Willhauck-Fleckenstein et al. 2010, Croci et al. 2014). VEGF führt z.B. zu einer Induktion der Sialyltransferase ST3Gal1. Es transferiert Neu5Ac-Reste auf die Oligosaccharide der Lewis-Antigene Le_x bzw. Le_A. Glykoproteine mit diesen Saccharidstrukturen wechselwirken mit Adhäsionsmolekülen, wie E-Selektin oder dem Integrin ICAM-1 und vermitteln dadurch Adhäsions- und Migrationsprozesse in der Angiogenese (McEver et al. 1995, Chen et al. 2011). Im Gegensatz dazu konnte eine Repression der Sialyltransferase ST6Gal1 beobachtet werden, die zu einer reduzierten Expression von α 2,6-verlinkten Sialinsäuren in Endothelzellen führte, wodurch z.B. die Bindung des Lektins Galektin-1 zu Endothelzellen erleichtert wurde (Willhauck-Fleckenstein et al. 2010, Croci et al. 2014). Galektin kann an unterschiedliche endotheliale Rezeptoren, wie z.B. VEGFR-2 und NRP-1, binden und dadurch etliche angiogenetische Prozesse, wie z.B. Endothelzell-Proliferation, -Migration und vaskuläre Permeabilität, beeinflussen (Hsieh et al. 2008, D'Haene et al. 2013, Wu et al. 2014). Eines der zahlreichen α 2,6-sialylierten Proteine auf Endothelzellen ist das Zelladhäsionsmolekül PECAM. Es

gehört zusammen mit VE-Cadherin und dem VEGF-Rezeptor 2 zu einem mechanosensorischen Komplex auf Endothelzellen (Tzima et al. 2005). Die $\alpha 2,6$ -verlinkten Sialinsäuren regulieren die homophile Interaktion der PECAM-Moleküle und beeinflussen darüber das Endothelzell-Überleben und die Angiogenese (Kitazume et al. 2010).

Aber auch weitere Rezeptoren, wie z.B. die FGF-Rezeptoren werden an ihren N-Glykanen sialyliert und darüber die Bindung des Wachstumsfaktor bFGF reguliert (Duchesne et al. 2006).

Schließlich beeinflussen terminale Sialinsäuren durch ihre negative Ladung auch die Lumenformation von Gefäßen. Sie verringern die Adhäsion von Endothelzellen *in vitro* und initiieren durch elektrostatische Abstoßung die Formation neuer Gefäßlumen (Abb. 10) (Strilic et al. 2010).

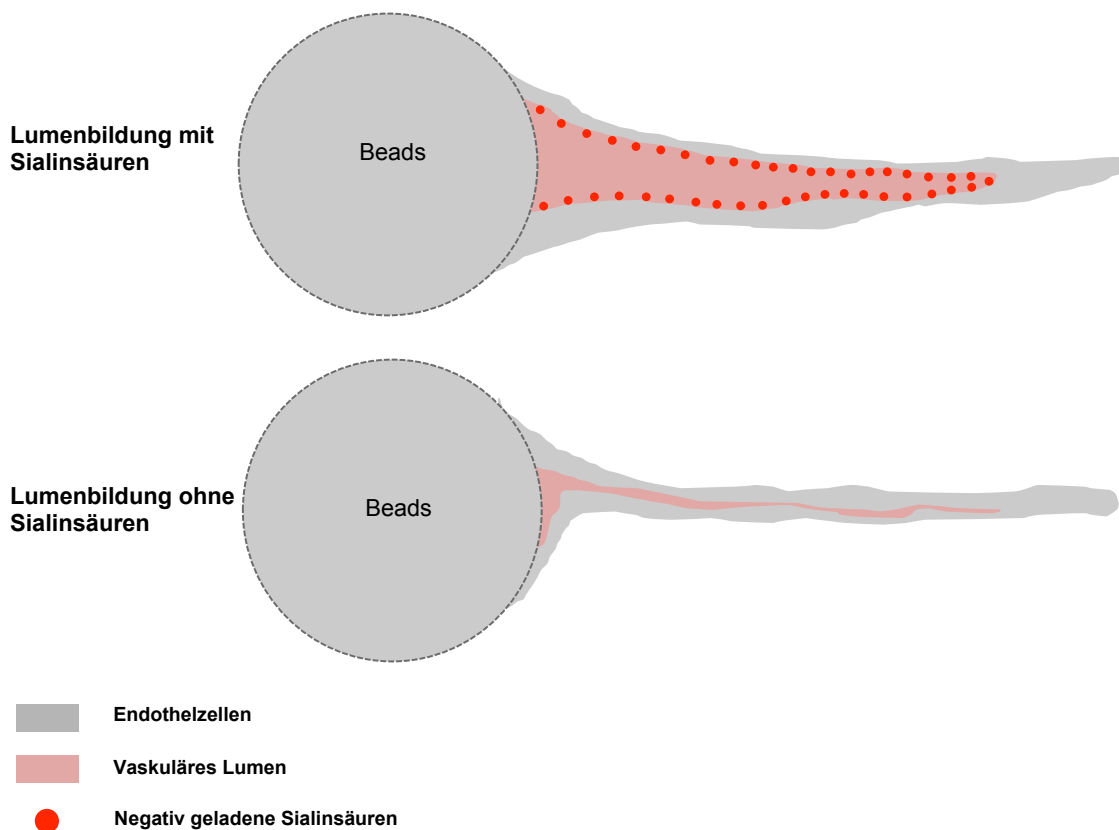
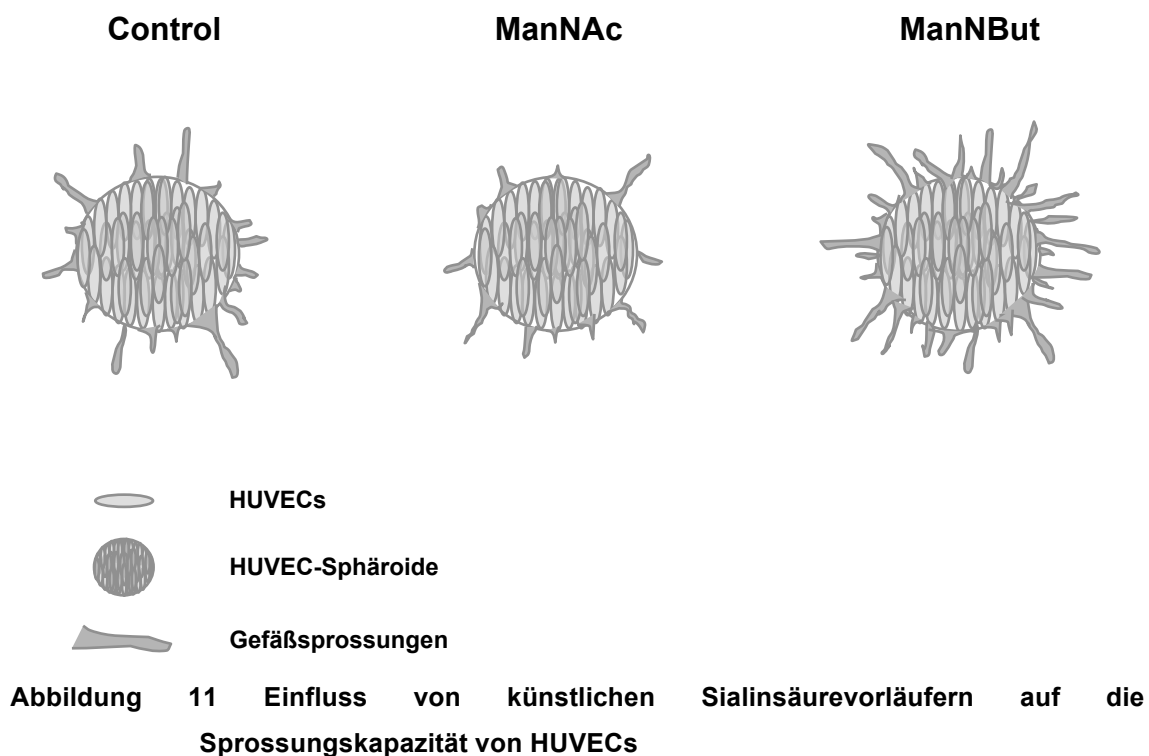


Abbildung 10 Darstellung des Einflusses von Sialinsäuren auf die Lumenbildung

Die negative Ladung von Sialinsäuren führt zu elektrostatischen Repulsionen und ermöglicht dadurch die Lumenformation in *in vitro* „SproutingAssays“. Eine Degradierung der Sialinsäuren durch das Enzym Neuraminidase dagegen resultiert in nahezu lumenlosen Aussprossungen (Strilic et al. 2010). Abbildung erstellt nach (Strilic et al. 2010).

In unserer Arbeitsgruppe konnte dieses Ergebnis um die Tatsache ergänzt werden, dass nicht nur die Ladung, sondern auch die spezifische Struktur der Sialinsäuren von Bedeutung sein könnte (Abb. 11). Hierfür wurden zuerst Sialinsäurevorläufer künstlich hergestellt und in HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) inkorporiert, sodass diese in die korrespondierenden Neu5R-Analoga metabolisiert und in Glykokonjugate eingebaut wurden. In einem SproutingAssay konnte schließlich gezeigt werden, dass der natürliche Sialinsäurevorläufer ManNAc die Sprouting-Kapazität reduziert, während ManNBut diese verstärkt. So vermutet man, dass die zusätzliche Ethylengruppe der Acyl-Kette die Interaktion zwischen Neu5But und akzessorischen Enzymen bzw. Rezeptoren behindert (Bayer et al. 2013). Zusammenfassend sind terminale Sialylierungen in etlichen Mechanismen der Angiogenese funktionell von Bedeutung.



Künstliche Sialinsäurevorläufer ManNAc oder ManNBut wurden in HUVECs inkorporiert. Darauf wurden aus den Zellen Sphäroide gebildet und in einem SproutingAssay die Sprossungskapazität analysiert. Im Vergleich zu Kontrollgruppe zeigte ManNAc eine Reduzierung der Sprouting-Kapazität während ManNBut diese stimulierte. Abbildung erstellt nach (Bayer et al. 2013).

1.3.3 Einfluss von Polysialinsäuren

Neben Sialinsäuren wurden auch PolySia auf Endothelzellen nachgewiesen. Naftolin und Mitarbeiter zeigten, dass polysialyliertes NCAM von Endothelzellen sowohl im Rattenhirn als auch in humanen Gefäßen von z.B. Gehirn, Lunge und Leber exprimiert wird (Park et al. 2010). An Hand von HUVECs beschrieben sie, dass polysialyliertes NCAM durch Estradiol induziert wird. Die Arbeitsgruppe vermutete, dass hierdurch die Adhäsion von Leukozyten am Endothel erschwert werden und dieser Mechanismus den kardioprotektiven Effekt von Estrogen vermitteln könnte (Park et al. 2010).

Neben NCAM existiert auf Endothelzellen noch das Glykoprotein NRP-2, das als Akzeptor der Polysialyltransferasen ST8Siall und IV beschrieben ist (Curreli et al. 2007). NRP-1 und 2 sind supportive Ko-Rezeptoren für die Rezeptorbindung von VEGF und bFGF (Soker et al. 1998, West et al. 2005, Ji et al. 2015). Eine Bindung von VEGF oder bFGF an Neuropilin verstärkt die Wirkung dieser Faktoren an ihren Hauptrezeptoren und modifiziert dadurch angiogenetische Prozesse (Geretti et al. 2008). Nichtsdestotrotz ist bisher eine Polysialylierung von Neuropilin in Endothelzellen nicht beschrieben worden.

Trotz der Nachweise ist bisher wenig über einen möglichen funktionellen Einfluss von PolySia in angiogenetischen Prozessen bekannt. Es gibt Hinweise, dass proangiogenetische Faktoren auch die Expression von Polysialyltransferasen in Endothelzellen modifizieren (Willhauck-Fleckenstein et al. 2010). Hinzu kommt, dass PolySia den proangiogenetischen Wachstumsfaktor bFGF direkt binden und darüber seine Konzentration, sowie seine Wirkung am Rezeptor regulieren kann (Ono et al. 2012).

Bisher wurden diese PolySia-Interaktionen und Trägerproteine zwar hauptsächlich innerhalb des neuronalen Systems erforscht, doch auch die starken Parallelen zwischen Neurogenese und Angiogenese lassen eine Übertragbarkeit der Hinweise für möglich erscheinen (Landmesser et al. 1990, Kater et al. 1995, Carmeliet et al. 2005). Insgesamt legt dies nahe, dass PolySia von funktioneller Bedeutung in der Angiogenese sein könnte und es deshalb lohnenswert erscheint deren Funktion und Bedeutung ausführlicher zu erforschen.

1.4 Ziel der Arbeit

Da HUVECs PolySia bilden (Park et al. 2010), entstand die Fragestellung, ob auch PolySia in HUVECs von funktioneller Bedeutung für spezifische Mechanismen in der Angiogenese ist.

Auf der oben besprochenen Grundlage sollte in der hier vorliegenden Arbeit die Existenz von PolySia auf Endothelzellen bestätigt und weiter erforscht werden. Im Mittelpunkt standen folgende Ziele:

- Lokalisation der Polysialylierung
- Detektion des polysialylierten Glykoproteins
- Bestimmung der dominanten Polysialyltransferasen
- Einfluss von angiogenetischen Wachstumsfaktoren auf die Polysialylierung
- Funktioneller Einfluss von PolySia auf Migrationsprozesse

2 Material und Methoden

2.1 Biologische Materialien

2.1.1 Zelllinie

HUVECs – Human umbilical vein endothelial cells.

In Kooperation mit der gynäkologischen Klinik des Universitätsklinikums Gießen konnten Nabelschnüre gesammelt und eigenständig als primäre Zelllinie isoliert werden. Dies wurde von der lokalen Ethikkommission mit der Referenznr. 132/9 “Verwendung von Nabelschnurmaterial (Endothelzellen, Blut) zu wissenschaftlichen Zwecken” verifiziert. Die Anträge sind in der medizinischen Fakultät der Justus-Liebig Universität Gießen hinterlegt.

2.1.2 Enzyme

Enzym	Eigenschaft	Referenz/Firma
Endoneuraminidase (EndoN)	Quelle: E.coli K1 Phage Detektiert α 2,8- verknüpfte Sialinsäuren ab einer Kettenlänge von 8 Resten und spaltet ein Oktamer in 3 und 5 Reste.	(Stummeyer et al 2005)
PNGaseF	Quelle: Flavobacterium meningosepticum Detektiert und spaltet zwischen dem innersten GlcNAc und Asparagin- Rest von N-verlinkten Glykoproteinen	Roche (Mannheim, Deutschland)

2.1.3 Antikörper

Primär-AK	Eigenschaft	Verdünnung: Westernblot/IF	Referenz
α -polySia (735)	mAk (Maus IgG2A) detektiert α 2,8- verknüpfte PolySia ab einer Kettenlänge von 8 Sialinsäureresten	1 μ g/ml / 20 μ g/ml	(Frosch et al 1985)
α -NCAM (123C3)	mAk (Maus IgG1) detektiert ein Epitop in den NCAM Exons 11- 13	1,5 μ g/ml / X	(Schol et al 1988, Gerardy-Schahn und Eckhardt 1994)
α -NRP-1 (C-19)	pAk (Ziege IgG) detektiert Peptide am C-Terminus von humanem NRP	0,25 μ g/ml / X	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
α -NRP-2 (C-9)	mAk (Maus IgG2b) detektiert Aminosäuren 560-858 von humanem NRP-2	0,25 μ g/ml / X	Santa Cruz Biotechnology
α -NRP-2 (H-300)	pAk (Kaninchen IgG) detektiert Aminosäuren 560-858 von humanem NRP-2	0,25 μ g/ml / X	Santa Cruz Biotechnology

Sekundär-AK	Konjugat	Verdünnung Westernblot/IF	Firma
pAk Ziege α -Maus Ig	HRP	0,26 μ g/ml / X	Dako, Agilent Technologies, Frankfurt am Main, Deutschland
pAk Kaninchen, α -Ziege Ig	HRP	0,13 μ g /ml / X	Dako, Agilent Technologies
pAk Schwein α - Kaninchen Ig	HRP	0,26 μ g/ml / X	Dako, Agilent Technologies
pAk Hühnchen α -Maus	Alexa488-Grün	X / 7 μ g/ml	Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Zellkulturzusätze

2.2.1 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Cell-Scraper	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Centrifugale Filter Devices 50kDA	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Filterpapier „Whatman-Paper“	Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland)
light sensitive Amersham Hyperfilm™	GE Healthcare (Solingen, Deutschland)
Mikrotiterplatten	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Molekulargewichtsmarker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (kDA) 250; 130;95;72;55;36;28	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Petrischalen	Greiner (Kremsmünster, Österreich)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
PVDF-Membran	GE Healthcare
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Mehrfachkulturplatten (Well-Platten)	Sarstedt
X-Well Zellkultur Objektträger	Sarstedt

2.2.2 Chemikalien

Verwendete Chemikalien wurden stets in p.a-Qualität von unterschiedlichen Firmen bezogen. Wasser wurde mittels einer Elix UV5 Anlage gereinigt und durch das “Milli-Q Ultra-pure water system” (Merck Millipore) analytisch rein aufbereitet. Fortwährend wird es als Aqua dest. bezeichnet.

2.2.3 Nährmedien und Zellkulturzusätze

Nährmedien, Seren, Reagenzien und Zusätze wurden ebenfalls nur von höchster analytischer Qualität von unterschiedlichen Firmen verwendet. Im Folgenden sind häufig verwendete Produkte aufgelistet. Alle weiteren werden innerhalb der Arbeit angegeben.

Reagenz	Firma
Endothelzell Basalmedium (ECBM)	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Endothelzell Vollmedium (ECGM)	Promocell
FCS	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Kollagenase (Type 2)	Worthington/CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen, Deutschland
Dulbeccos PBS	PAA Laboratories GmbH, Marburg, Deutschland
bFGF (human, E. coli)	Thermo Fisher Scientific
VEGF (VEGF-165, human, E. coli)	Promocell

2.3 Zellbiologische Methoden

Zellkulturtechnische Methoden wurden an einer Klasse 2 Sicherheitswerkbank der Firma Nunc (Langenselbold, Deutschland) in "aseptischer" Steriltechnik durchgeführt. Verwendete Reagenzien und Utensilien wurden entweder steril (durch Gamma-Strahlung sterilisiert) bezogen oder selbstständig sterilisiert. Hierfür wurden Lösungen mittels Millipore® Membranfilter (Merck Millipore, Porengröße 0,2µm) steril filtriert und Gebrauchsutensilien (Glas- und Edelstahlinstrumente) bei 500° C ausgeglüht bzw. autoklaviert.

2.3.1 Isolation und Kultur von human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)

Die Isolation von „Human umbilical vein endothelial cells“ (HUVECs) wurde gemäß der Vorgehensweise von Jaffe et al. durchgeführt (Jaffe et al. 1973). Die Nabelschnüre wurden nach der Geburt vom Säugling, sowie von der Plazenta getrennt und bei 4°C kühl gelagert. Unter sterilen Bedingungen wurden die Nabelschnüre von außen gesäubert, Endstücke wegen der Gefahr von Kontaminationen reseziert und daraufhin einseitig eine 14-gauge-Kanüle in die Umbilikalvene eingeführt und mittels Ligatur befestigt. Über diese wurde die Vene mittels einer Pufferlösung (Hanks´BSS, Thermo Fisher Scientific: 0,14 M NaCl, 0,04 M KCl, 0,001 M Phosphat, 0,011 M Glucose, pH 7,4) gespült und so von restlichem Blut befreit. Anschließend wurde die zweite Seite kanüliert und abgeklemmt. Jetzt konnte die 0,2%ige Kollagenase in Pufferlösung

(Hanks' BSS) eingespritzt werden, bis die Umbilikalvene prall gespannt war. Daraufhin folgte eine Inkubation bei 37° C für 20 min. Auf diese Weise lösen sich die Endothelzellen aus dem umbilikalen Bindegewebe. Hierauf wurde die Kollagenase-Zell-Suspension in ein 50 ml Falcon mittels ECBM + 20% FCS ausgespült, wodurch die enzymatische Reaktion beendet wird. Nach Zentrifugieren für 10 min bei 250 × g konnte der Überstand entfernt und das Zellpellet mit ECGM (inkl. 20% FCS) resuspendiert und in einer Petrischale ausgesät werden. Am folgenden Tag wurde durch zwei- bis dreimaliges Waschen mit PBS restliche Blut- und Gewebestandteile entfernt, die Aussaat begutachtet und schließlich frisches ECGM (inkl. 10% FCS) ausgelegt. HUVECs wurden stets in einem Brutschrank (Binder, Tuttlingen, Deutschland) bei 37° C und 5% CO₂ kultiviert und alle 2 Tage zweimalig mit temperiertem PBS gewaschen, sowie mit neuem Medium versehen.

Mit Erlangen einer konfluenten Zelllage wurden HUVECs wie folgt passagiert: Die Zellen wurden zweimalig mit temperiertem PBS gewaschen und daraufhin mittels Trypsin/EDTA-Lösung (2-4 ml / 75 cm²: 0,5 mg/ml Trypsin, 0,22 mg/ml EDTA in PBS gelöst) für 2 bis 3 min bei 37°C inkubiert. Bei ausreichender Zellablösung unter dem Mikroskop wurde die Reaktion mittels 10 ml ECGM (inkl. 10% FCS) abgestoppt, die Zellsuspension in einem 50 ml Falcon aufgefangen und bei 1.000 × g für 3 min zentrifugiert. Hierauf wurde der Überstand entfernt, das Zellpellet in 10 ml frischem ECGM (inkl. 10%FCS) resuspendiert und auf Petrischalen im Verhältnis von 1:3 bzw. 1:4 aufgeteilt und mit ECGM (inkl. 10% FCS) ergänzt. Dieses Prozedere fand weitere Anwendung, um HUVECs für Experimente in Mehrfachkulturplatten oder auf Objektträger zu transferieren.

Zum Ernten der Zellen für weitere Experimente wurde zuerst das Stimulationsmedium entnommen, bei 4°C für 30 min mit 20.160 × g zentrifugiert, um restliche Zellfragmente zu entfernen und mittels Zentrifugieren in Filtereinheiten (Amicon 50 kDa, Merck Millipore, 4°C, 7.500 × g, 10 min) ankonzentriert. Bis zur Verwendung wurde es in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80° C gelagert.

Nach dreimaligen Waschen der Zellen wurde eiskalter Lysepuffer (300 µl/Schale, siehe Zellhomogenisierung) hinzugegeben. Die Zellen wurden auf Eis mittels eines Zell-Scrapers abgelöst, in ein Eppendorf Cup überführt und direkt im Anschluss weiter homogenisiert und verarbeitet. Sollten die Zellen dagegen als Pellet eingefroren werden, wurden sie in eiskaltem PBS (1,5 ml/Schale) abgelöst, bei 20.160 × g und 4° C für 30 min zentrifugiert und schließlich in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80° C gelagert.

2.3.2 Zellzählung mittels Trypanblaufärbung und Zellzähler

Einige der folgenden Experimente wurden in Mehrfachkulturplatten durchgeführt. Hierzu mussten die kultivierten Zellen in solche transferiert und mit einer definierten Zellzahl in die Vertiefungen (fortan Well bezeichnet) ausgesät werden, um einen standardisierten Aufbau der Experimente gewährleisten zu können. Die Zellen wurden wie gewöhnlich mit PBS gewaschen, mittels Trypsin-EDTA von der Zellschale gelöst, zentrifugiert und in einem Volumen von 10 ml Medium resuspendiert. Für die Zählung wurde ein kleines Volumen der Suspension je nach Zelldichte 1:2 bis 1:4 mit Trypanblau verdünnt. Diese Mischung wird in spezielle Zählkammern infundiert und mittels eines Zellzählers (TC10™ Automated Cellcounter, BioRad, München) ausgelesen. Hierbei kann auch die Vitalitätsrate der Kultur beurteilt werden. Dies beruht darauf, dass der saure, anionische Farbstoff Trypanblau nur in tote Zellen eindringen kann und dort leicht an Proteine bindet und so diese Zellen anfärbt. Vitale Zellen dagegen können nicht angefärbt werden. Zellzahlbestimmungen wurden stets in Triplets durchgeführt und hiervon der Mittelwert genommen. Schließlich konnten die Zellen in Well-Platten ausgesät werden.

2.3.3 Inkubation von HUVECs mit verschiedenen Stimulantien

Grundlage für viele Experimente war die Stimulation von HUVECs mit Wachstumsfaktoren, wie VEGF oder bFGF, genauso wie die Degradierung von PolySia mit dem aktiven Enzym EndoN. Hierfür wurden die Zellen zweimalig mit temperiertem PBS gewaschen und schließlich das vorbereitete Stimulationsmedium ausgelegt. Dieses wurde aus ECBM und 0,5% FCS, sowie dem entsprechenden Wachstumsfaktor zusammengesetzt. Darauf folgte eine Inkubation bei 37° C für 24 h. Eine Ausnahme besteht, wenn das Medium als Überstand fortwährend untersucht wurde. Hier wurde mit ECBM ohne FCS-Zusatz stimuliert, um im FCS enthaltenes PolySia als Störfaktor auszuschalten. Folgende Konzentrationen der Wachstumsfaktoren wurden verwendet:

Wachstumsfaktoren/Enzyme	Konzentration
VEGF	50 ng/ml
bFGF	2 ng/ml
Aktive EndoN	1 µg/ml : Western Blot 1 µg/ml: MigrationAssay

Weiterhin wurden HUVECs mit den Sialinsäurevorläufern (peracylierte N-Acyl-Monosacharide) ManNAc und ManNBut stimuliert. Diese wurden in unserem Labor künstlich hergestellt, in Methanol gelöst und bei 4° C aufbewahrt (Konz.: 5 mM = 1 mg/ml) (Bayer et al. 2013). Vor Beginn der Zellpassage wurden in die neuen Zellkulturschalen je 100 µl der entsprechenden 5mM Sialinsäurevorläufer pipettiert, damit das Methanol vorzeitig verdunsten kann und somit die Zellen dadurch nicht geschädigt werden. Daraufhin wurden die Zellen 1:3 gesplittet, auf die vorbereiteten Platten passagiert ($6,03 \times 10^5$ Zellen/Schale) und auf 10 ml Gesamtvolumen mit ECGM (inkl. 10% FCS) ergänzt, sodass die Endkonzentration der Sialinsäurevorläufer 50 µM betrug.

Zellen und Überstände wurde daraufhin wie oben besprochen geerntet und weiter prozessiert.

2.4 Proteinanalytische Methoden

2.4.1 Zellhomogenisierung

Grundlage der Lyse und Homogenisierung war die Resuspension frischer oder gefroren gelagerter HUVEC Zellpellets in Lysepuffer. Dieser enthält folgende Bestandteile:

Lysepuffer	50 mM Tris/HCL-Puffer (pH 7.5) 1% Triton-X-100 5% Natrium- Deoxycholate 5 mM EDTA 150 mM NaCl 2 mM PMSF 1000 U/ml Aprotinin 1 mM Leupeptin
------------	---

Hierfür wurde dieser (300 µl/Schale) in eiskaltem Zustand zum Zellpellet gegeben. Bei stetiger Kühlung auf Eis wurde die Zell-Lysepuffer-Suspension mit Hilfe eines Ultraschallstabes („Sonifier“, Branson, Danbury, USA) weiter homogenisiert und anschließend bei 4° C auf einem Rüttler (750 rpm) für 24 h inkubiert. Daraufhin wurden die Proben bei 4°C mit $20.160 \times g$ für 1 h zentrifugiert und der flüssige Überstand von restlichen Zellfragmenten getrennt. Entweder wurden die homogenisierten Proben

direkt für Experimente verwendet oder aber mit flüssigem Stickstoff gefroren und bei -20° C gelagert.

2.4.2 Proteinbestimmung

Um unterschiedliche HUVEC-Proben miteinander vergleichbar zu machen, musste vor weiteren proteinanalytischen Methoden eine Proteinbestimmung erfolgen. Hierfür wurde ein Biuret-Assay-Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Als Kontrolle wurde eine BSA-Standardreihe in Lysepuffer mit folgenden Konzentrationen angesetzt: 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 und 25 µg/ml. Hierauf wurde die Reaktionslösung aus Reagenz A zu Reagenz B im Verhältnis 1:50 hergestellt und jeweils 200 µl in eine 96-Well-Platte vorgelegt. Zu messende Proben wurden entweder direkt oder in Verdünnung von 1:10 in Lysepuffer verwendet. Schließlich wurden je 25 µl Standard bzw. Probe hinzu pipettiert und bei 37° C für 30 min inkubiert. Es wurden jeweils 3-fach Bestimmungen durchgeführt. Mittels eines Micro-Plate Reader (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt und dementsprechend die Proteinkonzentrationen berechnet. Die Proteinkonzentrationen der Proben konnten auf diese Weise mittels Zugabe von Lysepuffer ausgeglichen werden.

Reagenz A	Na ₂ CO ₃ , NaHCO ₃ , Bicinchoninsäure, Natriumtartrat in 0,1 M NaOH
Reagenz B	4% Kupfersulfat

2.4.3 Isolierung polysialylierter Proteine

Um aus den homogenisierten und ausgeglichenen Proben polysialylierte Proteine zu isolieren, wurden die Methoden der Affinitäts- bzw. Immunpräzipitation angewandt. Das gemeinsame Prinzip besteht darin, dass in einem ersten Schritt magnetische Beads an einen Liganden gekoppelt werden, welcher in einem zweiten Schritt spezifische Antigene in der Probe bindet und diese mittels der magnetischen Beads separiert werden.

Für die Affinitätspräzipitation wurden magnetische tosylaktivierte Dynabeads® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) mit dem inaktiven Enzym EndoN gekoppelt (Konzentration: 30 mg/ml) (Schwarzer et al. 2009). Hierfür wurden 165 µl der gut resuspendierten Dynabeads in ein Eppendorf Cup überführt und in eine magnetische Halterung eingespannt bis alle magnetische Beads sich an der

Gefäßwand dem Magneten angelegt hatten. Dann konnte der Überstand entfernt und die Beads mit 500 µl Natrium-Phosphat-Puffer resuspendiert und gewaschen werden. Auf diese Weise verlief jeder der Wasch- und Aktivierungsschritte. Daraufhin wurde 100 µg inaktive EndoN zu 140 µl Natrium-Phosphat-Puffer gegeben und mit 10 µl Beads (Gesamtvolumen 150 µl) resuspendiert. Hierzu wurde 100 µl des Kopplungspuffer (3 M Ammonium-Lösung) gegeben und für 12-18 h bei 37° C inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und die Beads für eine weitere Stunde in 1 ml Blockierungspuffer (0,5% PBS-BSA) inkubiert. Anschließend wurden die Beads noch zweimal mit dem Blockierungspuffer gewaschen, ehe die aktivierten Beads in 240 µl 0,1 %igen PBS-BSA Puffer resuspendiert und bei -20° C mit einer endgültigen Konzentration von 20 mg/ml gelagert werden konnten.

Für die Aufreinigung wurden die aktivierten Beads zuerst zweimal mit je 500µl Waschpuffer 1 und darauf zweimal mit je 500µl Waschpuffer 2 gewaschen. Danach wurden sie in 240 µl Waschpuffer 2 resuspendiert. In dieser Form konnten die Dynabeads schließlich zu den Proben hinzugegeben werden. Hierbei wurden 120 µl Beads für eine maximale Probenmenge von 250 µl verwendet. Dann wurden die Proben für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Rüttler (750 rpm) inkubiert. Nach wiederum je zwei Waschschritten mit Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2 konnten die Proben mit je 50 µl Eluierpuffer resuspendiert und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert werden. Schließlich konnte nach einer weiteren Magnetisierung die aufgereinigte Probe in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und anschließend lyophilisiert (Jouan RC 10.22; Thermo Fischer Scientific) werden. So konnten die Proben entweder bei -20°C gelagert oder aber mittels Resuspension für weitere proteinanalytische Verfahren verwendet werden.

Waschpuffer 1	20 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 0,5 % (v/v) Triton-X-100
Waschpuffer 2	20 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl
Eluierpuffer	100 mM Triethylamin 150 mM NaCl

Bei der Immunpräzipitation handelt es sich um dasselbe Vorgehen. Magnetische tosylaktivierte Dynabeads wurden hierbei allerdings mit dem PolySia Antikörper 735 (mAk) gekoppelt. 50 µl Beads konnten hierbei bis zu 1.500 µl homogenisierte und ausgeglichene Probe aufreinigen. Diese wurden zweimal mit Waschpuffer 1

gewaschen und anschließend mit 10 µg PolySia Antikörper 735 in 200 µl PBS-T (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM KH₂PO₄, 4,3 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0,25% Tween20 (Polyoxyethylen(20)sorbitan-monolaurat)) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 2 weiteren Waschrissen mit Waschpuffer 1 konnten die aktivierten Beads zu den Proben gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubiert werden. Nach dreimaliger Waschung mit Waschpuffer 1 wurden die Beads in 100 µl Waschpuffer 1 resuspendiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Jetzt konnte mittels 20 µl Eluierpuffer die aufgereinigte Probe von den Beads gelöst werden. Hierfür inkubierte man die Proben für 2 min bei Raumtemperatur. Nach Magnetisierung konnte der Überstand entnommen und lyophilisiert (Jouan RC 10.22; Thermo Fischer Scientific) werden.

2.4.4 Enzymverdau

Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle Proteinproben als Doppelbestimmungen angesetzt, um eine Negativkontrolle mitzubestimmen. Hierbei wurden die Negativkontrollen mit dem aktiven Enzym EndoN versetzt. Diese ist eine spezifische Endosialidase, die α2,8-verknüpfte N-Acetylneuraminsäuren von PolySia abschneidet, bis PolySia-Ketten von maximal 7 Sialinsäureresten übrig bleiben. Die Folge ist, dass der spezifische PolySia-Antikörper mAk 735 nicht mehr binden kann, da es mindestens 8 Sialinsäureeinheiten bedarf (Frosch et al. 1985, Stummeyer et al. 2005). Das Enzym wird hierbei 1:250 in 50 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,5) vorverdünnt und 1 µl EndoN zu 10µl Probe hinzu pipettiert. Positivkontrollen wurden ausschließlich 1 µl 50 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,5) hinzugefügt. Schließlich inkubierten die Proben auf dem Rüttler (750 rpm) bei 37° C für 1 bis 2 h.

Weiterhin wurde N-GlycosidaseF (PNGaseF, New England Biolabs) als Enzymverdau verwendet. Dieses Enzym spaltet N-Glykane von Proteinen ab, während O-Glykane nicht freigesetzt werden können. Für den Verdau wurden lyophilisierte affinitätspräzipitierte HUVEC-Lysatproben bzw. -Überstandsproben verwendet, die daraufhin mit 13,5 µl Aqua dest. und 1,5 µl Glykoprotein-Denaturierungspuffer versetzt und bei 100° C im Wasserbad für 10 min aufgeköcht wurden. Nach Abkühlung fügte man 3 µl 10%ige NP-40 Puffer, 3 µl PNGaseF-Reaktionspuffer und 9µl Aqua dest. hinzu. Nach guter Resuspension wurden die Proben auf 2 Reaktionsgefäße a 15 µl aufgeteilt und entweder 3 µl PNGaseF oder 3 µl Aqua dest. (Kontrolle) hinzu pipettiert. Anschließend wurden die Proben bei 37° C für 2 h auf einem Rüttler (750 rpm) inkubiert, ehe mittels SDS-Gelelektrophorese und Westernblotting das Ergebnis visualisiert werden konnte.

Glykoprotein-Denaturierungspuffer	5% SDS, 0,4 M DTT (Dithiothreitol)
NP-40 Puffer	10 % NP-40 (Nonoxinol-40)
PNGaseF Reaktionspuffer	0,5 M Natriumphosphat pH 7,5

2.4.5 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese und das Westernblotting sind proteinanalytische Methoden, die es ermöglichen Proteine aus homogenisierten Gewebeproben aufzutrennen und sichtbar zu machen.

Bei der Gelelektrophorese findet die Auftrennung der Proteine durch Wanderung in einem elektrischen Feld statt. Hierbei migrieren die Proteine in einem Polyacrylamid Gel (Trenngel 10%; Sammelgel 3%), wobei größere Proteine stärker im Gel gebremst werden als kleinere. Zusätzlich trennen sich die Proteine nach ihrer Ladung auf und wandern so zur Anode oder Kathode. Um die Auftrennung nach Ladung auszuschalten und somit eine alleinige Trennung nach Molekulargewicht zu erreichen, gibt man die negative Detergenz SDS hinzu, sodass jedes Protein die gleiche negative Ladung besitzt und alle Richtung Anode wandern.

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

In unserem Labor wurde mit einem diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli gearbeitet, das auf der Schichtung zweier verschiedener Gele unter Verwendung von Tris-Glycin-Puffern beruht (Laemmli 1970).

Zur Herstellung zweier Gele wurde zuerst 10% Polyacrylamid-Trenngell angesetzt. Dafür wurden 2,9 ml Acrylamidlösung, 3 ml Trenngelpuffer, 6 ml Aqua dest. und 120 µl SDS-Lösung miteinander vermischt und für 2 min im Ultraschallbad entgast. Dann

kamen 120 µl frisch hergestellte APS-Lösung und 12 µl TEMED-Lösung hinzu. Nach ausgiebiger Durchmischung wurde das flüssige Gel in eine Gelgieß-Vorrichtung (BioRad, München, Deutschland) gegossen und mit Aqua dest. bedeckt. Hierbei wurde auf Blasenfreiheit geachtet. Nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur konnte das Aqua dest. gründlich entfernt werden, das 3% Polyacrylamid-Sammelgel daraufgegossen und die Probentrenn-Kämme eingeschoben werden. Zwei Sammelgele wurden hierbei aus 650 µl Acrylamidlösung, 1,25 ml Sammelgelpuffer, 3 ml Aqua dest., 50 µl frisch hergestellter APS-Lösung und 5 µl TEMED-Lösung zubereitet.

Die Proben wurden schließlich 1:1 mit einem Laemmli-Puffer verdünnt, der im Verhältnis von einem Teil Mercaptoethanol zu 20 Teilen Laemmli-Puffer (BioRad) zusammen gesetzt wurde. Nach einer Inkubation von 10 min bei 60° C im Wasserbad konnten je 10 µl pro Probe in die Geltaschen pipettiert werden. Als Referenz diente ein Proteinstandard (PageRuler Plus Prestained Protein, New England Biolabs). Zur Elektrophorese wurde das „Mini-Protean“ Elektrophoresesystem (BioRad) verwendet, in welches das Gel eingespannt und das System mit Laufpuffer gefüllt wurde. In einer ersten Phase von 15 min sammelten sich die Proben im Sammelgel unter einer Spannung von 50 Volt. In der zweiten Phase von 30 bis 60 min trennten sich die Proteine schließlich im Trenngel auf.

2.4.6 Western Blot

Nach der SDS-Gelelektrophorese und damit Auftrennung der Proteine schloss sich das Westernblotting an. Hierbei wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Membran mittels elektrischer Spannung transferiert. Dieser Transfer wird senkrecht zur Wanderungsrichtung der Proteine vollzogen, um das Abbild der Trennung auf der Membran zu konservieren. Die Proteine werden dabei durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden und können darauffolgend weiter verarbeitet werden, wie z. B durch Anfärbung, Sequenzierung oder Antikörperreaktionen. Man unterscheidet hierbei 2 große Systeme des Blottings:

1. Wet- oder Tankblotting
2. Semi-Dry Blotting

In unserer Arbeitsgruppe hat sich das Semi-Dry Blotting etabliert. Weiterhin unterscheidet man 2 häufig verwendete Sorten an verwendeten Membranen:

1. Nitrocellulose
2. PVDF (Polyvinylidendifluorid)

In unserer Arbeitsgruppe hat sich das Blotting auf PVDF-Membranen (GE Healthcare) durchgesetzt. Die Vorteile liegen in einer hohen Stabilität und Reißfestigkeit, sowie einem guten Kontrast von Signal zu Hintergrundrauschen bei Detektion mittels Chemiluminisierung.

Transferpuffer	39 mM Glycin 48 mM Tris 20% (v/v) Methanol
----------------	--

Nach Inkubation des fertigen SDS-Elektrophorese-Gels in Transferpuffer für 10 min wurde es in einer Blottingvorrichtung (Trans-Blot® SD, Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, BioRad) vertikal wie folgt gestapelt:

1. Whatman-Filterpapier, zuvor in Transferpuffer getränkt
2. PVDF-Membran, zuvor in 100% Methanol, anschließend in Transferpuffer gewaschen
3. SDS-Gel
4. Whatman-Filterpapier, zuvor in Transferpuffer getränkt

Hierbei wird darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen Gel und Membran liegen. Schließlich wurde mit einer Spannung von 1 mA/cm^2 Blotpapier geblottet.

2.4.7 Immunfärbung und Entwicklung von Western Blots

Nach dem Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran, wurde diese für 24 h bei 4°C in einem Blockpuffer (Roti-Block®, Roth) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran für mindestens 2 h bei Raumtemperatur im Primärantikörper (siehe 2.1.2 Antikörper) inkubiert, daraufhin erneut dreimal mit Blockpuffer für je 10 min gewaschen, ehe diese im HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe 2.1.2 Antikörper) für 1 bis 2 h bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach dreimaligen Waschen mit Blockpuffer und zweimaligen Waschen mit PBS-T konnte die frisch angesetzte Chemiluminiszenz (Thermo Fisher Scientific; Teillösung 1 und 2 im Verhältnis 1:1) für 10 min unter Lichtabschluss zu der Membran hinzugefügt werden. Alle folgenden Schritte wurden unter Rotlicht im Fotolabor durchgeführt. Nach Abzug der überschüssigen Chemiluminiszenz wurde sofort ein Detektionsfilm (light sensitive Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare Limited) auf die Membran gelegt und je nach Bedarf zwischen 1 s und 10 min belichtet. Zum Schluss konnte der Film entwickelt und fixiert werden.

2.4.8 Peptidmassenfingerabdruck

Zur Identifizierung des polysialylierten Trägerproteins wurde das Verfahren des „peptide mass fingerprint“ eingesetzt. HUVECs wurden wie weiter oben beschrieben lysiert, homogenisiert und mittels Affinitätspräzipitation aufgereinigt. Anschließend folgte eine Gelelektrophorese in einem 7,5%igen Fertiggel (BioRad) und ein Westernblot gegen PolySia. Die Gelareale der PolySia-Signale wurden daraufhin ausgeschnitten und gemäß dem „In-Gel Digestion Protocol for Low Protein Amounts“ (Promega, Mannheim, Deutschland) behandelt. Dies beinhaltete zuerst die Reduktion und Carbamidomethylierung der Proteine, sowie einen Trypsin-Verdau, ehe die Peptide aus dem Gel isoliert werden können.

Die extrahierten Peptide wurden daraufhin mittels einer C18-Säule (PepMap, 3 µm, 75 µm × 100 mm; Dionex, Idstein, Deutschland) und einem nanoLC System (Linearer Gradient: 5% Acetonitril/ 0,1% Ameisensäure bis 60% Acetonitril/ 0,1% Ameisensäure; Flussrate 0,4 ml/min; Gradientenlaufzeit: 45 min ; Dionex, Thermo Fsher Scientific) aufgetrennt und auf ein matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF)-Stahltarget (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) aufgetragen. Hierbei wurde es 1:2 mit einer 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)-Matrix (1,5 mg DHB/ml, 1% Phosphorsäure, 50% Acetonitril) versetzt. Das hierbei isolierte Peptidmuster wurde mit Hilfe eines MALDI-TOF Massenspektrometers (MS) (Ultraflex 1 TOF/TOF MS; Bruker Daltonics) gemessen und über das Softwareprogramm Mascot (Perkins et al. 1999) und die Datenbank IPI-human (<http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhumasn.html>) ausgewertet

2.5 Histologische Methoden

2.5.1 Zellfixierung

HUVECs wurden hierfür auf Zellkultur-Objektträgern (X-Well Cell culture object slides, Sarstedt) ausgesät und entweder unstimuliert oder stimuliert verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit temperiertem PBS gewaschen (500 µl/Well) und anschließend mit eiskaltem 70% Ethanol für 30 min fixiert.

2.5.2 Immunfluoreszenzfärbung

HUVECs wurden anschließend zweimal mit 1% PBS/BSA (500 µl/Well) gewaschen und mit 1% PBS/BSA (500 µl/Well) für 1 h bei 37° C inkubiert, um unspezifische

Bindungen zu blockieren. Als Negativkontrolle wurde dem Blockpuffer aktive EndoN hinzugefügt (7 µg/ml).

Zur singulären Anfärbung von PolySia wurden die Zellen im Primär-Antikörper 735 (mAk 20 µg/ml in 1% PBS/BSA) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 Waschrissen mit je 500 µl PBS pro Well wurde der Sekundär-Antikörper (Alexa488 IgG, 7 µg/ml in 1% PBS/BSA) hinzu pipettiert und für 45 min bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss inkubiert. Zum Ende hin wurde wiederum dreimal mit PBS gewaschen, ehe das Well-System von dem Objektträger abgenommen wurde, ein sparsamer Tropfen Vectashield inklusive DAPI auf den Objektträger geträufelt wurde und mit einem Glasdeckel bedeckt wurde. Die Objektträger wurden unter Lichtabschluss bei 4° C gelagert und mittels eines konfokalen laser-basierten Mikroskop (Zeiss LSM 510 Meta, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet.

2.6 RT-PCR

Die Reverse Transcription-Polymerase-Chain-Reaction (PCR) dient wie eine konventionelle PCR der Amplifizierung einer spezifischen DNA-Doppelstrangsequenz, um auf diese Weise Gensequenzen in Zellen neu zu identifizieren, nach zu weisen oder zu charakterisieren. Als Ausgangssubstrat wird jedoch RNA und nicht DNA verwendet

Hierfür wird zuerst mRNA aus den entsprechenden Zellen isoliert und mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA transferiert. Diese kann dann als Ausgangssubstrat für den herkömmlichen PCR-Prozess verwendet werden. Dieser besteht aus 3 aufeinander folgenden Schritten:

1. Denaturierung
2. Anknüpfen der Primer
3. Verlängerung zu DNA-Doppelsträngen

Im ersten Schritt wird bei 90° C die cDNA denaturiert und danach auf 50° C abgekühlt. Im nächsten Schritt werden die sogenannten Primer, Oligonucleotide aus 15 bis 25 Basen hinzugegeben, die sich am 5'-Ende komplementär zur spezifischen Sequenz anheften. Schließlich wird durch Zugabe einer thermostabilen DNA-Polymerase und Desoxyribonucleotiden als DNA-Bausteine die spezifische Sequenz zum DNA-Doppelstrang verlängert. Durch mehrfache Wiederholung dieses Zyklus amplifiziert sich die spezifische Sequenz exponentiell. Mittels einer Gelelektrophorese können die Amplifikationen visualisiert werden.

Die RNA-Isolation wurde mit Hilfe des „RNeasy Plus Mini Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die Zellen wurden mit RLT-Puffer lysiert, anschließend mittels eines Ultraschallstabes für 2 bis 3 min homogenisiert und 1:1 mit 70% Ethanol resuspendiert. Anschließend wurde das Lysat in einer RNeasy-Aufreinigungssäule bei $8.000 \times g$ für 15 s zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dies wurde zuerst mit 700 μ l RW1-Puffer, dann mit 500 μ l RPE-Puffer unter gleichen Bedingungen wiederholt. Darauf folgte ein zweiter Waschschriff mit 500 μ l RPE-Puffer für 2 min bei $8.000 \times g$. Schließlich konnte die isolierte RNA mittels 30 bis 50 μ l RNase-freies Aqua dest. aus der Aufreinigungssäule in ein neues Reaktionsgefäß gespült werden. Die RNA wurde bei -20°C gelagert.

Im nächsten Schritt wurde die cDNA synthetisiert. Nach photometrische Messung der RNA-Konzentration und Ausgleich mittels RNase-freiem Aqua dest. wurde die RNA mittels eines DNase-Kits (Fermentas Life Science, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) von etwaiger DNA befreit. Hierfür wurden in ein RNase freies Reaktionsgefäß 1 μ l isolierte RNA, 1 μ l $10 \times$ Reaktionspuffer, 1 μ l (1u) DNase 1 und DEPC-behandeltes Aqua dest. pipettiert und anschließend 30 min bei 37°C in einem Thermocycler (T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen Deutschland) inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch eine weitere Inkubation für 10 min bei 65°C unter Zugabe von 1 μ l 50 mM EDTA gestoppt. Schließlich wurden die Proben für 2 min auf 4°C herunter gekühlt, ehe mit Hilfe des iScript™ Synthese Kit (iScript™ Kit, BioRad) die cDNA synthetisiert wurde. Hierfür wurden in einem Reaktionsgefäß 4 μ l 5x iScript Reaktions-Puffer, 1 μ l iScript Reverse Transcriptase, 4 μ l Nuclease-freies Aqua dest. und 11 μ l RNA-Probe zusammen pipettiert und nach folgendem Schema im Thermocycler inkubiert:

1. 5 min bei 25°C
2. 30 min bei 42°C
3. 5 min bei 85°C

Die cDNA wurde auf 4°C heruntergekühlt und als stabiles Produkt bei -20°C eingefroren. Als Negativ-Kontrolle wurde eine cDNA-Probe mit 1 μ l Nuclease-freiem Wasser anstatt Reverser Transkriptase inkubiert.

Zuletzt wurde die cDNA gemäß des OneTaq® DNA-Polymerase Kit (New England Bio Labs) amplifiziert. Es wurden Primer für die Polysialyltransferasen ST8SialI und ST8SialIV, sowie für das House-Keeping-Gen GAPDH verwendet:

GAPDH	for: 5'-AGTCAACGGATTTGGTCGTA -3' rev: 5'-ACCATGTAGTTGAGGTCAATGAAG -3'
ST8Siall	for: 5'-CCAGCTGTTGTTGACAGAAGTAA -3' rev: 5'-TAAATCTGCTTCCTGATCCTC -3'
ST8SialV	for: 5'-CTTCCAGCACAATGTAGAAGGTTG -3' rev: 5'-GCTCTTGACCACTGACACATCTC -3'

Hierfür wurden 10 µl 5x One Taq® Standard-Reaktionspuffer, 1 µl 10 mM dNTPs (Endkonz.: 200 mM, New England Bio Labs), 1 µl 10 µM Forward Primer (Endkonz.: 0,2 µM), 1 µl 10 µM Reverse Primer (Endkonz.: 0,2 µM), 0,3125 Units One Taq® DNA Polymerase, 5 µl cDNA-Probe und 31,75 µl Nuklease-freies Aqua dest. unter stetiger Kühlung auf Eis zusammen pipettiert, gut resuspendiert und in einem Thermocycler (T3 Thermocycler, Biometra) wie folgt inkubiert:

1. Initiale Denaturierung: 30 s bei 94° C
2. 40 Zyklen: : 30 s bei 94° C
60 s bei 52° C
60 s bei 68° C/kb
3. Endgültige Extension: 5 min bei 68° C

Anschließend wurden die Proben auf 4° C heruntergekühlt und so gelagert.

Mit Hilfe einer Agarosegel-Elektrophorese wurde das Ergebnis visualisiert. Zuerst wurden 1,5 %ige Agarose-Gele aus 0,75 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer (TAE 50×: 2 M Tris/HCl pH 8, 57,1 ml Essigsäure, 0,05 M EDTA; 200 ml in 10 l Aqua dest.) und 2 µl Ethidiumbromid gegossen. Nach dem Gießen und Aushärten der Gele konnten diese in der Elektrophorese-Kammer (BioRad) eingespannt und mit TAE-Puffer bedeckt werden. Schließlich wurde je 20 µl Probe mit 2 µl Loading-Puffer (DNA Loading-Dye, Thermo Fisher Scientific) resuspendiert und in die Geltaschen pipettiert werden. Als Kontrolle wurde ein Basenpaar-Standard verwendet (1 Kb GenRuler, Thermo Fisher Scientific). Nach der Elektrophorese unter einer Spannung von 90-120 V für 50 bis 60 min konnte das Gel in eine Photokammer (Intas Typ Science Imaging, Göttingen, Deutschland) transferiert und unter UV-Belichtung ausgewertet werden.

2.7 Migration Assay

Um die Migrationsfähigkeit von HUVECs zu untersuchen wurde ein Scratch Assay durchgeführt (Liang et al. 2007, Kramer et al. 2013). Grundlage waren konfluent gewachsene HUVECs, die nach oben beschriebenen Prozedere auf 12 Well-Platten

(200.000 Zellen/Well) transferiert wurden. Vor Aussaat wurden die 12 Well-Platten mittels einer Schablone und einem dünnem wasserfestem Stift markiert. Hierbei wurden am Unterboden jedes Wells Punkte generiert, die später ein einheitliches, kontrolliertes Verletzen des Zellrasens im Zentrum des Wells, sowie in der Länge der Wunden ermöglichten. Weiterhin ermöglichte es später Photos an der immer gleichen Stelle der Wunde zu machen. Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens auf den Platten wurden die Zellen in einen Ruhezustand (steady state) versetzt, indem die Zellen nach zweimaliger Waschung mit temperiertem PBS (1 ml/Well) für 24 h in ECBM mit 0,5% FCS (1,5 ml/Well) bei 37°C inkubiert wurden. Das Fehlen von Wachstumsfaktoren, sowie die starke Verringerung des FCS hat zur Folge, dass die Zellen sich durch weniger Wachstumsstimuli nicht mehr teilen. Dadurch wurde gewährleistet, dass später der künstlich erzeugte, zellfreie Raum nicht durch normale Zellteilung sondern durch Zellmigration geschlossen werden würde.

Nach der Inkubation wurden schließlich mit Hilfe einer 200 µl Pipettenspitze die Wunden in jedem Well gesetzt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Pipettenspitze leicht angewinkelt und in gleichmäßiger Bewegung durch den Zellrasen gezogen wird, um so Wunden mit glatt begrenzten Rändern zu produzieren. Hierauf wurden die Zellen ein Mal mit temperiertem PBS (1 ml/Well) gewaschen und anschließend ECBM mit 0,5% FCS (1,5 ml) entweder mit oder ohne aktiver EndoN (1 µg /ml) ausgelegt. Die EndoN wurde 1:100 in PBS vorverdünnt und steril filtriert. Negativkontrollen wurde nur PBS hinzugesetzt.

Direkt im Anschluss wurden Bilder mit einem inversen Zellkulturmikroskop (Firma Hund, Wetzlar, Deutschland, 40fache Vergrößerung) zur Stunde 0 gemacht und 24 Stunden später wiederholt.

Die zellfreien Areale wurden mit Hilfe eines Computerprogramms (Motic Picture Advanced, Wetzlar, Deutschland) als Fläche gemessen und die relative Migrations-Kapazität berechnet.

Zur statistischen Analyse wurde mit Hilfe von GraphPad Prism Version 7.03 ein Student-T Test durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde als $p < 0,05$ definiert. Signifikante Differenzen wurden wie folgt definiert:

*	$p < 0,05$
**	$p < 0,01$
***	$p < 0,001$
****	$P < 0,0001$

3 Resultate

3.1 Polysialylierung von HUVECs

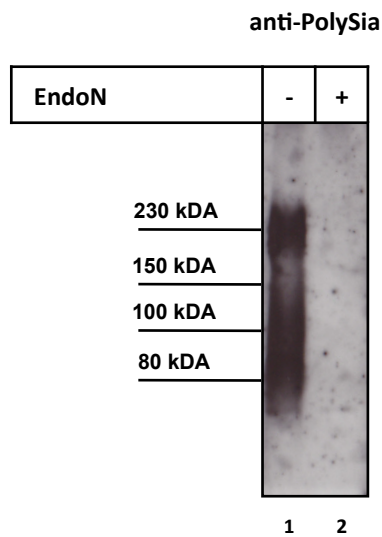
Um PolySia innerhalb angiogenetischer Prozesse nachzuweisen und deren Funktion, sowie Bedeutung zu erforschen, wurden Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) als methodische Grundlage verwendet. Diese Zelllinie stellt ein etabliertes Zellkulturmodell für die Erforschung von Endothelzellen und Mechanismen der Angiogenese dar (Jaffe et al. 1973, Park et al. 2006, Jimenez et al. 2013).

Naftolin und Mitarbeiter konnten bereits 2010 polysialyliertes NCAM auf HUVECs nachweisen. Sie beschrieben eine Östradiol induzierte PolySia-NCAM-Expression (Park et al. 2010). Auf dieser Basis sollte zuerst der Nachweis von PolySia auf HUVECs mittels Westernblot-Analyse bestätigt werden. Daraufhin sollte die PolySia-Synthese, sowie deren Lokalisation genauer charakterisiert werden, ehe nach PolySia-abhängigen Mechanismen in HUVECs gesucht wurde.

3.1.1 PolySia-Nachweis in HUVECs

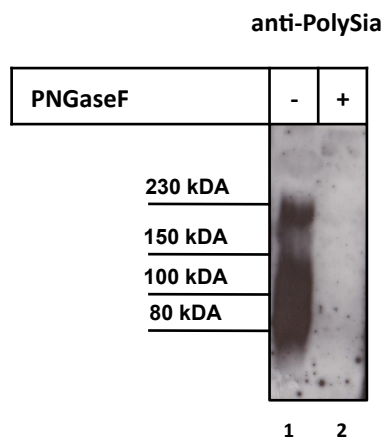
HUVECs wurden gemäß Jaffe et al aus humanen Nabelschnüren isoliert und kultiviert (Jaffe et al. 1973). Nach Zellernte und Homogenisierung wurden vor allen weiteren Experimenten die Proteinkonzentrationen der unterschiedlichen Proben mittels BCA-Methode bestimmt und ausgeglichen, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Das so erhaltene Lysat wurde daraufhin mittels Gelelektrophorese und Westernblot-Analyse aufgetrennt. Abbildung 12 zeigt einen Westernblot aus HUVEC-Direktlysat, welches durch einen spezifischen, monoklonalen Antikörper gegen PolySia (mAk 735) visualisiert wurde. Als Negativkontrolle wurde ein zusätzlicher Verdau mit dem Enzym EndoN durchgeführt.

Der Westernblot in Abbildung 12 zeigt in Spur 1 zwei Signale in Form des typisch-diffusen PolySia-Schmiers. Diese erstrecken sich im Molekularbereich um 230 kDa sowie zwischen 80 und 150 kDa. Die Spezifität dieser Signale wird durch den EndoN-Verdau in Spur 2 bestätigt. Hier wurde kein Signal detektiert. Dieses Ergebnis konnte durch 9 Replikate verifiziert werden. Insgesamt wird hierdurch die Synthese von PolySia in HUVECs bestätigt.

**Abbildung 12 Westernblot-Nachweis von PolySia in HUVECs**

Das HUVEC-Lysat wurde unbehandelt (Spur 1), sowie nach enzymatischem Verdau mit EndoN (Spur 2) mittels Gelelektrophorese und Westernblot aufgetrennt und durch einen monoklonalen anti-PolySia-Antikörper (mAk 735) visualisiert. Molekulargewichte sind in kilo Dalton (kDA) angegeben.

Im Nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die detektierten PolySia-Ketten über N- oder O-Glykane mit dem unbekannten Glykoprotein verlinkt sind.

**Abbildung 13 Analyse der polysialylierten Glykosylierungsform im HUVEC-Lysat**

HUVEC-Lysat wurde sowohl unbehandelt (Spur 1) als auch nach Verdau mit dem Enzym PNGase F (Spur 2) mittels Westernblot-Analyse aufgetrennt und anschließend mit einem monoklonalen anti-PolySia-Antikörper (mAk 735) visualisiert. PNGase F spaltet hierbei nur polysialylierte N-Glykane des Trägerproteins ab, jedoch keine O-Glykane.

Hierfür wurde ein Enzymverdau mit PNGase F durchgeführt, welches nur N-glykosidisch gebundene Glykane abspaltet. Die HUVEC-Proben wurden erneut mittels Gelelektrophorese, Westernblot und Antikörperfärbung gegen PolySia analysiert. Abbildung 13 zeigt in Spur 1 dieselben zwei PolySia-Signale, während der Enzymverdau mit PNGaseF in Spur 2 signallos verbleibt. Hierdurch wird bestätigt, dass die nachgewiesenen PolySia-Ketten in HUVECs über N-Glykane mit dem Trägerprotein verbunden sind.

3.1.2 Lokalisation von PolySia in HUVECs

Nach Bestätigung des PolySia-Nachweises in HUVECs sollte diese innerhalb der Zelle visualisiert und deren Lokalisation näher charakterisiert werden. Hierfür wurde eine Immunfluoreszenzfärbung fixierter HUVECs durchgeführt.

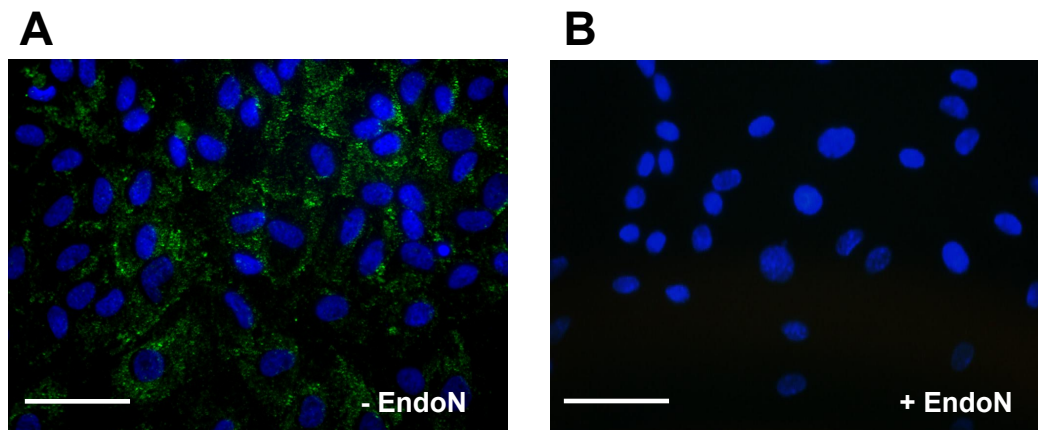


Abbildung 14 Visualisierung von PolySia in HUVECs mittels Immunfluoreszenz-Färbung

HUVECs wurden auf Zellkultur-Objektträgern ausgesät und mittels eiskaltem 70% Ethanol fixiert. Zellen wurden sowohl unbehandelt (**A**) als auch nach Verdau mit EndoN (**B**) gefärbt. Hierfür wurde PolySia durch einen monoklonalen anti-PolySia-Antikörper (mAk 735) gebunden und mit Hilfe des sekundären Fluoreszenzmarker Alexa 488 visualisiert. Für die Färbung des Zellkerns wurde 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet. Abbildung bereits veröffentlicht in (Strubl et al. 2018)

Der Zellkern wurde mittels DAPI blau eingefärbt. PolySia wurde mittels spezifischen, monoklonalen Antikörper 735 (mAK) gebunden und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 grün gefärbt. Um die Spezifität der Färbung zu prüfen, wurde auch hier ein Enzymverdau mit EndoN als Negativkontrolle durchgeführt. Abbildung 14 bestätigt in Bild A den Nachweis von PolySia in HUVECs. Bild B entspricht der Negativkontrolle und zeigt Zellen ohne PolySia-Signal. Weiterhin zeigt sich ein vesikuläres Verteilungsmuster der PolySia. Es gibt keine eindeutigen Hinweise auf eine Integration

in die Zelloberfläche. Dies lässt vermuten, dass PolySia zur extrazellulären Sekretion bestimmt ist (Abb. 14 und 15). Dieses Ergebnis wurde durch 5 Replikate verifiziert.

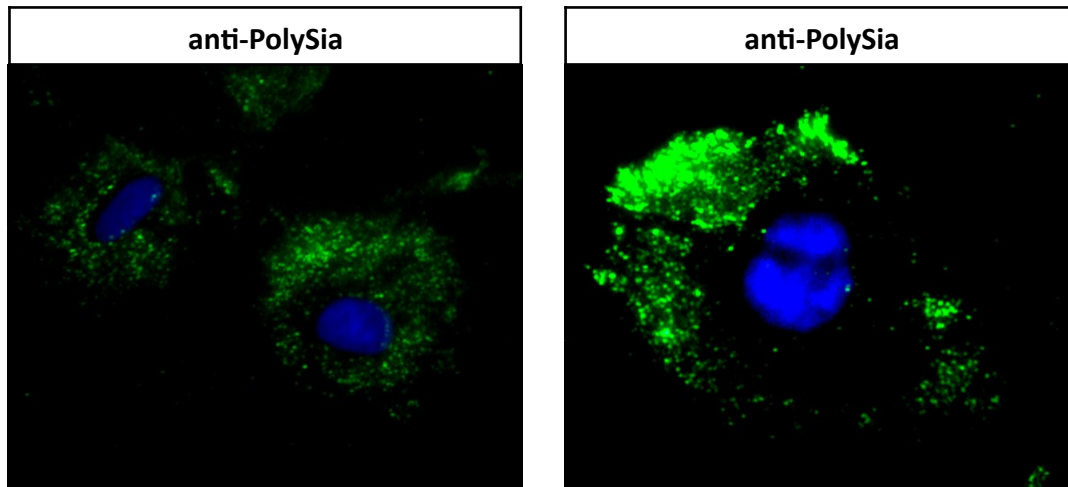


Abbildung 15 Visualisierung von PolySia in HUVECs mittels Immunfluoreszenz-Färbung

HUVECs wurden auf Zellkultur-Objektträgern ausgesät und mittels eiskaltem 70% Ethanol fixiert. Zellen wurden sowohl unbehandelt als auch nach Verdau mit EndoN gefärbt. Hierfür wurde PolySia durch einen monoklonalen anti-PolySia-Antikörper (mAk 735) gebunden und mit Hilfe des sekundären Fluoreszenzmarker Alexa 488 visualisiert. Für die Färbung des Zellkerns wurde 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet. Aufnahmen in 100-facher Vergrößerung.

3.1.3 Bestimmung der Polysialyltransferasen

PolySia kann von zwei verschiedenen Polysialyltransferasen synthetisiert werden: ST8SialII und ST8SialIV. Folglich sollte mit Hilfe einer mRNA-Analyse deren Einfluss auf die PolySia-Synthese in HUVECs gezeigt werden. Hierfür wurde eine Reverse Transkriptase-Polymerase-Chain-Reaction (RT-PCR), gefolgt von einer Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Abbildung 16 zeigt ein deutliches Signal für ST8SialIV bei 100 Basenpaaren (bp), während für ST8SialII nur ein schwaches Signal detektiert werden konnte. Als Negativkontrolle wurde jede Probe ohne Beigabe des Enzyms Reverse Transkriptase zusätzlich prozessiert. Als Hintergrundkontrolle wurde Aqua dest., als Positivkontrolle das House-Keeping-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Entsprechende Ergebnisse dieser weisen auf ein spezifisches Ergebnis der PCR hin. Dieses Ergebnis wurde in 3 Replikaten verifiziert.

Zusammenfassend lässt sich aus dieser Analyse schließen, dass in HUVECs PolySia vornehmlich von ST8SialIV synthetisiert wird.

	ST8Sia II		ST8Sia IV		Marker	GAPDH		H ₂ O		
Reverse Transkriptase	+	-	+	-		+	-	+	-	
										100 bp

Abbildung 16 Nachweis der Polysialyltransferasen in HUVECs

Die Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV wurden auf transkriptioneller Ebene mittels RT-PCR analysiert und durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und visualisiert (1,5% Agarose). Als Positivkontrolle wurde das House-Keeping-Gen GAPDH verwendet. Aqua dest. dient als Hintergrundkontrolle. Als Negativkontrolle wurde die jeweilige cDNA mit Nuclease-freiem Wasser anstatt Reverser Transkriptase prozessiert.

3.1.4 Identifizierung des polysialylierten Proteins

Um das Trägerprotein der PolySia zu identifizieren wurde eine Massenspektrometrie mittels *peptide mass finger print* durchgeführt. Hierfür wurden die Lysate mit Hilfe von inaktiver EndoN aufgereinigt und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierauf folgte eine Reduktion, Carbamidomethylierung, sowie ein Trypsinverdau, ehe die Peptidfragmente chromatographisch in einer nano-LC aufgetrennt und mittels MALDI-TOF-MS analysiert wurden. Hierbei konnte kein spezifisches Peptidmuster isoliert und identifiziert werden.

Daraufhin sollten mögliche Trägerproteine zusätzlich durch Westernblot-Analyse getestet werden. Hier konzentrierte man sich auf die zwei Trägerproteine NCAM und Neuropilin-2 (NRP-2), die als PolySia-Träger nachgewiesen sind und auf HUVECs existieren. Zusätzlich wurde Neuropilin-1 (NRP-1) getestet, da es ebenfalls auf HUVECs beschrieben wurde und hier in engen Zusammenhang mit NRP-2 steht.

Es wurden HUVEC-Lysate mittels Affinitätspräzipitation aufgereinigt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert. Hierbei wurden zur Detektion spezifische Antikörper gegen NCAM (mAK 123C3, 1,5 µg/ml), NRP-1 (pAK C-19, 0,25 µg/ml) und NRP-2 (mAK C-9, pAK H-300, 0,25 µg/ml) verwendet. Es wurde sowohl gegen polysialylierte (Spuren 1,3,5,7,9), als auch mittels EndoN-Verdau gegen depolysialylierte (Spuren 2,4,6,8,10) Trägerproteine gefärbt.

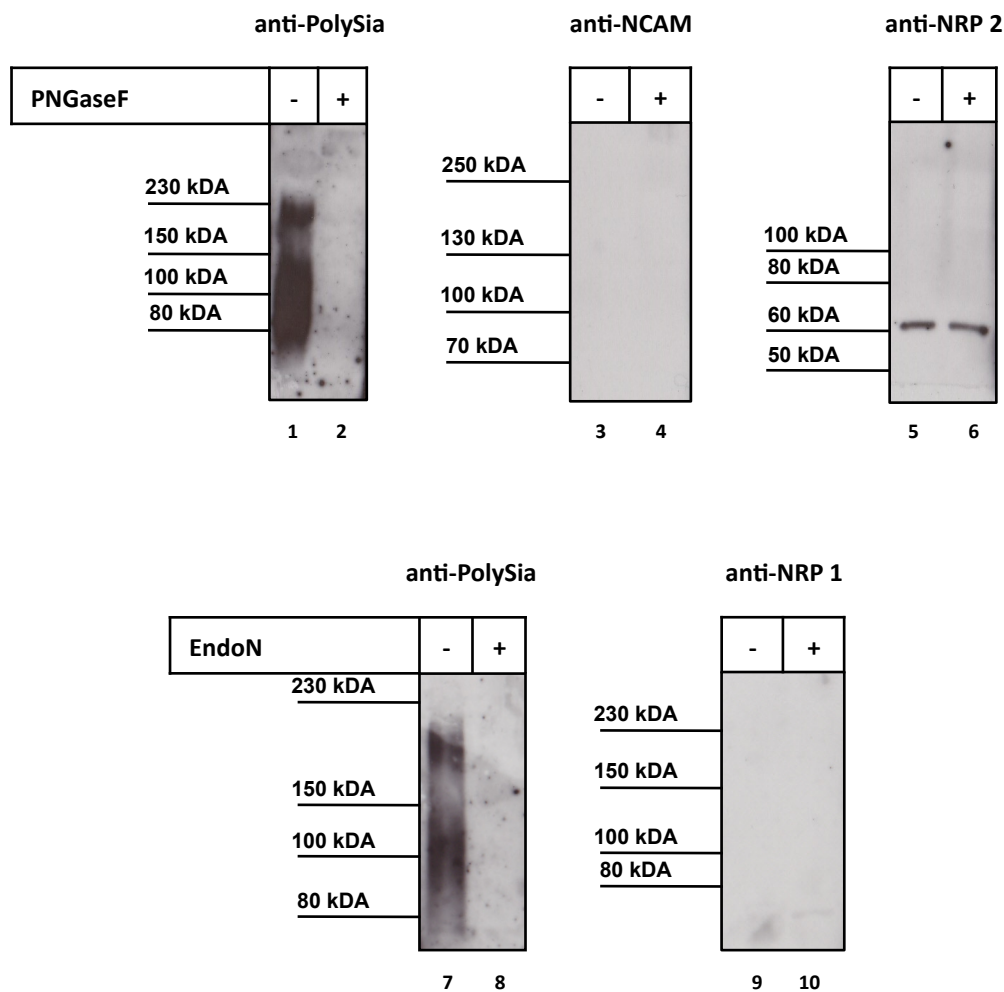


Abbildung 17 Westernblot-Analyse zum Nachweis des polysialylierten Trägerproteins

HUVEC-Zelllysate wurden unbehandelt (Spuren 1,3,5,7,9), sowie nach Verdau mit PNGaseF (Blot bereits in Abb. 14 gezeigt) bzw. EndoN als Negativkontrolle (Spuren 2,4,6,8,10) mittels Westernblot aufgetrennt und mit Antikörpern gegen PolySia (mAk 735), NCAM (mAk 123C3, 1,5 µg/ml), Neuropilin-2 (mAk C-9, pAk H-300, 0,25 µg/ml) und Neuropilin-1 (pAk C-19 0,25 µg/ml) visualisiert. Die anti-PolySia-Färbung (Spuren 1,2 und 7,8) beweist als Kontrolle die Existenz von PolySia in den verwendeten Lysaten. Der Kontroll-Westernblot von Spur 1 und 2 wurde bereits in Abbildung 14 als PNGaseF-Verdau gezeigt.

Zusammenfassend zeigt Abbildung 17, dass PolySia (Spuren 1 und 7) in den verwendeten Proben nachgewiesen werden konnte, jedoch keine Signale für NCAM (Spur 3), NRP-1 (Spur 9), sowie NRP-2 (Spur 5) detektiert wurden. Somit verbleibt das polysialylierte Trägerprotein unbekannt. Es lässt sich lediglich darauf einschränken, dass es sich um ein N-glykosyliertes Trägerprotein handeln muss (siehe Abb. 13).

3.2 Polysialylierung des HUVEC-Überstands

Auf Grundlage des vesikulären Lokalisations-Muster von PolySia in HUVECs wurde hierauf der Überstand der Zellen genauer untersucht.

3.2.1 PolySia-Nachweis im Überstand von HUVECs

HUVECs wurden gemäß Jaffe et al (Jaffe et al. 1973) isoliert und kultiviert. 24 h vor Zellernte wurden die Zellen nochmals gewaschen und mit Medium ohne FCS (fetal calve serum) versorgt, um externe PolySia-Quellen auszuschalten. Das Medium als Überstand wurde mittels Zentrifugier-Filtereinheiten ankonzentriert. Auch hier wurden mittels BCA-Methode die Proteinkonzentrationen bestimmt und ausgeglichen. Schließlich wurden die Überstände gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert. Zur Detektion wurde erneut der spezifische, monoklonale Antikörper 735 (mAK) gegen PolySia verwendet und ein Enzymverdau mit EndoN als Negativkontrolle angefertigt. Zusätzlich wurde als Hintergrundkontrolle das verwendete Zellkulturmedium analysiert, um externe PolySia -Mengen festzustellen.

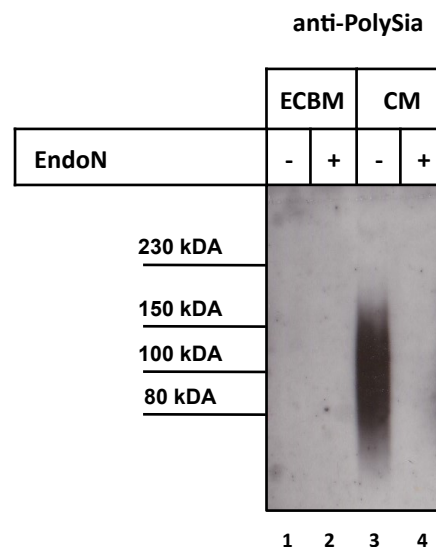


Abbildung 18 Westernblot-Nachweis von PolySia im HUVEC-Überstand

Der Mediumüberstand (**CM**) von HUVECs wurde durch Zentrifugation von Zellfragmenten gereinigt, ankonzentriert und mittels Westernblot aufgetrennt. Hiefür wurden sowohl unbehandelte (Spur 1 und 3) als auch EndoN-behandelte Proben (Spur 2 und 4) verwendet. Zur Detektion wurde anti-PolySia-Antikörper (mAk 735) benutzt. Als Hintergrundkontrolle wurde das Medium ohne Zellkontakt (**ECBM**) prozessiert, um etwaige PolySia-Inhalte zu berücksichtigen.

Abbildung 18 zeigt einen Westernblot vom HUVEC-Überstand. Spur 1 entspricht dem Endothelzellbasalmedium als Hintergrundkontrolle. Es zeigt keinerlei Signal. Spur 3 weist im Zellüberstand einen deutlichen PolySia-typischen „Schmier“ im Bereich von 80-150 kDA auf. Spur 2 und 4 bestätigen als EndoN-Verdau die Aussagekraft. Zusammenfassend beweist dies die Existenz von PolySia im Zellkulturüberstand von HUVECs. Im Vergleich zum Zelllysate fehlt die zweite Signalbande im Bereich von 230 kDA. Insgesamt wurde dieses Ergebnis durch 10 Replikate verifiziert. Es legt nahe, dass HUVECs PolySia sezernieren.

Zusätzlich wurde ein PNGaseF-Verdau durchgeführt, um ebenfalls die PolySia im Überstand auf die polysialylierte Glykosylierungsform hin zu untersuchen. Abbildung 19 zeigt in Spur 1 als Kontrolle ein typisches PolySia-Signal. Der PNGaseF-Verdau in Spur 2 dagegen zeigt kein Signal. Dies zeigt, dass die PolySia im HUVEC-Überstand genauso wie die des Zelllysates N-glykosyliert vorliegt.

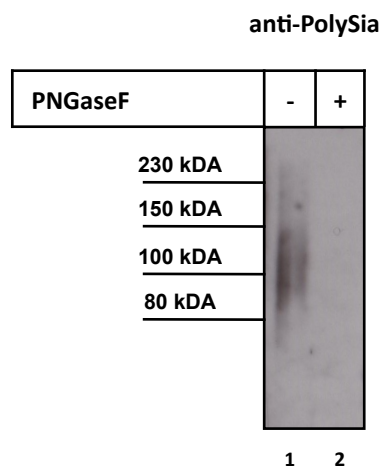


Abbildung 19 Analyse der Glykosylierungsform im HUVEC-Überstand

HUVEC-Überstand wurde sowohl unbehandelt (Spur 1) als auch nach Verdau mit dem Enzym PNGase F (Spur 2) mittels Westernblot-Analyse aufgetrennt und anschließend mit einem anti-PolySia-Antikörper (mAk 735) visualisiert.

3.2.2 Vergleich der PolySia-Konzentration von Zelllysats und – Überstand

Ziel dieses Versuches war es, die Mengen an PolySia von Zelllysats und Zellüberstand direkt vergleichen zu können. Hierfür wurden HUVECs und entsprechende Überstände wie weiter oben besprochen prozessiert. Zusätzlich wurden die polysialylierten Proteine aus beiden Proben mittels Immunpräzipitation isoliert. Hierfür wurde der spezifische, monoklonale Antikörper 735 (mAK) gegen PolySia verwendet. Die aufgereinigten Proben wurden nebeneinander mit Hilfe von Gelelektrophorese und Westernblot aufgetrennt und analysiert. Zur Detektion wurde erneut derselbe Antikörper gegen PolySia verwendet. Um sicher zu gehen, dass bei der Aufreinigung jegliche polysialylierten Proteine beider Proben isoliert wurden, wurde der letzte Immunpräzipitations- (Proben-) Überstand vor der Eluierung ebenfalls analysiert.

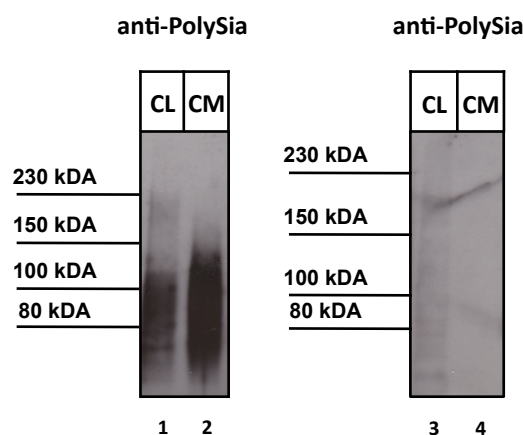


Abbildung 20 Vergleich der PolySia-Konzentration von HUVEC-Lysat und –Überstand

Die gesamte PolySia wurde aus HUVEC-Lysat (CL) und ankonzentrierten –Überstand (CM) mittels Immunpräzipitation (IP) isoliert und identische Proteinkonzentrationen mittels Westernblot aufgetrennt (Spur 1 und 2). Mittels anti-PolySia-Antikörper (mAk 735) wurden die Signale visualisiert. Zur Kontrolle, dass jegliches PolySia während der IP isoliert wurde, wurden die letzten IP-Überstände ebenfalls auf PolySia untersucht (Spur 3 und 4).

Abbildung 20 zeigt den direkten Vergleich von Zelllysats und Zellmedium. Spur 1 enthält das Signal des Zelllysates. Es weist erneut zwei Banden im typischen „PolySia-Schmier“ im Bereich von 80-150 kDa und 230 kDa auf. Spur 2 zeigt den „PolySia-Schmier“ des Zellüberstandes im Bereich von 80-150 kDa. Im direkten Vergleich zeigt der Zellüberstand ein deutlich stärkeres Signal zwischen 80 und 150 kDa als das Zelllysats. Das Signal um 230 kDa fehlt dagegen im Zellüberstand vollkommen. Spur 3

und 4 zeigt den Westernblot der Aufreinigungsüberstände. In beiden Spuren sind keine Signale zu erkennen. Dies bestätigt, dass mittels PolySia-Aufreinigung jegliche polysialylierten Proteine isoliert wurden und somit die Vergleichbarkeit gewährleistet ist. Dieses Ergebnis wurde durch 3 Replikate verifiziert. Zusammenfassend beweist dieser Westernblot, dass die PolySia-Konzentration im Zellüberstand größer ist als im Zelllysat. Es bekräftigt die Vermutung, dass *in vitro* PolySia kontinuierlich von HUVECs freigesetzt wird.

3.3 Analyse zur funktionellen Bedeutung von PolySia in HUVECs

In einem nächsten Schritt sollte die funktionelle Bedeutung von PolySia für HUVECs näher analysiert werden. Zuerst wurde der Einfluss wichtiger proangiogenetischer Substanzen auf die Polysialylierung von HUVECs untersucht. Hierfür wurden HUVECs mit proangiogenetischen Wachstumsfaktoren stimuliert und die Polysialylierung von Zelllysaten und Zellüberstand verglichen.

Die HUVEC-Zellen wurden gemäß Jaffe et al isoliert, kultiviert (Jaffe et al. 1973) und für 24 h stimuliert. Es wurde Endothelzellbasalmedium ohne FCS verwendet, um externe PolySia-Quellen auszuschalten. Schließlich wurden die Zellen geerntet, homogenisiert und die Überstände ankonzentriert. Nach Ausgleich der Proteinkonzentration wurden die Proben mittels Gelelektrophorese und Westernblot analysiert. Zur Visualisierung wurde der spezifische, monoklonale Antikörper 735 (mAK) gegen PolySia verwendet. Ein EndoN-Verdau wurde als Negativkontrolle durchgeführt.

3.3.1 Stimulation von HUVECs mit Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

VEGF vermittelt seine proangiogenetische Wirkung über die Bindung seiner endothelialen VEGF-Rezeptoren. Durch Stimulation von HUVECs mit VEGF (50 ng/ml) soll überprüft werden, ob diese Signalwirkung auch die Polysialylierung der Zellen beeinflusst.

Abbildung 21 zeigt einen Westernblot von Zelllysaten VEGF stimulierter HUVECs. Spur 1 und 2 stellen die Kontrollgruppe unstimulierter HUVECs dar. Spur 1 zeigt das typische bereits beschriebene PolySia-Signal in HUVECs bestehend aus zwei Signalen zwischen 80 und 150 kDa und im Bereich um 230 kDa. Spur 2 detektiert als EndoN-Negativkontrolle kein Signal. In Spur 3, 4, 5 und 6 sind die Ergebnisse VEGF-stimulierter Zellen zu erkennen. Die Spuren 3 und 5 weisen beide „PolySia-Schmier“ um 230 kDa und zwischen 80 und 150 kDa, wie bei unstimulierten HUVECs, auf. Während das Signal um 230 kDa von der Intensität im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert erscheint, zeigt sich beim Signal zwischen 80 und 150 kDa eine deutliche Steigerung der Signalintensität. Spur 4 und 6 detektiert als Negativkontrolle kein Signal.

Es lässt sich feststellen, dass eine Stimulation von HUVECs mit dem Wachstumsfaktor VEGF wohl zu einem verstärkten PolySia-Signal im Zelllysats um 80-150 kDA führt. Dieses Ergebnis wurde durch 6 Replikate verifiziert.

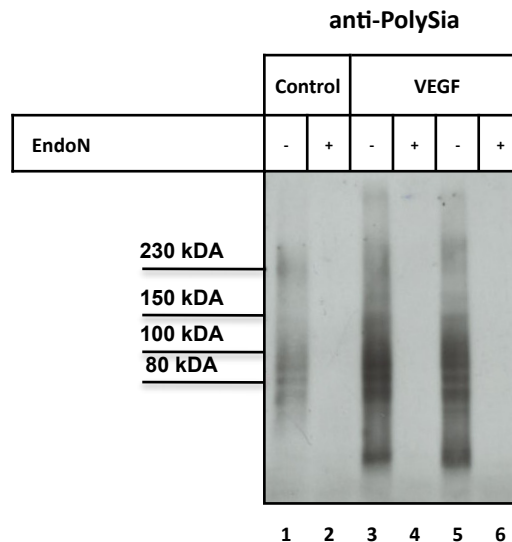


Abbildung 21 Analyse der Polysialylierung VEGF-stimulierter HUVECs

HUVECs wurden unstimuliert (**Control**) und VEGF stimuliert (50 ng/ml) (**VEGF**) kultiviert, ehe sie geerntet und lysiert wurden. Das Lysat wurde sowohl unbehandelt (Spur 1, 3, 5) als auch nach Verdau mit EndoN (Spur 2, 4, 6) mittels Westernblot aufgetrennt. Schließlich wurde PolySia mit Hilfe eines PolySia-Antikörper (mAk 735) visualisiert. Durch stetige Bestimmung und Ausgleich der Proteinkonzentration wurde eine Vergleichbarkeit gewährleistet.

In Abbildung 22 ist dasselbe Experiment mit Zellüberständen VEGF stimulierter HUVECs durchgeführt worden. Die Spuren 1 und 2 zeigen als Hintergrundkontrolle, dass im verwendeten Endothelzellbasalmedium keine PolySia detektiert wurde. Spur 3 zeigt als Kontrollgruppe unstimulierter HUVECs das bereits bekannte PolySia-Signal im HUVEC-Überstand zwischen 80 und 150 kDA. In Spur 5 ist das Ergebnis VEGF stimulierter Zellen zu sehen. Es zeigt denselben „PolySia-Schmier“ im Bereich von 80-150 kDA, der im Vergleich zur Kontrolle wiederum eine deutlich stärkere Intensität aufweist. Spur 2 und 4 verifizieren als EndoN-Verdau die Ergebnisse.

Es lässt sich somit zusammenfassen, dass eine Stimulation von HUVECs mit VEGF wohl zu einer Verstärkung des PolySia-Signals sowohl im Zelllysats, als auch im Zellüberstand führt. Daraus lässt sich schließen, dass durch VEGF eine Steigerung der PolySia-Synthese in HUVECs stimuliert wird. Insgesamt wurde dieses Ergebnis durch 6 Replikate verifiziert.

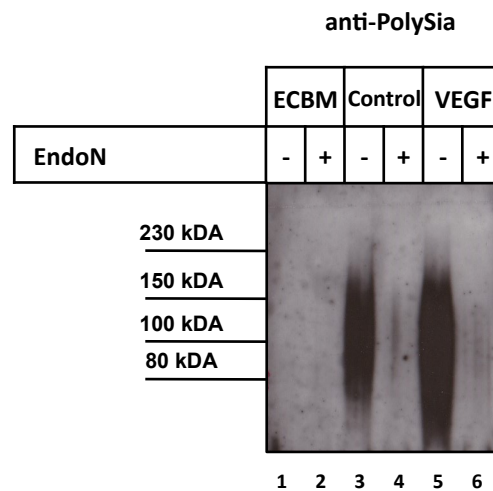


Abbildung 22 Analyse der Polysialylierung VEGF-stimulierter HUVEC-Überstände

HUVECs wurden unstimuliert (**Control**) und VEGF stimuliert (50 ng/ml) (**VEGF**) kultiviert, ehe die Überstände entnommen und ankonzentriert wurden. Die Proben wurden sowohl unbehandelt (Spur 1, 3, 5) als auch nach Verdau mit EndoN (Spur 2, 4, 6) mittels Westernblot aufgetrennt. Schließlich wurde PolySia mit Hilfe eines PolySia-Antikörper (mAk 735) visualisiert. Durch stetige Bestimmung und Ausgleich der Proteinkonzentration wurde eine Vergleichbarkeit gewährleistet. Als Hintergrundkontrolle wurde das Medium ohne Zellkontakt (**ECBM**) prozessiert, um etwaige PolySia-Inhalte zu berücksichtigen.

Zuletzt sollte der Vergleichs-Westernblot von Abbildung 20 wiederholt und um VEGF stimulierte Zellen ergänzt werden, sodass in einer Analyse die PolySia-Mengen von Zelllysate und Zellüberstand sowohl von unstimulierten als auch VEGF-stimulierten Zellen absolut verglichen werden konnten. HUVECs wurden wie oben beschrieben isoliert, kultiviert und 24 h stimuliert, ehe sie geerntet, homogenisiert und die Überstände ankonzentriert wurden. Nach Ausgleich der Proteinkonzentration wurden erneut mittels Immunpräzipitation die polysialylierten Proteine isoliert und mit Gelelektrophorese und Westernblot analysiert. Zur Detektion wurde der spezifische, monoklonale Antikörper (mAK 735) gegen PolySia verwendet. Die zusätzliche Analyse der letzten Immunpräzipitations-Überstände vor der Eluierung sollte die Vergleichbarkeit sicherstellen.

Abbildung 23 zeigt diesen Vergleich. Spur 1 und 2 enthalten Zelllysate und -überstand der Kontrollgruppe, Spur 3 und 4 diejenigen VEGF stimulierter Zellen. Spur 1 zeigt als Kontroll-Zelllysate das typische „PolySia-Doppel-Signal“, während Spur 2 als Kontroll-Überstand das typische stärkere „PolySia-Einzel-Signal“ aufweist. Spur 3 bestätigt den Einfluss von VEGF auf das Zelllysate. Es zeigt sich ein leicht abgeschwächtes Signal um

230 kDA, sowie ein leicht verstärktes Signal zwischen 80 und 150 kDA im Vergleich zum Kontroll-Lysat. Spur 4 detektiert wiederum einen klassischen „PolySia-Schmier“ um 80 bis 150 kDA, der im Vergleich zum Kontroll-Überstand eine deutlich stärkere Intensität aufweist. Die Spuren 5 bis 8 zeigen keine Signale im letzten Immunpräzipitations-Überstand und bestätigen damit, dass mittels PolySia-Aufreinigung jegliche polysialylierten Proteine isoliert wurden und somit die Vergleichbarkeit gewährleistet ist.

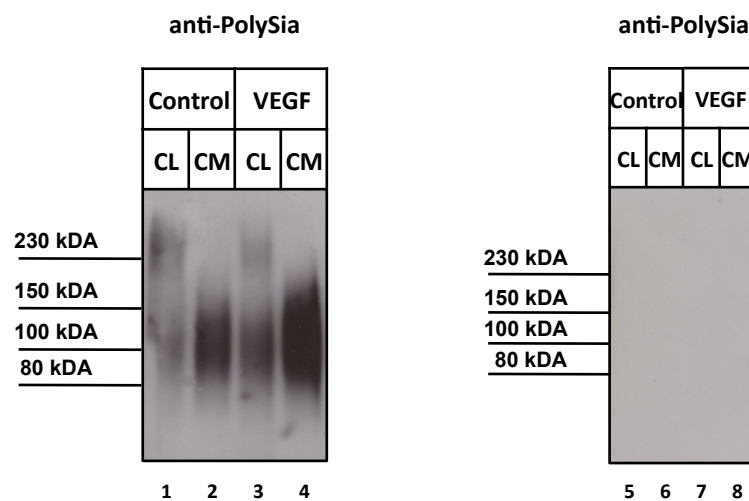


Abbildung 23 Vergleich der PolySia-Konzentration von VEGF stimuliertem HUVEC-Lysat und -Überstand

HUVECs wurden unstimuliert (**Control**) und VEGF stimuliert (50 ng/ml) (**VEGF**) kultiviert. Die Zellen (**CL**) und entsprechende Überstände (**CM**) wurden lysiert bzw. ankonzentriert. Darauf folgte sowohl eine Bestimmung und Ausgleich der Proteinkonzentration als auch eine Aufreinigung der gesamten PolySia mittels Immunpräzipitation. Anschließend wurden dieselben Proteinkonzentrationen als Westernblot aufgetrennt und durch einen PolySia-Antikörper (mAk 735) visualisiert. Zur Kontrolle, dass jegliche PolySia während der IP isoliert wurde, wurden die letzten IP-Überstände ebenfalls auf PolySia untersucht (Spur 5-8).

Dieser Westernblot fasst zusammen, dass die PolySia-Menge im Zellüberstand stets größer ist als im Zelllysate. VEGF-Stimulation führt wohl zu einer Steigerung der PolySia-Konzentration im Lysat und Überstand, wobei der Einfluss auf letzteres deutlich stärker wirkt. Insgesamt wurde dieses Ergebnis durch 2 Replikate verifiziert.

3.3.2 Stimulation von HUVECs mit basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)

Neben VEGF sollte auch bFGF auf einen möglichen Einfluss auf die Polysialylierung von HUVECs untersucht werden. In Abbildung 24 wird ein Zelllysate-Westernblot von bFGF stimulierten HUVECs gezeigt (A).

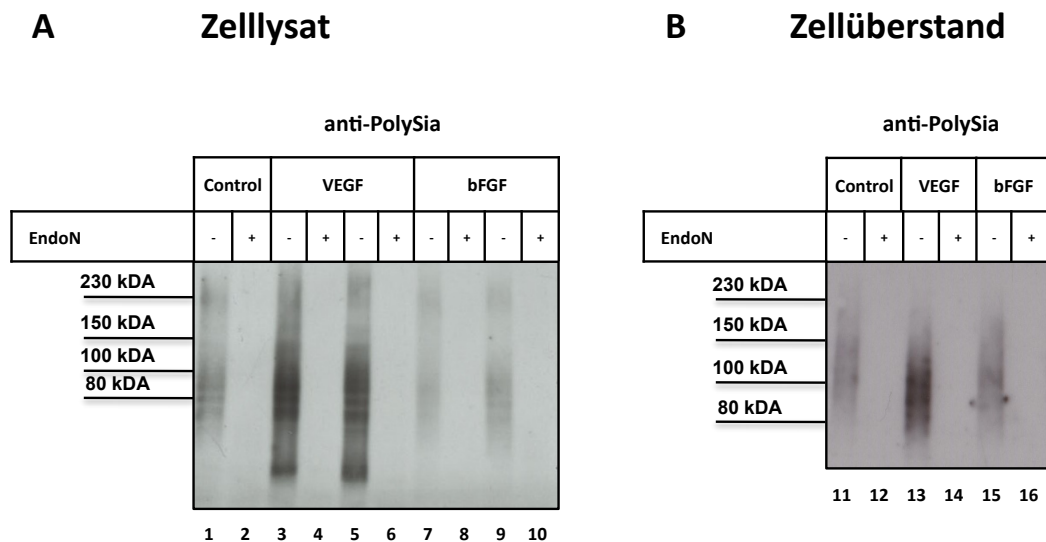


Abbildung 24 Analyse der Polysialylierung bFGF-stimulierter HUVECs und Überstände

HUVECs wurden unstimuliert (**Control**) und bFGF stimuliert (2 ng/ml) (**bFGF**) kultiviert. Die Zellen (Spur 1-10) und Überstände (Spuren 11-16) wurden lysiert bzw. ankonzentriert und mittels Westernblot aufgetrennt. Hierfür wurden sowohl unbehandelte (Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15) als auch EndoN-verdaute Proben (Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16) verwendet. Die Detektion erfolgte mittels Anfärbung durch einen PolySia-Antikörper (mAk 735). Der Westernblot A wurde bereits in Abbildung 22 gezeigt.

Spur 1 weist als Kontrollgruppe erneut die zwei typischen PolySia-Signale auf, während Spur 2 mittels EndoN-Verdau die Spezifität dieses Signals beweist. Spur 7 bis 10 enthält das Zelllysate der bFGF stimulierten Zellen. Hierbei lässt sich in Spur 7 und 9 dasselbe Doppelsignal erkennen wie in der Kontrollgruppe. Jedoch lässt sich keine bemerkenswerte Differenz in der Intensität ausmachen. Spur 8 und 10 enthält wiederum die Negativkontrolle.

Ähnliche Ergebnisse hat auch die Analyse der Zellüberstände bFGF stimulierten Zellen erbracht (B). Abbildung 24 zeigt in Spur 11 und 12 das Kontrollsignal und dessen Negativkontrolle. Spur 15 zeigt das Signal bFGF stimulierten Zellüberstände um 80-150 kDA. Dieses zeigt ebenfalls keine signifikanten Signal-Differenzen im Vergleich zum

Kontroll-Überstand. Spur 16 entspricht der Negativkontrolle. Insgesamt zeigt eine Stimulation mit dem Wachstumsfaktor bFGF keine signifikante Veränderung des PolySia-Signals im Zelllysate und -überstand. Die PolySia-Synthese in HUVECs scheint nicht vom Wachstumsfaktor bFGF beeinflusst zu werden. Dieses Ergebnis wurde durch 6 Lysatreplikate und 4 Überstandreplikate verifiziert.

3.3.3 Stimulation mit künstlich hergestellten Sialinsäurevorläufern

Nachdem bereits in unserer Arbeitsgruppe der Einfluss von Sialinsäuren auf Sprossungsmechanismen in der Angiogenese untersucht wurde (Bayer et al. 2013), interessierte uns weiterhin, ob Sialinsäuren direkten Einfluss auf die Polysialylierung von HUVECs nehmen. Hierbei ist bereits bekannt, dass Sialinsäurevorläufer die Polysialylierung von Zellen regulieren können (Horstkorte et al. 2004, Bork et al. 2005). Hierfür wurden HUVECs mit den zwei künstlichen Sialinsäurevorläufern ManNAc und ManNBut ausgesät, bis zur Konfluenz kultiviert und daraufhin sowohl Zelllysate als auch Zellüberstand mittels Westernblot auf PolySia untersucht. Hierbei wurde auf Grund der langen Stimulationszeit Endothelzellbasalmedium mit 0,5% FCS verwendet, um das Überleben der Zellen zu garantieren. Zusätzlich wurde ECBM inkl. 0,5 %FCS als Hintergrundkontrolle analysiert.

Abbildung 25 zeigt die Westernblot-Ergebnisse der Sialinsäure stimulierten HUVECs von Zelllysate (A) und Zellüberstand (B). Spur 1 stellt jeweils die Kontrollgruppe unstimulierter HUVECs dar. Sie weist in beiden Fällen einen PolySia-typischen Schmier zwischen 80 und 150 kDa auf. Das Zelllysate detektiert zusätzlich einen Schmier um 230 kDa. Spur 2 zeigt ManNAc-stimulierte HUVECs. Hier ist dasselbe Signal erkennbar. Es liegen im Vergleich zur Kontrolle sowohl beim Lysate als auch beim Überstand keine Differenzen bezüglich der Signalintensität vor. Spur 3 zeigt die ManNBut- stimulierten Zellen. Hier lassen sich bei Zelllysaten und Zellüberständen stark abgeschwächte Signale im erwähnten Bereich erkennen. Spur 0 zeigt die Hintergrundkontrolle der Zellüberstandanalyse. Es enthält ECBM inkl 0,5% FCS und weist leichte PolySia-Anteile nach.

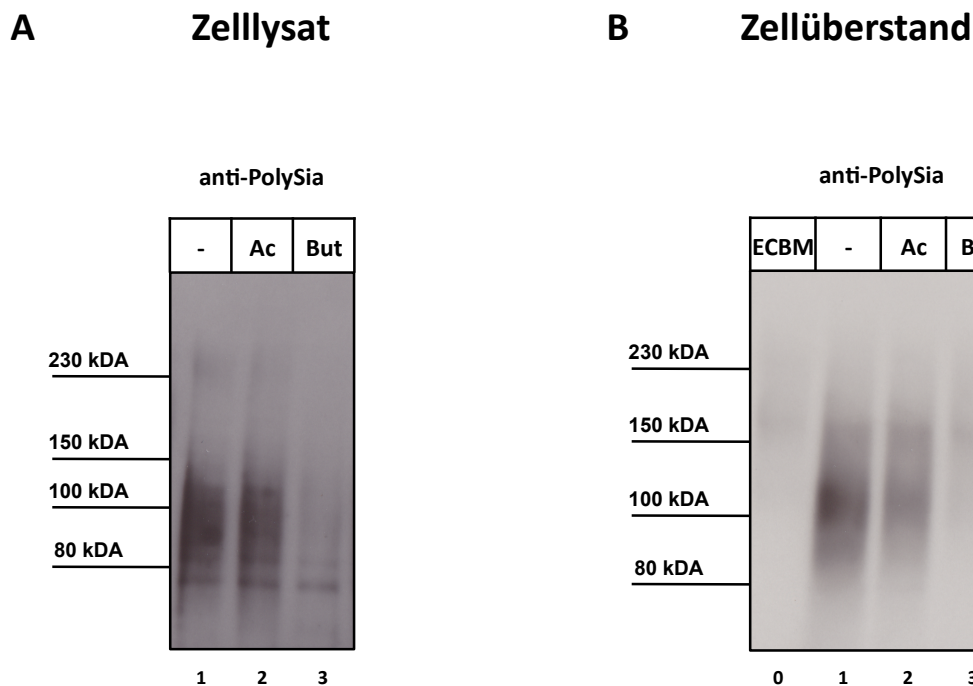


Abbildung 25 Einfluss von künstlichen Sialinsäurevorläufern auf die Polysialylierung von HUVECs

A. HUVECs wurden bei Passage entweder mit ManNAc (Ac) oder mit ManNBut (But) ausgesät. Als Kontrolle dienen unbehandelte HUVECs (-). Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert, geerntet und homogenisiert, ehe mittels Immunpräzipitation die PolySia isoliert wurde. Die Proben wurden mittels Westernblot aufgetrennt und mit einem anti-PolySia-Antikörper (mAk 735) visualisiert.

B. HUVECs wurden bei Passage entweder mit ManNAc (Ac) oder mit ManNBut (But) ausgesät. Als Kontrolle dienen unbehandelte HUVECs (-). Die Zellen wurde bis zur Konfluenz kultiviert, ehe die Überstände entnommen und ankonzentriert wurden. Die Proben wurden mittels Westernblot aufgetrennt und mit einem anti-PolySia-Antikörper (mAk 735) visualisiert.

Zusammengefasst zeigt sich sowohl beim Zelllysate als auch beim Zellüberstand, dass eine ManNAc-Stimulation von HUVECs keine nachweisbare Veränderung des PolySia-Signals bewirkt, während eine ManNBut-Stimulation eine signifikante Abschwächung des Signals nach sich zieht. Es scheint also, dass ManNAc keinen Einfluss auf die PolySia-Synthese von HUVECs besitzt, während ManNBut diese stark reduziert bis inhibiert. Dieses Ergebnis wurde durch 5 Lysatreplikate verifiziert, während der Überstand bisher nur einmal untersucht wurde und somit die Ergebnisse hierzu keine endgültigen Schlüsse zulassen.

3.3.4 Migration Assay

Schließlich sollte in einem funktionellen Assay der Einfluss von PolySia auf HUVECs analysiert werden. Da PolySia bekanntlich Zelladhäsionsprozesse reguliert, wurde hierfür ein ScratchAssay ausgewählt, um eine mögliche Wirkung von PolySia auf die Migrationsfähigkeit von HUVECs zu analysieren (Liang et al. 2007, Jonkman et al. 2014). HUVECs wurden hierfür konfluent in 12 Well-Platten ausgesät, mittels eines Hungermediums in einen Ruhezustand versetzt, entweder mit aktiver EndoN zur Degradierung von PolySia behandelt oder nicht (Kontrollgruppe) und schließlich mit einer Wunde versehen. Der Ruhezustand sollte dabei verhindern, dass die Zellen die Wunden durch Zellteilung anstatt durch Migration schließen. Daraufhin wurden nach 0 und 24 Stunden Bilder gemacht und die Scratch-Größe gemessen.

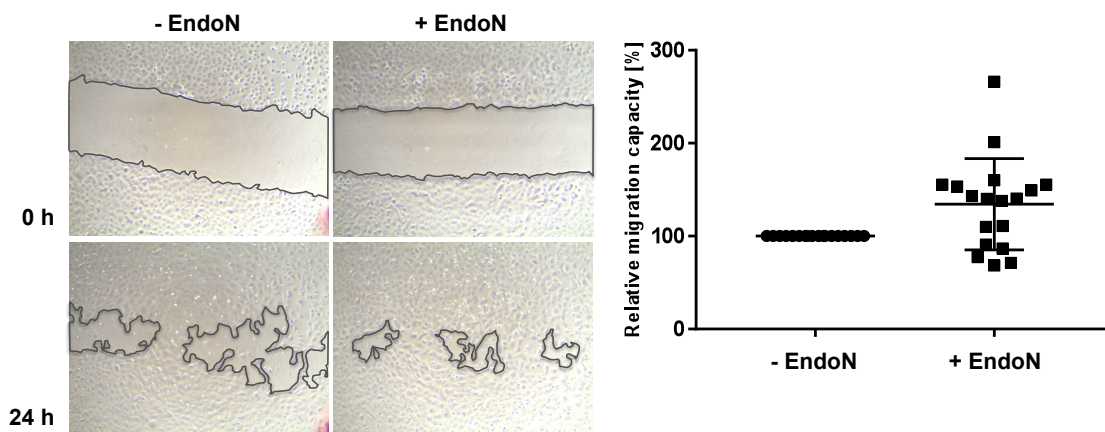


Abbildung 26 Einfluss der Polysialylierung von HUVECs auf deren Migrationskapazität

HUVECs wurden in 12 Well-Platten ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch eine Reduktion des FCS auf 0,5% für 24 h in einen „Steady State“ versetzt. Hierauf konnten die Wunden gesetzt werden, ehe entweder unbehandeltes Medium (- **EndoN**) oder EndoN-behandeltes Medium (+**EndoN**) hinzugegeben wurde. Schließlich wurden Bilder an einem Mikroskop zur Stunde 0 und 24 gemacht und die Flächen mit Hilfe einer Computersoftware (Motic Picture Advanced) bemessen. Daraus konnte die Migrationskapazität errechnet werden. Insgesamt wurden 18 Wunden ausgewertet. Die Kontrollgruppe wurde als 100% festgesetzt. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student-T Test. Das Signifikanzlevel wurde mit $**P < 0,01$ bestimmt. Modifiziert nach (Strubl et al. 2018)

In Abbildung 26 sind Bilder des Migration Assays von unbehandelten Zellen (Control) sowie von EndoN-behandelten Zellen (+EndoN) zum Zeitpunkt 0 und 24 Stunden dargestellt. Es zeigt, dass EndoN-behandelte HUVECs innerhalb von 24 Stunden die Wunden mehr geschlossen haben und damit stärker migriert sind. Bei 18 ausgewerteten „Scratches“ wurde eine Steigerung der Migrationskapazität um mehr als

30% von EndoN behandelten HUVECs gegenüber unbehandelten Zellen festgestellt. Somit lässt sich zusammenfassen, dass eine Degradierung von PolySia bei HUVECs die Migrationskapazität dieser Zellen steigert. Im Rückschluss scheint PolySia Migrationsprozesse von HUVECs zu erschweren. Hierbei muss erwähnt werden, dass dieses Experiment mit ECBM inkl. 0,5 % FCS durchgeführt wurde. Da FCS nachweislich PolySia beinhaltet (Abb. 27) sind die gezeigten Ergebnisse auf eine kombinierte Degradierung der PolySia sowohl aus HUVECs als auch aus dem Serum zurückzuführen.



Abbildung 27 Nachweis von PolySia in ECBM inkl. 0,5% FCS

Endothelcell-Basalmedium inkl. 0,5% FCS wurde unbehandelt (Spur 1), sowie nach enzymatischem Verdau mit EndoN (Spur 2) mittels Gelelektrophorese und Westernblot aufgetrennt und durch einen monoklonalen anti-PolySia-Antikörper (mAk 735) visualisiert. Molekulargewichte sind in kilo Dalton (kDa) angegeben (Strubl et al. 2018).

4 Diskussion

4.1 Expression von PolySia in HUVECs

In dieser Arbeit sollte an Hand von HUVECs die Existenz von PolySia und deren möglicher Einfluss auf Migrationsmechanismen in der Angiogenese untersucht werden (Jaffe et al. 1973, Gimbrone et al. 1974, Nachman et al. 2004). Naftolin und Mitarbeiter konnten bereits zuvor PolySia in Form von PolySia-NCAM auf HUVECs nachweisen (Park et al. 2010).

In dieser Arbeit konnte zunächst bestätigt werden, dass HUVECs PolySia exprimieren. PolySia lies sich im Zellysat mittels Westernblot in zwei von einander getrennten Signalen um 230 kDa und zwischen 80 und 150 kDa nachweisen (Abb.12).

Dieses Ergebnis wurde auf Genniveau mittels PCR-Analysen reevaluiert. Beide Polysialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV konnten in HUVECs nachgewiesen werden, wobei ST8SialIV als prädominante Polysialyltransferase für Polysialylierungen in HUVECs identifiziert wurde (Abb.16). Diese Ergebnisse konnten in weiteren Versuchen von Kooperationspartnern bestätigt und quantifiziert werden (Strubl et al. 2018). Dabei zeigte sich, dass von ST8SialIV 153mal mehr Transkripte vorhanden sind als von ST8SialII.

Nachdem bestätigt war, dass PolySia von HUVECs exprimiert werden, sollte das polysialylierte Trägerprotein detektiert werden. Ein positiver PNGaseF-Verdau zeigte zunächst, dass PolySia in HUVECs über N-Glykane mit dem Trägerprotein verbunden sind (Abb.13). Anschließend wurde mittels massenspektrometrischer Analysen (MALDI-TOF-MS) versucht das Trägerprotein zu identifizieren. Hierbei konnte kein Protein nach mehrmaliger Analyse identifiziert werden, sodass HUVEC-Zellysate zusätzlich mittels Westernblot auf die wichtigsten, bereits bekannten polysialylierten Proteine gescannt wurden. Wiederholte Analysen gegen NCAM, sowie Neuropilin 1 und 2 erbrachten bisher keine Ergebnisse (Abb.17). In dieser Arbeit lies sich somit die Suche nach dem Trägerprotein nur auf N-Glykosylierte Formen einschränken, nicht jedoch ausreichend lösen. Dies sollte Gegenstand folgender Arbeiten werden, um spezifische Information über mögliche PolySia-Funktionen bei Endothelzellen zu gewinnen. Grund für die fehlgeschlagene Identifizierung könnten starke proteolytische Mechanismen innerhalb der HUVECs sein, die zu einer Degradierung des polysialylierten Proteins führen. Während in dieser Arbeit bereits auf eine Reduzierung der Protease-Aktivität geachtet wurde (stetiges Kühlen, proteolyse-arme Homogenisierung, Einsatz von Protease-Inhibitoren-Mix), sollte dies zukünftig weiter

berücksichtigt und modifiziert werden. Auf Grund überdurchschnittlich hoher ST8SialIV-Konzentrationen könnte vor allem eine Autopolysialylierung der Polysialyltransferase selbst denkbar sein, so wie es bereits für ST8SialII in Spermien von Säugetieren beschrieben wurde (Simon et al. 2013). Auch dies sollte somit fortwährend berücksichtigt werden.

Anschließend wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbung PolySia innerhalb der HUVECs lokalisiert werden (Abb.14 und 15). PolySia konnte hierbei als vesikuläres Muster visualisiert werden.

Zusammenfassend bestätigt diese Arbeit die Expression von PolySia durch HUVECs, weist aber Differenzen zu bisherigen Veröffentlichungen auf:

Naftolin und Mitarbeiter haben als erste Gruppe den Nachweis von PolySia auf HUVECs veröffentlicht. Sie wiesen diese mittels Westernblot aus Zelllysaten als PolySia-NCAM auf HUVECs nach. Hierbei wurden zwei Signale zwischen 180 und 250 kDA detektiert. Der Signalbereich kleiner 180 kDA wurde nicht gezeigt und besprochen. Die vorliegende Arbeit konnte gerade in diesem Bereich zwischen 80 und 150 kDA ein weiteres PolySia-Signal identifizieren (Abb. 12).

Desweiteren haben Naftolin und seine Arbeitsgruppe mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen PolySia-NCAM direkt PolySia und sein Trägerprotein nachgewiesen. Hierbei erfasst der Antikörper wohl unabhängig vom Trägermolekül α 2,8-verknüpfte Sialinsäuren mit mehr als 10 Monosialylresten. Diese sind in Vertebraten zwar häufig an NCAM als Trägerprotein gekoppelt, jedoch sind wie oben beschrieben weitere polysialylierte Proteine bekannt und somit als Trägerprotein möglich, die hierdurch nicht ausgeschlossen werden. Dementsprechend sollte dies mit weiteren Methoden verifiziert und kontrolliert werden. Hierfür würden sich eine immunzytochemische Kolo-kalisation von NCAM und PolySia, eine isolierte Westernblot-Analyse auf NCAM oder eine Identifizierung des polysialylierten Proteins mittels massenspektrometrischer Verfahren eignen. In dieser Arbeit konnte durch zwei der erwähnten Methoden kein Nachweis von NCAM als polysialyliertes Protein auf HUVECs erbracht und dieses Ergebnis nicht bestätigt werden.

4.2 Sekretion von PolySia durch HUVECs

Es sollte zudem überprüft werden, ob HUVECs auch PolySia sezernieren. Hierfür wurde der Überstand der Zellen auf PolySia untersucht. Mittels Westernblot-Analyse konnte im Überstand ein Signal zwischen 80 und 150 kDA nachgewiesen werden (Abb.18). Dieses Signal entspricht vom Molekulargewicht dem des Zelllysates. Das

Signal um 230 kDA konnte im Zellüberstand nicht detektiert werden. Um sicher zu gehen, dass das nachgewiesene PolySia nicht aus dem FCS stammt, wurden die Zellen in FCS-freiem Medium kultiviert. Das verwendete Endothelzellbasalmedium wurde zusätzlich mittels Westernblot als PolySia-negativ befunden. In einem nächsten Schritt sollte nun eine direkte Vergleichbarkeit der PolySia-Konzentration im Zelllysate und Überstand geschaffen werden (Abb.20). Hierfür wurde von denselben HUVECs Zelllysate und Zellüberstand genommen und mittels Immunpräzipitation das gesamte PolySia aus beiden Proben aufgereinigt, sodass ein absoluter Vergleich der Konzentrationen möglich wurde. Zusätzlich wurden die Probenrückstände der Immunpräzipitation auf PolySia kontrolliert, um sicher zu stellen, dass jegliches PolySia isoliert wurde. Es zeigte sich eine deutlich höhere Konzentration an PolySia im Überstand als im Zelllysate. Auf Grund des gleichen Molekulargewichts und der höheren PolySia-Konzentration im Überstand lässt sich vermuten, dass das PolySia-Signal im Zelllysate ebenfalls zur Sekretion bestimmt ist und lediglich im Zelllysate gemessen wird, weil es noch intrazellulär vorlag, noch nicht sezerniert wurde und sich somit vielleicht noch im Aufbau befindet. Zusätzlich scheint dieses Ergebnis dadurch bestätigt zu werden, dass eine Stimulation mit dem Sialinsäurevorläufer ManNBut zu einer Reduktion des PolySia-Signals im Westernblot führt (Abb. 25). Da ManNBut nachweislich die endogene PolySia-Synthese unterschiedlicher Zellen zu reduzieren scheint lässt sich hieraus schlussfolgern, dass die nachgewiesene PolySia von HUVECs selbst synthetisiert wird und nicht von extern, z.B. in Form von Exosomen inkorporiert wird (Mahal et al. 2001).

Weiterhin sollte auch die PolySia im Überstand bezüglich des Trägerproteins analysiert werden. Auch hier konnte mittels PNGaseF-Verdau zuerst gesichert werden, dass es sich um ein N-glykosyliertes Protein handelt (Abb.19). Mittels massenspektrometrischer Verfahren, sowie Westernblot-Analysen konnte erneut kein Protein identifiziert werden (Daten noch nicht veröffentlicht). Auf Grund der höheren PolySia-Konzentration bietet sich es an, in folgenden Studien vor allem eine Identifizierung des Proteins aus dem Überstand zu erwägen. Nichtsdestotrotz sollte ebenfalls das Signal um 230 kDA, das im Zelllysate isoliert vorzufinden ist, auf Trägerproteine hin untersucht werden.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse liegt es nahe, dass der größere PolySia-Anteil in HUVECs zur Sekretion bestimmt ist. Der Mechanismus zur PolySia-Sekretion in HUVECs ist noch unbekannt. Allerdings ist eine Sekretion von PolySia in Form von PolySia-NCAM in anderen Zellen vielfach beschrieben worden. Hierbei werden unterschiedliche Ansätze diskutiert, wie polysialylierte Proteine sezerniert werden:

Bock und Mitarbeiter postulierten 1987, dass das polysialylierte Protein nach dem Golgi-Netzwerk auf direktem Wege sezerniert wird, ohne vorher in die Zellmembran eingebaut zu werden (Bock et al. 1987). Olsen und seine Arbeitsgruppe konnten dagegen 1993 zeigen, dass transmembran-gebundene NCAM-Isoformen (NCAM 180, NCAM 140) inklusive des transmembranären Ankers vollkommen sezerniert werden können (Olsen et al. 1993). Der am besten verstandene Mechanismus ist zuletzt die Abspaltung der extrazellulären Proteindomäne durch die Enzymfamilie der Metalloproteasen. Dieser Mechanismus wird Ectodomain-Shedding genannt (Diestel et al. 2005, Hubschmann et al. 2005). Auch im Falle der PolySia-Sekretion von HUVECs sind auf Basis dieser Mechanismen unterschiedliche Theorien vorstellbar:

Es könnte sich bei den zwei isolierten PolySia-Signalen im Zelllysate um zwei unterschiedliche polysialylierte Proteine handeln. Hierbei könnte das polysialylierte Protein um 230 kDA vermutlich in die Zelloberfläche von HUVECs integriert sein, da es nur im Zelllysate und nicht im Überstand zu finden ist. Dies würde vom Molekulargewicht mit PolySia-Nachweisen auf HUVECs aus vorherigen Veröffentlichungen übereinstimmen (Park et al. 2010). Die geringe PolySia-Konzentration könnte ein Grund dafür sein, warum dies in der Immunfärbung nicht erfassbar gewesen sein könnte. Das polysialylierte Protein zwischen 80 und 150 kDA dagegen könnte gemäß dem Mechanismus nach Bock von Anfang an zur Sekretion bestimmt sein. Dies würde dadurch bekräftigt werden, dass das Signal zwischen 80 und 150 kDA sowohl im Lysate (noch als Vesikel gespeichert) als auch im Überstand nachweisbar ist und zudem stets stärkere Signale im Überstand zeigte. Ein Sekretionsmechanismus nach Olsen wäre möglich, da sowohl im Lysate und im Überstand das lösliche Signal dasselbe Molekulargewicht besitzt. Es scheint aber abwegig, da hier eine deutlich sichtbare Konzentration an PolySia membran-integriert in der Immunfärbung vorliegen hätte müssen.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es sich bei beiden Signalen um dasselbe polysialylierte Protein handelt, das durch Ectodomain-Shedding von der 230 kDA-Form in eine lösliche Unterform zwischen 80 und 150kDA gespalten wird und als diese sezerniert werden würde (Dello Sbarba et al. 2002, Secher 2010). Gegen diese Theorie spräche allerdings der stetige Nachweis der vermeintlich löslichen Unterform im Zelllysate. Diese würde beim Ectodomain-Shedding nur im Überstand zu erwarten sein.

Insgesamt gilt es, mittels weiterer Untersuchungen, z.B. durch Inhibierung möglicher Metalloproteasen, den Mechanismus der Sekretion zu klären, genauso wie sicher zu stellen, ob es sich um ein oder mehrere unterschiedliche polysialylierte Proteine handelt.

4.3 Funktionelle Bedeutung von PolySia in HUVECs

Auf Grundlage dieser Ergebnisse sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, ob proangiogenetische Faktoren die Polysialylierung von HUVECs beeinflussen. Hierfür wurden HUVECs mit zentralen Wachstumsfaktoren wie bFGF oder VEGF stimuliert und die Polysialylierung sowohl des Zelllysates als auch des Überstandes mittels Westernblot untersucht.

Es zeigte sich, dass die Stimulation von HUVECs mit bFGF zu keiner signifikanten Veränderung der PolySia-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle führte. Dies gilt sowohl für die Analysen der Zelllysate, als auch der Zellüberstände (Abb.24).

Eine Stimulation mit VEGF dagegen zeigte eine deutliche Intensivierung des PolySia-Signals um 80-150 kDa sowohl im Lysat als auch im Überstand verglichen zur Kontrolle. Das Signal um 230 kDa erschien unverändert. Hieraus lässt sich schließen, dass VEGF wohl zu einer Steigerung der PolySia-Synthese in HUVECs führt (Abb.21 und 22). Dies sollte jedoch durch weitere quantitative HPLC-Methoden, wie z.B. der 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB)-HPLC Analyse kontrolliert und quantifiziert werden (Inoue et al. 2001).

Um eine absolute Vergleichbarkeit zwischen unstimulierten und VEGF stimulierten Zelllysaten und Überständen zu erhalten, wurde mittels Immunpräzipitation das gesamte PolySia isoliert und mittels Western Blot analysiert (Abb.23). Dieser Versuch bestätigte, dass VEGF sowohl im Zelllysate als auch im Zellüberstand zu einer Steigerung der PolySia-Konzentration führt. Zusätzlich zeigt es, dass die höchsten PolySia-Konzentrationen im VEGF-stimulierten Überstand zu finden sind. Somit scheint VEGF nicht nur die PolySia-Synthese in HUVECs, sondern auch die PolySia-Sekretion zu verstärken. Aber auch diese Ergebnisse sollten mittels HPLC-Analysen im Detail untersucht werden, um endgültige Rückschlüsse zu gewinnen.

Nach der Erkenntnis, dass VEGF wohl die Polysialylierung von HUVECs beeinflusst, sollte mittels eines Migrations-Assays die Funktion von PolySia für HUVECs näher untersucht werden. Hierfür wurde ein *in vitro* Scratch-Assay gewählt, der es ermöglicht die Migrationskapazität von HUVECs zu untersuchen (Abb.26) (Liang et al. 2007, Jonkman et al. 2014). Dieser Assay wurde aus mehreren Gründen gewählt. So ist bekannt, dass VEGF die Migrationsfähigkeit von HUVECs stimuliert (Ruhrberg et al. 2002, Gerhardt et al. 2003). Weiterhin spielen Adhäsions- und Deadhäsionsprozesse für die Migration von Zellen eine wichtige Rolle. Hier nehmen Polysialinsäuren nachweislich eine Schlüsselrolle ein, indem sie diese Zelladhäsionsprozesse beeinflussen (Rutishauser et al. 1988, Rutishauser 1998).

HUVECs wurden hierfür konfluent ausgesät und 24 Stunden vor Setzen der Wunden mittels FCS reduziertem Medium in einen „steady state“ versetzt, um auszuschließen, dass die Zellen die Wunden durch Proliferation schließen. Dann wurden gleichmäßige Wunden gesetzt und anschließend Medium mit oder ohne aktiver EndoN ausgelegt. Dieses Enzym sorgt für die Degradierung der PolySia. Schließlich wurden zum Zeitpunkt 0 und 24 Stunden Photos gemacht. Die Analysen ergaben, dass die Degradierung von PolySia in einer gesteigerten Migrationskapazität der HUVECs resultierte. In Abbildung 26 lässt sich erkennen, dass der Verlust von PolySia die Migration der HUVECs um ca. 30 % steigerte. Im Umkehrschluss lässt sich daraus folgern, dass PolySia die Migrationsfähigkeit von HUVECs reduziert.

Folglich stellt sich die Frage, über welchen Mechanismus PolySia die Migration von HUVECs beeinflussen könnte. PolySia ist als integrierter Bestandteil der Glykokalix bekannt für seinen negativen Einfluss auf Zelladhäsions-Mechanismen. Auf diese Weise entwickelte sich PolySia zu einem Schlüsselfaktor in der prä- und postnatalen Entwicklung von Säugetieren, besonders in der Neurogenese (Colley et al. 2014, Schnaar et al. 2014, Galuska et al. 2017). Hier reguliert PolySia Migrations- und Sprossungsprozesse, die ebenfalls in der Angiogenese von Bedeutung sein könnten. So könnte durch die PolySia-Degradierung auf HUVECs Adhäsionsmoleküle wie z.B. NCAM vermehrt mit Proteoglykanen der extrazellulären Matrix wechselwirken und durch vermehrte Adhäsionsprozesse zu einer Verstärkung der Migration führen (Guan et al. 2015). Auf Grund der hier erarbeiteten Ergebnisse scheint diese Wirkungsweise von PolySia im Migrationsprozess von HUVECs eher unwahrscheinlich, da die Hauptkonzentration an PolySia frei von HUVECs sezerniert wird. Hieraus lässt sich vermuten, dass PolySia seinen gemessenen Effekt nicht direkt über den Einfluss auf Zelladhäsionsmechanismen bewirkt.

Neben der Wirkung auf Zelladhäsion beeinflusst PolySia auf viele weitere Weisen Proliferations- und Migrationsprozesse (Hildebrandt et al. 2010, Sato et al. 2013, Colley et al. 2014). Unter anderem ist nachgewiesen, dass PolySia mit Wachstumsfaktoren interagiert. So hat Sato und Arbeitsgruppe zeigen können, dass der Effekt von BDNF (brain-derived neurotrophic factor) auf neuronalen Zellen durch eine Polysialylierung dieser Zellen intensiviert wird. Hieraus vermuteten sie, dass PolySia BDNF auf der Zelloberfläche von neuronalen Zellen konzentriert, sodass deren Bindungskapazität am entsprechenden Rezeptor verstärkt wird (Kanato et al. 2008). Weiterhin ist bekannt, dass PolySia auf neuronalen Zellen mit dem Wachstumsfaktor bFGF interagiert. Hierdurch wird bFGF abgefangen und das bFGF-Signalling reduziert (Ono et al. 2012). Die Wachstumsfaktoren bFGF, genauso wie VEGF spielen ebenfalls eine wichtige Rolle für Endothelzellen und Angiogenese. Wie bereits weiter oben beschrieben, sind

diese Wachstumsfaktoren die zwei wichtigsten bekannten proangiogenetischen Faktoren, die zahlreiche angiogenetische Prozesse stimulieren. Hierzu zählen Migration-, Proliferation-, Sprossung- sowie Differenzierungsprozesse von Endothelzellen (Shweiki et al. 1992, Ruhrberg et al. 2002, Gerhardt 2008). Während bereits nachgewiesen ist das membrangebundenes PolySia mit Wachstumsfaktoren interagiert, ist es somit vorstellbar, dass sezerniertes PolySia ebenfalls mit diesen Wachstumsfaktoren interagieren könnte. Diese Vermutung wird durch weitere Ergebnisse aus unserem Labor von Andrea Kühnle (AG Galuska) bekräftigt (Strubl et al. 2018). Hier konnte mittels einer Native-Gelelektrophorese nachgewiesen werden, dass freie Polysialinsäuren den Wachstumsfaktor VEGF binden und mit diesem interagieren können.

Nachdem bekannt ist, dass HUVECs zu ihrer eigenen Stimulation bFGF und VEGF exprimieren (Antoine et al. 2005, Tan et al. 2016), wäre es vorstellbar, dass sezernierte PolySia mit bFGF und VEGF interagiert und auf diese Weise die Rezeptorbindung und Signalwirkung reduziert und reguliert (Abb. 28).

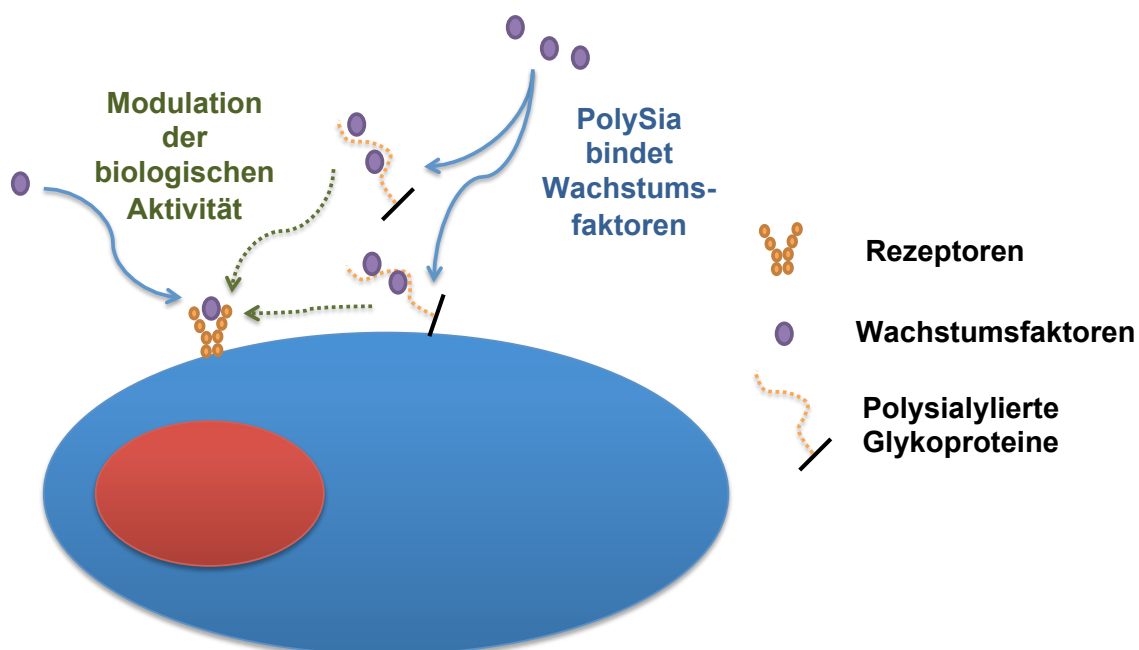


Abbildung 28 Theoretische Darstellung zur PolySia-Interaktion mit Wachstumsfaktoren in HUVECs

Basierend auf einem Model von Sato et al (Ono et al. 2012) lässt sich vermuten, dass PolySia Wachstumsfaktoren auch im Falle von HUVECs binden könnte und hierdurch die Bindungskapazität an entsprechenden Signalrezeptoren moduliert werden würde (Strubl et al. 2018) (CC-BY.)

Durch die Degradierung von PolySia mittels Endoneuraminidase N könnte also die Konzentration an freien proangiogenetischen Faktoren relativ erhöht werden und so zu einer Steigerung der Migrationskapazität führen.

In Kombination mit dem Nachweis, dass VEGF die PolySia-Sekretion von HUVECs steigert, obwohl PolySia einen negativen Einfluss auf die Migrationskapazität hat, scheint es, dass VEGF selbst seine Inhibition stimuliert (Feedback-Inhibition).

Dies könnte einen negativen Feedback-Kreislauf darstellen, durch welchen die VEGF-Wirkung auf Zellen feinreguliert wird (Abb. 29).

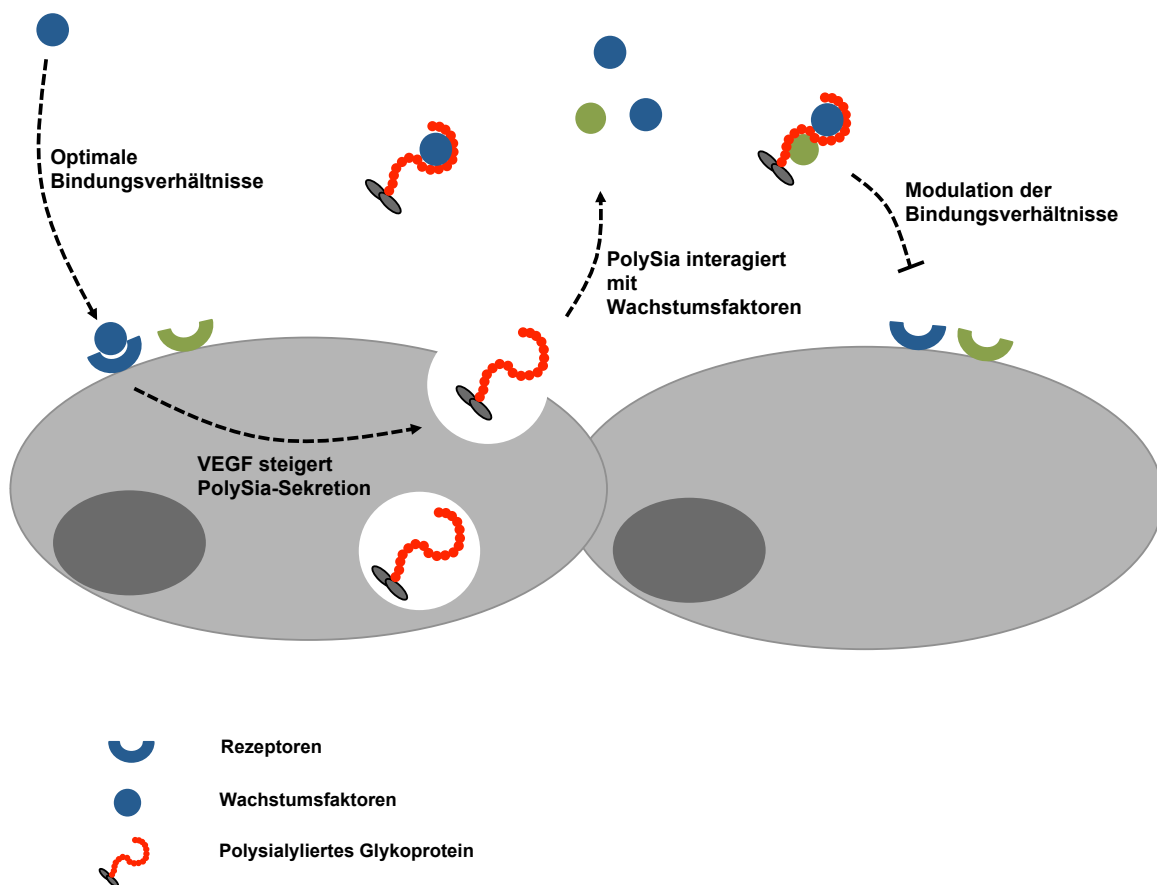


Abbildung 29 Theoretische Darstellung zur PolySia-Sekretion von HUVECs

HUVECs sezernieren polysialylierte Glykoproteine (Rot). VEGF (Blauer Kreis) steigert hierbei die Synthese und Sekretion dieser PolySia-Träger. Die PolySia-Ketten könnten mit Wachstumsfaktoren wie bFGF (Grüner Kreis) und VEGF interagieren und dadurch die Rezeptorbindung (Blaue und Grüne Rezeptoren) der Signalmoleküle modulieren. Zusammenfassend könnte es sich hierbei um einen negativen Feedback-Kreislauf des Wachstumsfaktors VEGF handeln. Erstellt nach (Strubl et al. 2018)

Solche Feedback-Kreisläufe sind in vielen biochemischen Signalwegen beschrieben. In der Angiogenese ist nachgewiesen, dass ein VEGF-Gradient die Grundlage für differenzierte Angiogenese-Mechanismen, wie Migrationsprozesse, ist (Stone et al.

1995, Provis et al. 1997, West et al. 2005, Gerhardt 2008). Die Sekretion von PolySia könnte eine weitere Möglichkeit darstellen diesen gerichteten Wachstumsfaktor-Gradienten über eine größere Distanz hin mit zu bilden und zu beeinflussen. In der Endothellzelldifferenzierung z.B. ist bereits bekannt, dass VEGF auf der einen Seite durch direkte VEGFR-2-Wirkung Zellen zu Tipzellen differenziert und auf der anderen Seite an Nachbarzellen seine eigene Wirkung beschränkt, indem es VEGFR-2 herunter- und den vielfach bindungsaffineren VEGFR-1 als VEGF-Falle hochreguliert, um eine Zelldifferenzierung zu bewirken (Gerhardt et al. 2003, Roca et al. 2007, Dowlati 2010). In diesem Rahmen wäre es somit auch vorstellbar, dass VEGF durch PolySia-Sekretion eine weitere Limitierung seiner eigenen Wirkung initiiert.

4.4 Ausblick

4.4.1 Zukünftige Erforschung von PolySia in der Angiogenese

Diese Arbeit konnte die Existenz von PolySia in HUVECs bestätigen und zeigen, dass diese von HUVECs vor allem sezerniert werden. Zusätzlich konnte man nachweisen, dass VEGF die PolySia-Sekretion stimuliert und diese einen Einfluss auf angiogenetische Mechanismen, wie z.B. Migrationsprozesse, haben. Hiermit wurde ein erster Einblick in die Existenz von PolySia in Angiogenese-Mechanismen gegeben. Es werden viele weitere Schritte nötig sein, um die Funktion von PolySia in diesem Bereich genauer zu beschreiben. Allen voran wird es wichtig sein, das Trägerprotein in HUVECs zu identifizieren, um genauere Hintergrundinformationen über mögliche Mechanismen und Funktionen zu bekommen und es in den theoretischen Rahmen der Angiogenese einordnen zu können. Zusätzlich muss der Einfluss von PolySia in mehreren verschiedenen Mechanismen der Angiogenese, wie z.B. in Sprossungsmechanismen, Lumenbildung und Zelldifferenzierung untersucht werden. Nicht zuletzt sollte geprüft werden, ob PolySia auch einen signifikanten Einfluss auf Endothelzellen *in vivo* besitzt.

Hierbei wird es interessant werden, pathologische Zustände der Angiogenese, wie z.B. in Neoplasien oder ischämischen Arealen auf Veränderungen der Polysialylierung zu untersuchen.

Denn hier liegt die Notwendigkeit, mittels potenter Medikamente die Vaskularisierung und Angiogenese künstlich zu regulieren. Im Bereich der Neoplasien wird seit langem versucht die Gefäßbildung von Tumoren aktiv zu stoppen und darüber das Tumorwachstum, sowie die Metastasierung zu verhindern (Folkman 1996, Folkman

2006). Bisher geschieht das beiläufig vor allem durch allgemein zytotoxische Maßnahmen. Eine gezielte, spezifische Therapie gegen Tumorangiogenese könnte viele Kollateralschäden ersparen. Innerhalb von Entzündungsprozessen, sowie ischämischen Arealen ist dagegen das Ziel der Forschung künstlich die Angiogenese zu stimulieren, um so den Blutfluss zu stabilisieren bzw. zu fördern (Ferrara et al. 1999, Isner et al. 1999, Carmeliet et al. 2000).

4.4.2 Mögliches therapeutisches Potential

Wenn die Bedeutung von PolySia in Angiogenese-Prozessen sich zukünftig bestätigen sollte, könnte eine künstliche Regulierung der PolySia eine weitere Angriffsmöglichkeit für diese therapeutischen Vorhaben sein. In einigen Gebieten werden bereits Medikamente getestet, die die Polysialylierung künstlich beeinflussen, um z.B. das mühsame Wachstum von Nervenzellen zu verbessern oder altersbedingte Makuladegeneration (AMD) zu behandeln (Langmann et al. 2017). Auf diese Weise hat sich PolySia bereits als therapeutischer Angriffspunkt bewiesen, indem es Möglichkeiten gibt, sowohl die Polysialylierung künstlich zu applizieren als auch zu reduzieren.

So lässt sich PolySia z.B. künstlich herstellen. Die Arbeitsgruppe um Steinkellner konnte eine Pflanzen-basierte PolySia-Synthese etablieren (Kallolimath et al. 2016). In einer Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe, an der ich ebenfalls beteiligt war, konnte nachgewiesen werden dass diese pflanzliche PolySia auch funktional aktiv ist. Auf Basis vorheriger Erkenntnisse, dass PolySia mit Histonen interagiert und so die Zytotoxizität auf körpereigene Zellen reduziert (Saffarzadeh et al. 2012, Ulm et al. 2013) sollten pflanzliche PolySia auf deren zytoprotektive Eigenschaften gegen extrazelluläre Histone hin untersucht werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die pflanzlich synthetisierte PolySia die Zytotoxizität der Histone reduzierte. Als Kontrolle wurden Histone mit pflanzlich-synthetisierten Bi-Sialinsäuren inkubiert. Hier war keine Reduktion der Zytotoxizität zu sehen. Zusammenfassend lässt sich daraus schlussfolgern, dass es gelungen ist funktional wirksame PolySia in Pflanzen herzustellen.

Desweiteren gibt es bereits Möglichkeiten PolySia zu therapeutischen Zwecken zu degradieren. Neben der Möglichkeit die Polysialylierung mittels des spezifischen Enzyms EndoN zu reduzieren (Frosch et al. 1985, Stummeyer et al. 2005), konnte zusätzlich gezeigt werden, dass der künstliche Sialinsäurevorläufer ManNBut als Inhibitor der endogenen Polysia-Synthese unterschiedlicher Zellen wirkt, indem es die Effizienz der Polysialyltransferasen stark beeinträchtigt (Mahal et al. 2001). Eine

Behandlung von Neuroblastomazellen mit künstlichen Sialinsäurevorläufern führte weiterhin zu einer signifikanten Reduktion der Polysialylierung und reduzierte dadurch die Migration und Invasionskapazität dieser Zellen, sodass sich künstliche Sialinsäurevorläufer als potentielle Therapiemöglichkeiten empfohlen haben (Gnanapragassam et al. 2016). Auch in dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass künstliche Sialinsäurevorläufer die Polysialylierung von HUVECs beeinflussen (Abb. 25). Die Aussaat von HUVECs mit dem Sialinsäurevorläufer ManNBut führte zu einer starken Reduzierung bis Inhibierung der Polysialylierung im Zelllysate sowie im Zellüberstand. Hierbei muss in Zukunft allerdings gesichert werden, dass die Stimulation mit diesem Sialinsäurevorläufer ManNBut auch wirklich die Polysialylierung reduziert und nicht evtl nur die Bindungsmöglichkeit des spezifischen monoklonalen anti-PolySia-Antikörpers beeinflusst, sodass PolySia aus künstlichen Sialinsäuren vorhanden ist und nur nicht mittels Westernblot-Analyse erkannt werden konnte (Gnanapragassam et al. 2016).

Auf der anderen Seite ist bekannt, dass der Sialinsäurevorläufer ManNAc die Polysialylierung in Zellen stimulieren und so einen Ansatz für eine gegensätzliche Therapie bieten kann (Mahal et al. 2001, Horstkorte et al. 2004, Bork et al. 2005). Dies konnte hier in HUVECs allerdings nicht beobachtet werden. So führte eine Stimulation mit ManNAc zu keiner nachweisbaren Steigerung der Polysialylierung im Zelllysate und Zellüberstand. Diese Ansätze könnten erste Grundlagen für zukünftige Entwicklungen von therapeutischen Applikationen darstellen.

5 Zusammenfassung

In Säugern ist Polysialinsäure (PolySia) ein Homopolymer aus α 2,8-verknüpften N-Acetylneuraminsäuren, die von den beiden Polysialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV gebildet werden kann. Als posttranslationale Modifikation von momentan 7 bekannten polysialylierten Proteinen beeinflussen sie zahlreiche Zelladhäsions-, sowie Migrationsprozesse in unterschiedlichsten Geweben. Dies beruht nicht nur auf ihrer starken negativen Ladung durch zahlreiche Carboxylgruppen, sondern auch auf ihrer Fähigkeit direkt mit Rezeptoren und Signalmolekülen zu interagieren.

Da bereits ein Einfluss von Sialinsäuren auf die Angiogenese nachgewiesen werden konnte, sollte in dieser Arbeit an Hand von humanen umbilikalen Endothelzellen (HUVECs) als Zellkulturmodell die Polysialylierung von HUVECs und der Einfluss von PolySia auf deren Migrationskapazität analysiert werden.

Während bereits andere Arbeitsgruppen PolySia auf HUVECs nachgewiesen haben, konnte diese Existenz von PolySia auf HUVECs in dieser Arbeit bestätigt werden, wobei erstmals ST8SialIV als prädominate Polysialyltransferase detektiert wurde. Auch wenn das polysialylierte Trägerprotein unbekannt verbleibt, konnte gezeigt werden, dass es über N-Glykane an seine Träger gebunden ist. Weiterhin wurde festgestellt, dass der Großteil an PolySia nicht in die Zellmembranen integriert, sondern von HUVECs in den Zellüberstand sezerniert wird.

Auf dieser Grundlage sollte ein möglicher funktioneller Einfluss von PolySia auf HUVECs untersucht werden. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit dem angiogenetischen Wachstumsfaktor vascular endothelial growth factor (VEGF) zu einer Steigerung der PolySia-Expression, sowie Sekretion in HUVECs führt. Weitere Stimulationen wie z.B. durch bFGF zeigten keinen Einfluss. Zusätzlich konnten erste Hinweise erbracht werden, dass durch künstliche Sialinsäurevorläufer die Polysialylierung von HUVECs beeinflussbar ist. Abschließend zeigten MigrationAssays, dass die Degradierung von PolySia *in vitro* die Migration von HUVECs steigert.

Nachdem bekannt ist, dass PolySia Wachstumsfaktoren wie bFGF and VEGF direkt binden und darüber deren Funktion regulieren kann, ist an Hand dieser Ergebnisse zu vermuten, dass PolySia auf diese Weise auch Angiogenese-Prozesse wie z.B. die Migration von HUVECs beeinflussen könnte.

6 Summary

In mammals, polysialic acid (polySia) is a homopolymer that consists of α 2,8-linked N-acetylneuraminic acids and can be generated by the polysialyltransferases ST8SialII and ST8SialIV. As a posttranslational modification of seven so-far detected polysialylated proteins, polySia influences several cell adhesion and migration processes in different organs. These effects are not only based on polySia's negative charge due to the presence of many carboxyl groups but also occur via its direct interaction with receptors and signal molecules.

Since sialic acids affect mechanisms during angiogenesis, the polysialylation status of HUVECs and the impact of polySia on angiogenic mechanisms were characterized using human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as the cell culture model.

The obtained results confirmed that HUVECs generate polySia. Interestingly, ST8SialIV was detected as the predominant polysialyltransferase. Although the polysialylated carrier protein remains unknown, it was shown that polySia is connected via N-glycans to its carrier. Intriguingly, the main part of polySia was not found in cellular compartments. It seems that polySia is preferentially secreted.

Based on these results, this thesis examined the functional effects of polySia on HUVECs. The stimulation of these cells with vascular endothelial growth factor (VEGF) increased polysialylation status, whereas stimulation with growth factors like bFGF showed no effect on polysialylation status. Additionally, treatment with artificial sialic acid precursor implied that polysialylation in HUVECs can be modulated.

Finally, using a migration assay, it was shown that the degradation of polySia increases the migration capacity of HUVECs *in vitro*. Since polySia is known to bind and influence the function of growth factors like bFGF and VEGF, these results suggest that polySia may affect angiogenic mechanisms like migration processes.

7 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovines Serumalbumin
CAM	cell adhesion molecule
CMP	Cytosin-Monophosphat
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMB	1,2-Diamino-4,5-Methylenedioxybenzol
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECBM	Endothelial Cell Basal Medium
ECGM	Endothelial Cell Growth Medium
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EndoN	Endoneuraminidase N
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
GNE	UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase
H	Stunde
HCL	Salzsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
HUVECs	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
Ig	Immunglobulin
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation (Affinitätsaufreinigung)
kDa	kilo Dalton
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid

mAK	monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
ManNAc	2-N-Acetyl-Mannosamin
ManNBut	2-N-Butyl-Mannosamin
ManNProp	2-N-Propionyl-Mannosamin
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
NCAM	neurales Zelladhäsionsmolekül
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
NRP-1	Neuropilin-1
NRP-2	Neuropilin-2
OT	Objektträger
PBS	phosphate-buffered sialine
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNGaseF	N-Glycosidase F
PolySia	Polysialinsäure
PolySia-NCAM	polysialyliertes NCAM
PSA	Polysialic Acid
PST-Domäne	Polysialyltransferasen-Domäne
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sia	Sialinsäure
SiaM	Sialylierungsmotiv
ST8SiaII	α -N-Acetylneuraminid- α -2,8-Sialyltransferase 2
ST8SiaIV	α -N-Acetylneuraminid- α -2,8-Sialyltransferase 4
SynCAM	Synaptic Cell Adhesion Molecule
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGN 38	Trans-Golgi Netzwerkprotein 38
TOF	time of flight
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VS	very small

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung einer Biomembran (OpenStax 2018) (CC-BY)	1
Abbildung 2 Glykokalix einer Endothelzelle (Oshima et al. 2018)(CC-BY-NC).....	2
Abbildung 3 Struktur von N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac)	3
Abbildung 4 Struktur von PolySia	4
Abbildung 5 Sialinsäurebiosynthese bei Menschen	5
Abbildung 6 Schema eines polysialylierten N-Glykans	7
Abbildung 7 Schematische Darstellung der Funktionen von Sialinsäuren.....	8
Abbildung 8 Übersicht der Funktion von PolySia an Hand von polysialyliertem NCAM.	10
Abbildung 9 Schematische Darstellung der VEGF abhängigen Sprossungsprozesse	14
Abbildung 10 Darstellung des Einflusses von Sialinsäuren auf die Lumenbildung	16
Abbildung 11 Einfluss von künstlichen Sialinsäurevorläufern auf die Sprossungskapazität von HUVECs.....	17
Abbildung 12 Westernblot-Nachweis von PolySia in HUVECs.....	40
Abbildung 13 Analyse der polysialylierten Glykosylierungsform im HUVEC-Lysat	40
Abbildung 14 Visualisierung von PolySia in HUVECs mittels Immunfluoreszenz-Färbung ...	41
Abbildung 15 Visualisierung von PolySia in HUVECs mittels Immunfluoreszenz-Färbung ...	42
Abbildung 16 Nachweis der Polysialyltransferasen in HUVECs	43
Abbildung 17 Westernblot-Analyse zum Nachweis des polysialylierten Trägerproteins	44
Abbildung 18 Westernblot-Nachweis von PolySia im HUVEC-Überstand.....	45
Abbildung 19 Analyse der Glykosylierungsform im HUVEC-Überstand	46
Abbildung 20 Vergleich der PolySia-Konzentration von HUVEC-Lysat und -Überstand	47
Abbildung 21 Analyse der Polysialylierung VEGF-stimulierter HUVECs	50
Abbildung 22 Analyse der Polysialylierung VEGF-stimulierter HUVEC-Überstände	51
Abbildung 23 Vergleich der PolySia-Konzentration von VEGF stimuliertem HUVEC-Lysat und -Überstand	52
Abbildung 24 Analyse der Polysialylierung bFGF-stimulierter HUVECs und Überstände	53
Abbildung 25 Einfluss von künstlichen Sialinsäurevorläufern auf die Polysialylierung von HUVECs	55
Abbildung 26 Einfluss der Polysialylierung von HUVECs auf deren Migrationskapazität	56
Abbildung 27 Nachweis von PolySia in ECBM inkl. 0,5% FCS	57
Abbildung 28 Theoretische Darstellung zur PolySia-Interaktion mit Wachstumsfaktoren in HUVECs	64
Abbildung 29 Theoretische Darstellung zur PolySia-Sekretion von HUVECs	65

9 Referenzen

- Adair, T. H., W. J. Gay and J. P. Montani (1990). "Growth regulation of the vascular system: evidence for a metabolic hypothesis." Am J Physiol **259**(3 Pt 2): R393-404.
- Aminoff, D., W. F. Bruegge, W. C. Bell, K. Sarpolis and R. Williams (1977). "Role of sialic acid in survival of erythrocytes in the circulation: interaction of neuraminidase-treated and untreated erythrocytes with spleen and liver at the cellular level." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(4): 1521-1524.
- Angata, K. and M. Fukuda (2003). "Polysialyltransferases: major players in polysialic acid synthesis on the neural cell adhesion molecule." Biochimie **85**(1-2): 195-206.
- Angata, K., M. Suzuki and M. Fukuda (2002). "ST8Sia II and ST8Sia IV polysialyltransferases exhibit marked differences in utilizing various acceptors containing oligosialic acid and short polysialic acid. The basis for cooperative polysialylation by two enzymes." J Biol Chem **277**(39): 36808-36817.
- Angata, K., M. Suzuki, J. McAuliffe, Y. Ding, O. Hindsgaul and M. Fukuda (2000). "Differential biosynthesis of polysialic acid on neural cell adhesion molecule (NCAM) and oligosaccharide acceptors by three distinct alpha 2,8-sialyltransferases, ST8Sia IV (PST), ST8Sia II (STX), and ST8Sia III." J Biol Chem **275**(24): 18594-18601.
- Angata, T. and A. Varki (2002). "Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective." Chem Rev **102**(2): 439-469.
- Antoine, M., W. Wirz, C. G. Tag, M. Mavituna, N. Emans, T. Korff, V. Stoldt, A. M. Gressner and P. Kiefer (2005). "Expression pattern of fibroblast growth factors (FGFs), their receptors and antagonists in primary endothelial cells and vascular smooth muscle cells." Growth Factors **23**(2): 87-95.
- Bayer, N. B., U. Schubert, Z. Senturk, S. Rudloff, S. Frank, H. Hausmann, H. Geyer, R. Geyer, K. T. Preissner and S. P. Galuska (2013). "Artificial and natural sialic acid precursors influence the angiogenic capacity of human umbilical vein endothelial cells." Molecules **18**(3): 2571-2586.
- Bevilacqua, M. P. and R. M. Nelson (1993). "Selectins." J Clin Invest **91**(2): 379-387.
- Bhide, G. P. and K. J. Colley (2017). "Sialylation of N-glycans: mechanism, cellular compartmentalization and function." Histochem Cell Biol **147**(2): 149-174.
- Blix, F. G., A. Gottschalk and E. Klenk (1957). "Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids." Nature **179**(4569): 1088.
- Bock, E., K. Edvardsen, A. Gibson, D. Linnemann, J. M. Lyles and O. Nybroe (1987). "Characterization of soluble forms of NCAM." FEBS Lett **225**(1-2): 33-36.
- Bonfanti, L. (2006). "PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis." Prog Neurobiol **80**(3): 129-164.

- Bork, K., W. Reutter, R. Gerardy-Schahn and R. Horstkorte (2005). "The intracellular concentration of sialic acid regulates the polysialylation of the neural cell adhesion molecule." FEBS Lett **579**(22): 5079-5083.
- Bouck, N., V. Stellmach and S. C. Hsu (1996). "How tumors become angiogenic." Adv Cancer Res **69**: 135-174.
- Boulton, M. E., J. Cai and M. B. Grant (2008). "gamma-Secretase: a multifaceted regulator of angiogenesis." J Cell Mol Med **12**(3): 781-795.
- Bratosin, D., J. Mazurier, H. Debray, M. Lecocq, B. Boilly, C. Alonso, M. Moisei, C. Motas and J. Montreuil (1995). "Flow cytofluorimetric analysis of young and senescent human erythrocytes probed with lectins. Evidence that sialic acids control their life span." Glycoconj J **12**(3): 258-267.
- Brem, S., H. Brem, J. Folkman, D. Finkelstein and A. Patz (1976). "Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous." Cancer Res **36**(8): 2807-2812.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." Nature **407**(6801): 249-257.
- Carmeliet, P. and M. Tessier-Lavigne (2005). "Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring." Nature **436**(7048): 193-200.
- Chen, H. Y., A. K. Challa and A. Varki (2006). "9-O-acetylation of exogenously added ganglioside GD3. The GD3 molecule induces its own O-acetylation machinery." J Biol Chem **281**(12): 7825-7833.
- Chen, J. Y., Y. A. Tang, S. M. Huang, H. F. Juan, L. W. Wu, Y. C. Sun, S. C. Wang, K. W. Wu, G. Balraj, T. T. Chang, W. S. Li, H. C. Cheng and Y. C. Wang (2011). "A novel sialyltransferase inhibitor suppresses FAK/paxillin signaling and cancer angiogenesis and metastasis pathways." Cancer Res **71**(2): 473-483.
- Cheng, M. C., C. H. Lin, H. J. Lin, Y. P. Yu and S. H. Wu (2004). "Hydrolysis, lactonization, and identification of alpha(2 --> 8)/alpha(2 --> 9) alternatively linked tri-, tetra-, and polysialic acids." Glycobiology **14**(2): 147-155.
- Cheng, M. C., S. L. Lin, S. H. Wu, S. Inoue and Y. Inoue (1998). "High-performance capillary electrophoretic characterization of different types of oligo- and polysialic acid chains." Anal Biochem **260**(2): 154-159.
- Colley, K. J., K. Kitajima and C. Sato (2014). "Polysialic acid: biosynthesis, novel functions and applications." Crit Rev Biochem Mol Biol **49**(6): 498-532.
- Corfield, A. P., M. Wember, R. Schauer and R. Rott (1982). "The specificity of viral sialidases. The use of oligosaccharide substrates to probe enzymic characteristics and strain-specific differences." Eur J Biochem **124**(3): 521-525.
- Coussens, L. M., W. W. Raymond, G. Bergers, M. Laig-Webster, O. Behrendtsen, Z. Werb, G. H. Caughey and D. Hanahan (1999). "Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis." Genes Dev **13**(11): 1382-1397.
- Croci, D. O., J. P. Cerliani, T. Dalotto-Moreno, S. P. Mendez-Huergo, I. D. Mascanfroni, S. Dergan-Dylon, M. A. Toscano, J. J. Caramelo, J. J. Garcia-Vallejo, J. Ouyang, E. A.

- Mesri, M. R. Junttila, C. Bais, M. A. Shipp, M. Salatino and G. A. Rabinovich (2014). "Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors." *Cell* **156**(4): 744-758.
- Croci, D. O., J. P. Cerliani, N. A. Pinto, L. G. Morosi and G. A. Rabinovich (2014). "Regulatory role of glycans in the control of hypoxia-driven angiogenesis and sensitivity to anti-angiogenic treatment." *Glycobiology* **24**(12): 1283-1290.
- Curreli, S., Z. Arany, R. Gerardy-Schahn, D. Mann and N. M. Stamatos (2007). "Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions." *J Biol Chem* **282**(42): 30346-30356.
- D'Haene, N., S. Sauvage, C. Maris, I. Adanja, M. Le Mercier, C. Decaestecker, L. Baum and I. Salmon (2013). "VEGFR1 and VEGFR2 involvement in extracellular galectin-1- and galectin-3-induced angiogenesis." *PLoS One* **8**(6): e67029.
- Dall'Olio, F. and M. Chiricolo (2001). "Sialyltransferases in cancer." *Glycoconj J* **18**(11-12): 841-850.
- Daniel, L., P. Durbec, E. Gautherot, E. Rouvier, G. Rougon and D. Figarella-Branger (2001). "A nude mice model of human rhabdomyosarcoma lung metastases for evaluating the role of polysialic acids in the metastatic process." *Oncogene* **20**(8): 997-1004.
- Datta, A. K. and J. C. Paulson (1995). "The sialyltransferase "sialylmotif" participates in binding the donor substrate CMP-NeuAc." *J Biol Chem* **270**(4): 1497-1500.
- Datta, A. K., A. Sinha and J. C. Paulson (1998). "Mutation of the sialyltransferase S-sialylmotif alters the kinetics of the donor and acceptor substrates." *J Biol Chem* **273**(16): 9608-9614.
- De Smet, F., I. Segura, K. De Bock, P. J. Hohensinner and P. Carmeliet (2009). "Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(5): 639-649.
- Dello Sbarba, P. and E. Rovida (2002). "Transmodulation of cell surface regulatory molecules via ectodomain shedding." *Biol Chem* **383**(1): 69-83.
- Diestel, S., C. L. Hinkle, B. Schmitz and P. F. Maness (2005). "NCAM140 stimulates integrin-dependent cell migration by ectodomain shedding." *J Neurochem* **95**(6): 1777-1784.
- Dowlati, A. (2010). "Hunting and trapping the vascular endothelial growth factor." *J Clin Oncol* **28**(2): 185-187.
- Duchesne, L., B. Tissot, T. R. Rudd, A. Dell and D. G. Fernig (2006). "N-glycosylation of fibroblast growth factor receptor 1 regulates ligand and heparan sulfate co-receptor binding." *J Biol Chem* **281**(37): 27178-27189.
- Eddy, H. A. and G. W. Casarett (1973). "Development of the vascular system in the hamster malignant neurilemmoma." *Microvasc Res* **6**(1): 63-82.
- Ferrara, N. and K. Alitalo (1999). "Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors." *Nat Med* **5**(12): 1359-1364.

- Ferrara, N., H. P. Gerber and J. LeCouter (2003). "The biology of VEGF and its receptors." Nat Med **9**(6): 669-676.
- Finne, J. (1982). "Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain." J Biol Chem **257**(20): 11966-11970.
- Finne, J., U. Finne, H. Deagostini-Bazin and C. Goridis (1983). "Occurrence of alpha 2-8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule." Biochem Biophys Res Commun **112**(2): 482-487.
- Folkman, J. (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." N Engl J Med **285**(21): 1182-1186.
- Folkman, J. (1995). "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." Nat Med **1**(1): 27-31.
- Folkman, J. (1996). "Fighting cancer by attacking its blood supply." Sci Am **275**(3): 150-154.
- Folkman, J. (2002). "Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis." Semin Oncol **29**(6 Suppl 16): 15-18.
- Folkman, J. (2006). "Angiogenesis." Annu Rev Med **57**: 1-18.
- Frosch, M., I. Gorgen, G. J. Boulnois, K. N. Timmis and D. Bitter-Suermann (1985). "NZB mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens: isolation of an IgG antibody to the polysaccharide capsules of Escherichia coli K1 and group B meningococci." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(4): 1194-1198.
- Fujimoto, I., J. L. Bruses and U. Rutishauser (2001). "Regulation of cell adhesion by polysialic acid. Effects on cadherin, immunoglobulin cell adhesion molecule, and integrin function and independence from neural cell adhesion molecule binding or signaling activity." J Biol Chem **276**(34): 31745-31751.
- Fukumura, D., R. Xavier, T. Sugiyama, Y. Chen, E. C. Park, N. Lu, M. Selig, G. Nielsen, T. Taksir, R. K. Jain and B. Seed (1998). "Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells." Cell **94**(6): 715-725.
- Galuska, C. E., T. Lutteke and S. P. Galuska (2017). "Is Polysialylated NCAM Not Only a Regulator during Brain Development But also during the Formation of Other Organs?" Biology (Basel) **6**(2).
- Galuska, S. P., R. Geyer, R. Gerardy-Schahn, M. Muhlenhoff and H. Geyer (2008). "Enzyme-dependent variations in the polysialylation of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in vivo." J Biol Chem **283**(1): 17-28.
- Galuska, S. P., I. Oltmann-Norden, H. Geyer, B. Weinhold, K. Kuchelmeister, H. Hildebrandt, R. Gerardy-Schahn, R. Geyer and M. Muhlenhoff (2006). "Polysialic acid profiles of mice expressing variant allelic combinations of the polysialyltransferases ST8Siall and ST8SialV." J Biol Chem **281**(42): 31605-31615.
- Galuska, S. P., M. Rollenhagen, M. Kaup, K. Eggers, I. Oltmann-Norden, M. Schiff, M. Hartmann, B. Weinhold, H. Hildebrandt, R. Geyer, M. Muhlenhoff and H. Geyer (2010). "Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(22): 10250-10255.

- Geretti, E., A. Shimizu and M. Klagsbrun (2008). "Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis." Angiogenesis **11**(1): 31-39.
- Gerhardt, H. (2008). "VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting." Organogenesis **4**(4): 241-246.
- Gerhardt, H., M. Golding, M. Fruttiger, C. Ruhrberg, A. Lundkvist, A. Abramsson, M. Jeltsch, C. Mitchell, K. Alitalo, D. Shima and C. Betsholtz (2003). "VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia." J Cell Biol **161**(6): 1163-1177.
- Gimbrone, M. A., Jr., R. S. Cotran and J. Folkman (1974). "Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis." J Cell Biol **60**(3): 673-684.
- Gimbrone, M. A., Jr., S. B. Leapman, R. S. Cotran and J. Folkman (1972). "Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization." J Exp Med **136**(2): 261-276.
- Gitay-Goren, H., S. Soker, I. Vlodavsky and G. Neufeld (1992). "The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules." J Biol Chem **267**(9): 6093-6098.
- Gnanapragassam, V. S., K. Bork, C. E. Galuska, S. P. Galuska, D. Glanz, M. Nagasundaram, M. Bache, D. Vordermark, G. Kohla, C. Kannicht, R. Schauer and R. Horstkorte (2016). "Correction: Sialic Acid Metabolic Engineering: A Potential Strategy for the Neuroblastoma Therapy." PLoS One **11**(4): e0154289.
- Guan, F., X. Wang and F. He (2015). "Promotion of cell migration by neural cell adhesion molecule (NCAM) is enhanced by PSA in a polysialyltransferase-specific manner." PLoS One **10**(4): e0124237.
- Hammond, M. S., C. Sims, K. Parameshwaran, V. Suppiramaniam, M. Schachner and A. Dityatev (2006). "Neural cell adhesion molecule-associated polysialic acid inhibits NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors and prevents glutamate-induced cell death." J Biol Chem **281**(46): 34859-34869.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Harduin-Lepers, A., V. Vallejo-Ruiz, M. A. Krzewinski-Recchi, B. Samyn-Petit, S. Julien and P. Delannoy (2001). "The human sialyltransferase family." Biochimie **83**(8): 727-737.
- Hart, G. W., C. Slawson, G. Ramirez-Correa and O. Lagerlof (2011). "Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease." Annu Rev Biochem **80**: 825-858.
- Hellstrom, M., L. K. Phng, J. J. Hofmann, E. Wallgard, L. Coultas, P. Lindblom, J. Alva, A. K. Nilsson, L. Karlsson, N. Gaiano, K. Yoon, J. Rossant, M. L. Iruela-Arispe, M. Kalen, H. Gerhardt and C. Betsholtz (2007). "Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis." Nature **445**(7129): 776-780.
- Hildebrandt, H., M. Muhlenhoff and R. Gerardy-Schahn (2010). "Polysialylation of NCAM." Adv Exp Med Biol **663**: 95-109.
- Hinderlich, S., R. Stasche, R. Zeitler and W. Reutter (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." *J Biol Chem* **272**(39): 24313-24318.
- Hinsby, A. M., V. Berezin and E. Bock (2004). "Molecular mechanisms of NCAM function." *Front Biosci* **9**: 2227-2244.
- Horstkorte, R., M. Muhlenhoff, W. Reutter, S. Nohring, M. Zimmermann-Kordmann and R. Gerardy-Schahn (2004). "Selective inhibition of polysialyltransferase ST8Siall by unnatural sialic acids." *Exp Cell Res* **298**(1): 268-274.
- Hsieh, S. H., N. W. Ying, M. H. Wu, W. F. Chiang, C. L. Hsu, T. Y. Wong, Y. T. Jin, T. M. Hong and Y. L. Chen (2008). "Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells." *Oncogene* **27**(26): 3746-3753.
- Hubschmann, M. V., G. Skladchikova, E. Bock and V. Berezin (2005). "Neural cell adhesion molecule function is regulated by metalloproteinase-mediated ectodomain release." *J Neurosci Res* **80**(6): 826-837.
- Inoue, S. and Y. Inoue (2001). "A challenge to the ultrasensitive chemical method for the analysis of oligo- and polysialic acids at a nanogram level of colominic acid and a milligram level of brain tissues." *Biochimie* **83**(7): 605-613.
- Isner, J. M. and T. Asahara (1999). "Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization." *J Clin Invest* **103**(9): 1231-1236.
- Jaffe, E. A., R. L. Nachman, C. G. Becker and C. R. Minick (1973). "Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria." *J Clin Invest* **52**(11): 2745-2756.
- Ji, T., Y. Guo, K. Kim, P. McQueen, S. Ghaffar, A. Christ, C. Lin, R. Eskander, X. Zi and B. H. Hoang (2015). "Neuropilin-2 expression is inhibited by secreted Wnt antagonists and its down-regulation is associated with reduced tumor growth and metastasis in osteosarcoma." *Mol Cancer* **14**: 86.
- Jimenez, N., V. J. Krouwer and J. A. Post (2013). "A new, rapid and reproducible method to obtain high quality endothelium in vitro." *Cytotechnology* **65**(1): 1-14.
- Johnson, C. P., I. Fujimoto, U. Rutishauser and D. E. Leckband (2005). "Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion." *J Biol Chem* **280**(1): 137-145.
- Jonkman, J. E., J. A. Cathcart, F. Xu, M. E. Bartolini, J. E. Amon, K. M. Stevens and P. Colarusso (2014). "An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy." *Cell Adh Migr* **8**(5): 440-451.
- Kallolimath, S., A. Castilho, R. Strasser, C. Grunwald-Gruber, F. Altmann, S. Strubl, C. E. Galuska, K. Zlatina, S. P. Galuska, S. Werner, H. Thiesler, S. Werneburg, H. Hildebrandt, R. Gerardy-Schahn and H. Steinkellner (2016). "Engineering of complex protein sialylation in plants." *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**(34): 9498-9503.
- Kanato, Y., K. Kitajima and C. Sato (2008). "Direct binding of polysialic acid to a brain-derived neurotrophic factor depends on the degree of polymerization." *Glycobiology* **18**(12): 1044-1053.

- Kater, S. B. and V. Rehder (1995). "The sensory-motor role of growth cone filopodia." Curr Opin Neurobiol **5**(1): 68-74.
- Kean, E. L. (1991). "Sialic acid activation." Glycobiology **1**(5): 441-447.
- Kelm, S. and R. Schauer (1997). "Sialic acids in molecular and cellular interactions." Int Rev Cytol **175**: 137-240.
- Kielczynski, W., R. K. Bartholomeusz and L. C. Harrison (1994). "Characterization of ganglioside associated with the thyrotrophin receptor." Glycobiology **4**(6): 791-796.
- Kitazume, S., R. Imamaki, K. Ogawa, Y. Komi, S. Futakawa, S. Kojima, Y. Hashimoto, J. D. Marth, J. C. Paulson and N. Taniguchi (2010). "Alpha2,6-sialic acid on platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) regulates its homophilic interactions and downstream antiapoptotic signaling." J Biol Chem **285**(9): 6515-6521.
- Kitazume-Kawaguchi, S., S. Kabata and M. Arita (2001). "Differential biosynthesis of polysialic or disialic acid Structure by ST8Sia II and ST8Sia IV." J Biol Chem **276**(19): 15696-15703.
- Kornfeld, S., R. Kornfeld, E. F. Neufeld and P. J. O'Brien (1964). "The Feedback Control of Sugar Nucleotide Biosynthesis in Liver." Proc Natl Acad Sci U S A **52**: 371-379.
- Kramer, N., A. Walzl, C. Unger, M. Rosner, G. Krupitza, M. Hengstschlager and H. Dolznig (2013). "In vitro cell migration and invasion assays." Mutat Res **752**(1): 10-24.
- Lackie, P. M., C. Zuber and J. Roth (1990). "Polysialic acid and N-CAM localisation in embryonic rat kidney: mesenchymal and epithelial elements show different patterns of expression." Development **110**(3): 933-947.
- Lackie, P. M., C. Zuber and J. Roth (1991). "Expression of polysialylated N-CAM during rat heart development." Differentiation **47**(2): 85-98.
- Lackie, P. M., C. Zuber and J. Roth (1994). "Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is widely expressed during organogenesis in mesodermal and endodermal derivatives." Differentiation **57**(2): 119-131.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Landmesser, L., L. Dahm, J. C. Tang and U. Rutishauser (1990). "Polysialic acid as a regulator of intramuscular nerve branching during embryonic development." Neuron **4**(5): 655-667.
- Langmann, T. and S. Fauser (2017). "[Polysialic Acid for Immunomodulation in an Animal Model for Wet Age-Related Macular Degeneration (AMD)]." Klin Monbl Augenheilkd **234**(5): 657-661.
- Liang, C. C., A. Y. Park and J. L. Guan (2007). "In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro." Nat Protoc **2**(2): 329-333.
- Liedtke, S., H. Geyer, M. Wuhler, R. Geyer, G. Frank, R. Gerardy-Schahn, U. Zahringer and M. Schachner (2001). "Characterization of N-glycans from mouse brain neural cell adhesion molecule." Glycobiology **11**(5): 373-384.

- Lokmic, Z., I. A. Darby, E. W. Thompson and G. M. Mitchell (2006). "Time course analysis of hypoxia, granulation tissue and blood vessel growth, and remodeling in healing rat cutaneous incisional primary intention wounds." Wound Repair Regen **14**(3): 277-288.
- Mahal, L. K., N. W. Charter, K. Angata, M. Fukuda, D. E. Koshland, Jr. and C. R. Bertozzi (2001). "A small-molecule modulator of poly-alpha 2,8-sialic acid expression on cultured neurons and tumor cells." Science **294**(5541): 380-381.
- Martinez-Duncker, J. T. a. I. (2013). Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function. Sialic Acid Glycoconjugates in Health and Disease, Bentham Science Publishers.
- McEver, R. P., K. L. Moore and R. D. Cummings (1995). "Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions." J Biol Chem **270**(19): 11025-11028.
- Muhlenhoff, M., M. Eckhardt, A. Bethe, M. Frosch and R. Gerardy-Schahn (1996). "Autocatalytic polysialylation of polysialyltransferase-1." EMBO J **15**(24): 6943-6950.
- Muhlenhoff, M., M. Eckhardt and R. Gerardy-Schahn (1998). "Polysialic acid: three-dimensional structure, biosynthesis and function." Curr Opin Struct Biol **8**(5): 558-564.
- Muhlenhoff, M., I. Oltmann-Norden, B. Weinhold, H. Hildebrandt and R. Gerardy-Schahn (2009). "Brain development needs sugar: the role of polysialic acid in controlling NCAM functions." Biol Chem **390**(7): 567-574.
- Murohara, T., J. R. Horowitz, M. Silver, Y. Tsurumi, D. Chen, A. Sullivan and J. M. Isner (1998). "Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin." Circulation **97**(1): 99-107.
- Nachman, R. L. and E. A. Jaffe (2004). "Endothelial cell culture: beginnings of modern vascular biology." J Clin Invest **114**(8): 1037-1040.
- Nakata, D., L. Zhang and F. A. Troy, 2nd (2006). "Molecular basis for polysialylation: a novel polybasic polysialyltransferase domain (PSTD) of 32 amino acids unique to the alpha 2,8-polysialyltransferases is essential for polysialylation." Glycoconj J **23**(5-6): 423-436.
- Ohtsubo, K. and J. D. Marth (2006). "Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease." Cell **126**(5): 855-867.
- Olsen, M., L. Krog, K. Edvardsen, L. T. Skovgaard and E. Bock (1993). "Intact transmembrane isoforms of the neural cell adhesion molecule are released from the plasma membrane." Biochem J **295** (Pt 3): 833-840.
- Ono, S., M. Hane, K. Kitajima and C. Sato (2012). "Novel regulation of fibroblast growth factor 2 (FGF2)-mediated cell growth by polysialic acid." J Biol Chem **287**(6): 3710-3722.
- OpenStax. (2018). "Biology." OpenStax CNX, 2019, from https://cnx.org/contents/GFy_h8cu@11.6:QOGUelqL@9/Components-and-Structure.
- Oshima, K., S. M. Haeger, J. A. Hippensteel, P. S. Herson and E. P. Schmidt (2018). "More than a biomarker: the systemic consequences of heparan sulfate fragments released during endothelial surface layer degradation (2017 Grover Conference Series)." Pulm Circ **8**(1): 2045893217745786.

- Park, H., L. Pagan, O. Tan, A. Fadiel, N. Demir, K. Huang, K. Mittal and F. Naftolin (2010). "Estradiol regulates expression of polysialated neural cell adhesion molecule by human vascular endothelial cells." Reprod Sci **17**(12): 1090-1098.
- Park, H. J., Y. Zhang, S. P. Georgescu, K. L. Johnson, D. Kong and J. B. Galper (2006). "Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis." Stem Cell Rev **2**(2): 93-102.
- Patel, R. Y. and P. V. Balaji (2006). "Identification of linkage-specific sequence motifs in sialyltransferases." Glycobiology **16**(2): 108-116.
- Perkins, D. N., D. J. Pappin, D. M. Creasy and J. S. Cottrell (1999). "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data." Electrophoresis **20**(18): 3551-3567.
- Petrovic, N., W. Schacke, J. R. Gahagan, C. A. O'Connor, B. Winnicka, R. E. Conway, P. Mina-Osorio and L. H. Shapiro (2007). "CD13/APN regulates endothelial invasion and filopodia formation." Blood **110**(1): 142-150.
- Piagnerelli, M., K. Z. Boudjeltia, V. Nuyens, D. De Backer, F. Su, Z. Wang, J. L. Vincent and M. Vanhaeverbeek (2005). "Rapid alterations in transferrin sialylation during sepsis." Shock **24**(1): 48-52.
- Pinedo, H. M., H. M. Verheul, R. J. D'Amato and J. Folkman (1998). "Involvement of platelets in tumour angiogenesis?" Lancet **352**(9142): 1775-1777.
- Provis, J. M., J. Leech, C. M. Diaz, P. L. Penfold, J. Stone and E. Keshet (1997). "Development of the human retinal vasculature: cellular relations and VEGF expression." Exp Eye Res **65**(4): 555-568.
- Rabinovitch, M. (1999). "Pulmonary hypertension: pathophysiology as a basis for clinical decision making." J Heart Lung Transplant **18**(11): 1041-1053.
- Riboni, L., S. Sonnino, D. Acquotti, A. Malesci, R. Ghidoni, H. Egge, S. Mingrino and G. Tettamanti (1986). "Natural occurrence of ganglioside lactones. Isolation and characterization of GD1b inner ester from adult human brain." J Biol Chem **261**(18): 8514-8519.
- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature **386**(6626): 671-674.
- Risau, W. and I. Flamme (1995). "Vasculogenesis." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 73-91.
- Roca, C. and R. H. Adams (2007). "Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling." Genes Dev **21**(20): 2511-2524.
- Rosen, L. (2000). "Antiangiogenic strategies and agents in clinical trials." Oncologist **5 Suppl 1**: 20-27.
- Ruhrberg, C. (2003). "Growing and shaping the vascular tree: multiple roles for VEGF." Bioessays **25**(11): 1052-1060.
- Ruhrberg, C., H. Gerhardt, M. Golding, R. Watson, S. Ioannidou, H. Fujisawa, C. Betsholtz and D. T. Shima (2002). "Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis." Genes Dev **16**(20): 2684-2698.

Rutishauser, U. (1998). "Polysialic acid at the cell surface: biophysics in service of cell interactions and tissue plasticity." J Cell Biochem **70**(3): 304-312.

Rutishauser, U. (2008). "Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system." Nat Rev Neurosci **9**(1): 26-35.

Rutishauser, U., A. Acheson, A. K. Hall, D. M. Mann and J. Sunshine (1988). "The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions." Science **240**(4848): 53-57.

Saffarzadeh, M., C. Juenemann, M. A. Queisser, G. Lochnit, G. Barreto, S. P. Galuska, J. Lohmeyer and K. T. Preissner (2012). "Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones." PLoS One **7**(2): e32366.

Sainson, R. C., D. A. Johnston, H. C. Chu, M. T. Holderfield, M. N. Nakatsu, S. P. Crampton, J. Davis, E. Conn and C. C. Hughes (2008). "TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype." Blood **111**(10): 4997-5007.

Sato, C. (2004). "Chain length diversity of sialic acids and its biological significance." Trends in Glycoscience and Glycotechnology **16** (**91**): 331-344.

Sato, C., H. Fukuoka, K. Ohta, T. Matsuda, R. Koshino, K. Kobayashi, F. A. Troy, 2nd and K. Kitajima (2000). "Frequent occurrence of pre-existing alpha 2-->8-linked disialic and oligosialic acids with chain lengths up to 7 Sia residues in mammalian brain glycoproteins. Prevalence revealed by highly sensitive chemical methods and anti-di-, oligo-, and poly-Sia antibodies specific for defined chain lengths." J Biol Chem **275**(20): 15422-15431.

Sato, C. and K. Kitajima (2013). "Disialic, oligosialic and polysialic acids: distribution, functions and related disease." J Biochem **154**(2): 115-136.

Sato, C. and K. Kitajima (2013). "Impact of structural aberrancy of polysialic acid and its synthetic enzyme ST8SIA2 in schizophrenia." Front Cell Neurosci **7**: 61.

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

Schauer, R. (2009). "Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions." Curr Opin Struct Biol **19**(5): 507-514.

Schnaar, R. L., R. Gerardy-Schahn and H. Hildebrandt (2014). "Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration." Physiol Rev **94**(2): 461-518.

Schwarzer, D., K. Stummeyer, T. Haselhorst, F. Freiburger, B. Rode, M. Grove, T. Scheper, M. von Itzstein, M. Muhlenhoff and R. Gerardy-Schahn (2009). "Proteolytic release of the intramolecular chaperone domain confers processivity to endosialidase F." J Biol Chem **284**(14): 9465-9474.

Secher, T. (2010). "Soluble NCAM." Adv Exp Med Biol **663**: 227-242.

Shweiki, D., A. Itin, D. Soffer and E. Keshet (1992). "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis." Nature **359**(6398): 843-845.

- Sillanauke, P., M. Ponnio and I. P. Jaaskelainen (1999). "Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders." Eur J Clin Invest **29**(5): 413-425.
- Simon, P., S. Baumner, O. Busch, R. Rohrich, M. Kaese, P. Richterich, A. Wehrend, K. Muller, R. Gerardy-Schahn, M. Muhlenhoff, H. Geyer, R. Geyer, R. Middendorff and S. P. Galuska (2013). "Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase ST8Siall." J Biol Chem **288**(26): 18825-18833.
- Soker, S., S. Takashima, H. Q. Miao, G. Neufeld and M. Klagsbrun (1998). "Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor." Cell **92**(6): 735-745.
- Sorensen, A. L., V. Rumjantseva, S. Nayeb-Hashemi, H. Clausen, J. H. Hartwig, H. H. Wandall and K. M. Hoffmeister (2009). "Role of sialic acid for platelet life span: exposure of beta-galactose results in the rapid clearance of platelets from the circulation by asialoglycoprotein receptor-expressing liver macrophages and hepatocytes." Blood **114**(8): 1645-1654.
- Stanley, P., H. Schachter and N. Taniguchi (2009). N-Glycans. Essentials of Glycobiology. nd, A. Varki, R. D. Cummings et al. Cold Spring Harbor (NY).
- Stone, J., A. Itin, T. Alon, J. Pe'er, H. Gnessin, T. Chan-Ling and E. Keshet (1995). "Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia." J Neurosci **15**(7 Pt 1): 4738-4747.
- Streit, M., L. Riccardi, P. Velasco, L. F. Brown, T. Hawighorst, P. Bornstein and M. Detmar (1999). "Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 14888-14893.
- Strilic, B., J. Eglinger, M. Krieg, M. Zeeb, J. Axnick, P. Babal, D. J. Muller and E. Lammert (2010). "Electrostatic cell-surface repulsion initiates lumen formation in developing blood vessels." Curr Biol **20**(22): 2003-2009.
- Stringer, S. E. (2006). "The role of heparan sulphate proteoglycans in angiogenesis." Biochem Soc Trans **34**(Pt 3): 451-453.
- Strubl, S., U. Schubert, A. Kuhnle, A. Rebl, N. Ahmadvand, S. Fischer, K. T. Preissner and S. P. Galuska (2018). "Polysialic acid is released by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in vitro." Cell Biosci **8**: 64.
- Stummeyer, K., A. Dickmanns, M. Muhlenhoff, R. Gerardy-Schahn and R. Ficner (2005). "Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F." Nat Struct Mol Biol **12**(1): 90-96.
- Suchting, S., C. Freitas, F. le Noble, R. Bedito, C. Breant, A. Duarte and A. Eichmann (2007). "The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3225-3230.
- Tan, A. W., L. L. Liao, K. H. Chua, R. Ahmad, S. A. Akbar and B. Pingguan-Murphy (2016). "Enhanced in vitro angiogenic behaviour of human umbilical vein endothelial cells on thermally oxidized TiO₂ nanofibrous surfaces." Sci Rep **6**: 21828.
- Tanner, M. E. (2005). "The enzymes of sialic acid biosynthesis." Bioorg Chem **33**(3): 216-228.

- Tzima, E., M. Irani-Tehrani, W. B. Kiosses, E. Dejana, D. A. Schultz, B. Engelhardt, G. Cao, H. DeLisser and M. A. Schwartz (2005). "A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress." *Nature* **437**(7057): 426-431.
- Ulm, C., M. Saffarzadeh, P. Mahavadi, S. Muller, G. Prem, F. Saboor, P. Simon, R. Middendorff, H. Geyer, I. Henneke, N. Bayer, S. Rinne, T. Lutteke, E. Bottcher-Friebertshauser, R. Gerardy-Schahn, D. Schwarzer, M. Muhlenhoff, K. T. Preissner, A. Gunther, R. Geyer and S. P. Galuska (2013). "Soluble polysialylated NCAM: a novel player of the innate immune system in the lung." *Cell Mol Life Sci* **70**(19): 3695-3708.
- Vaithianathan, T., K. Matthias, B. Bahr, M. Schachner, V. Suppiramaniam, A. Dityatev and C. Steinhauser (2004). "Neural cell adhesion molecule-associated polysialic acid potentiates alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor currents." *J Biol Chem* **279**(46): 47975-47984.
- Varki, A. and S. Kornfeld (2015). Historical Background and Overview. *Essentials of Glycobiology*. ed. A. Varki, R. D. Cummings et al. Cold Spring Harbor (NY): 1-18.
- von Der Ohe, M., S. F. Wheeler, M. Wuhrer, D. J. Harvey, S. Liedtke, M. Muhlenhoff, R. Gerardy-Schahn, H. Geyer, R. A. Dwek, R. Geyer, D. R. Wing and M. Schachner (2002). "Localization and characterization of polysialic acid-containing N-linked glycans from bovine NCAM." *Glycobiology* **12**(1): 47-63.
- Weinhold, B., R. Seidenfaden, I. Rockle, M. Muhlenhoff, F. Schertzinger, S. Conzelmann, J. D. Marth, R. Gerardy-Schahn and H. Hildebrandt (2005). "Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule." *J Biol Chem* **280**(52): 42971-42977.
- Werneburg, S., F. F. Buettner, L. Erben, M. Mathews, H. Neumann, M. Muhlenhoff and H. Hildebrandt (2016). "Polysialylation and lipopolysaccharide-induced shedding of E-selectin ligand-1 and neuropilin-2 by microglia and THP-1 macrophages." *Glia* **64**(8): 1314-1330.
- West, D. C., C. G. Rees, L. Duchesne, S. J. Patey, C. J. Terry, J. E. Turnbull, M. Delehedde, C. W. Heegaard, F. Allain, C. Vanpouille, D. Ron and D. G. Fernig (2005). "Interactions of multiple heparin binding growth factors with neuropilin-1 and potentiation of the activity of fibroblast growth factor-2." *J Biol Chem* **280**(14): 13457-13464.
- Willhauck-Fleckenstein, M., T. M. Moehler, A. Merling, S. Pusunc, H. Goldschmidt and R. Schwartz-Albiez (2010). "Transcriptional regulation of the vascular endothelial glycome by angiogenic and inflammatory signalling." *Angiogenesis* **13**(1): 25-42.
- Wu, M. H., N. W. Ying, T. M. Hong, W. F. Chiang, Y. T. Lin and Y. L. Chen (2014). "Galectin-1 induces vascular permeability through the neuropilin-1/vascular endothelial growth factor receptor-1 complex." *Angiogenesis* **17**(4): 839-849.
- Wuhrer, M., H. Geyer, M. von der Ohe, R. Gerardy-Schahn, M. Schachner and R. Geyer (2003). "Localization of defined carbohydrate epitopes in bovine polysialylated NCAM." *Biochimie* **85**(1-2): 207-218.
- Xu, D., M. M. Fuster, R. Lawrence and J. D. Esko (2011). "Heparan sulfate regulates VEGF165- and VEGF121-mediated vascular hyperpermeability." *J Biol Chem* **286**(1): 737-745.

Yabe, U., C. Sato, T. Matsuda and K. Kitajima (2003). "Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein." J Biol Chem **278**(16): 13875-13880.

Yla-Herttuala, S., T. T. Rissanen, I. Vajanto and J. Hartikainen (2007). "Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine." J Am Coll Cardiol **49**(10): 1015-1026.

Zuber, C., P. M. Lackie, W. A. Catterall and J. Roth (1992). "Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain." J Biol Chem **267**(14): 9965-9971.

10 Publikationen und Kongressbeiträge

9.1 Publikationen

Sebastian Strubl, Uwe Schubert, Andrea Kühnle, Alexander Rebl, Negah Ahmadvand, Silvia Fischer, Klaus T. Preissner, Sebastian P. Galuska

„Polysialic acid is released by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in vitro“

Cell Bioscience, 2018 Dez. 11, Vol. 8:64. doi: 10.1186/s13578-018-0262-y.

Somanath Kallolimath, Alexandra Castilho, Richard Strasser, Clemens Grünwald-Gruber, Friedrich Altmann, **Sebastian Strubl**, Christina Elisabeth Galuska, Kristina Zlatina, Sebastian Peter Galuska, Stefan Werner, Hauke Thiesler, Sebastian Werneburg, Herbert Hildebrandt, Rita Gerardy-Schahn, Herta Steinkellner

„Engineering of complex protein sialylation in plants“

PNAS, 2016 Aug. 23, Vol.113 (34): 9498-9530. doi: 10.1073/pnas.1604371113.

9.2 Kongressbeiträge

Vortrag und Posterpräsentation am Kongress „24th Joint Glycobiology 2013“, Halle, Deutschland

Sebastian Strubl, Uwe Schubert, Nils B. Bayer, Rita Gerardy-Schahn, Martina Mühlenhoff Klaus T. Preissner, Sebastian P. Galuska

„Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) express polysialylated proteins“

11 Eidesstattliche 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

Sebastian Strubl

12 Danksagung

Schließlich möchte ich allen Menschen danken, die mich auf dem Weg zu dieser Promotionsarbeit begleitet haben.

Allen voran gebührt mein größter Dank und voller Respekt meinem Doktorvater PD Dr. Sebastian Galuska, der mir die Promotion in seiner Arbeitsgruppe überhaupt ermöglichte und noch dazu mir eine Forschungsthematik bot, die mein Interesse und Ehrgeiz für Wissenschaft und Forschung entfachte.

Zu jeder Zeit fühlte ich mich von Dir bestens betreut. Du hattest immer Zeit und einen Ratschlag egal wie klein das Problem auch war. Du sorgtest stets für einen klaren roten Faden und trotzdem konnte man immer selbstständig und frei denken, probieren und forschen. Deshalb wird dieser Lebensabschnitt für mich in absolut positiver Erinnerung verbleiben.

Ein großer Anteil gebührt dir, dass die Forschung auch in den nächsten Jahren einen großen Teil meines beruflichen Lebens einnehmen wird.

Ausserdem möchte ich allen Kollegen im biochemischen Institut der JLU Gießen danken, die mich während der Zeit begleitet haben. Allen voran möchte ich hier Uwe Schubert nennen, der mich in alle Methoden rund um die Zellkultur und die „Geheimnisse“ der HUVEC-Kultivierung unterrichtet und auf dem gesamten Weg unterstützt und begleitet hat. Dank dir hatte ich immer Zugang zu den Zellkulturbänken im Labor von Herrn Prof. Preissner und konnte diese dort etliche Stunden in Beschlag nehmen. Dein Einsatz war eine unabdingbare Grundlage dieser Arbeit.

Ich danke auch Miriam Käse für die geduldige Einarbeitung in unserem Labor, sowie für die große Unterstützung beim Einstieg in die biochemischen Methoden. Danke auch an die damals erfahrenen Doktoranden Peter Simon, Nils Bayer Christina Ulm und Linda Prem sowie die Ehefrau meines Doktorvaters Dr. Christina Galuska, die sich ebenfalls stets geduldig mit uns zeigten und ein offenes Ohr bei jeglichen Fragen hatten.

Weiterhin möchte ich Werner, Siggie und Peter aus unserer Forschungsgruppe danken. Ihre langjährige Laborerfahrung, vor allem mit ihrem extrem wertvollen chemischen, sowie technischen Know-How hielt die, durch uns Doktoranden wuselige, Arbeitsgruppe stets am funktionieren.

Ich danke allen weiteren Kollegen, die insbesondere an der Umsetzung der hiermit verbunden Publikation beteiligt waren. In Namen sind das Andrea Kühnle, Negah Ahmadvand, Alexander Rebl und Silvia Fischer. Ich danke euch für den gemeinsamen Einsatz an diesem tollen Projekt.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Mitstreitern und sehr engen Freunden Rhea, Max und David danken mit welchen ich zusammen das Abenteuer begonnen hatte. Vielen Dank für eure Hilfe, für euren Einsatz, für die vielen witzigen Stunden im Labor bei herrlichstem Radio-Bob-Oldschool-Rock! Ihr ward das Rückgrat, um die regelmäßigen Rückschläge im Laboralltag letztlich ertragen zu können.

Schließlich möchte ich meiner Familie danken. Ohne meine Eltern wäre ich niemals soweit gekommen. Durch euch habe ich die Inspiration zur Wissenschaft, genauso wie den nötigen Ehrgeiz und das Durchhaltevermögen mit auf den Weg bekommen, um letzten Endes den langwirigen Weg der Forschung und Promotion zu bestehen. Vielen Dank an euch beide, dass ihr immer hinter mir steht, und mich bei allem, was ich mir in den Kopf setze unterstützt. Zuletzt möchte ich meiner Freundin Sophia danken, die mich besonders auf der Zielgeraden, vom leeren Blatt bis zur Einreichung, jeder Zeit unterstützt hat und stoisch auch bei den kleinsten Formatierungs-Krisen meine Launen ertrug. Ich freue mich auf die kommende ereignissreiche Zeit mit Dir!

Ihr alle zusammen habt diese Promotion möglich gemacht und zugleich mich in einer wunderbaren Lebensphase begleitet und geprägt. Dafür bin ich sehr stolz und dankbar!