



JUSTUS-LIEBIG-  
 UNIVERSITÄT  
GIESSEN



**Christina Ulm**

Identifizierung und Charakterisierung der  
biologischen Funktion von PolySia-NCAM  
in humanem Lungengewebe

INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. biol. hom.**  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

# **Identifizierung und Charakterisierung der biologischen Funktion von PolySia-NCAM in humanem Lungengewebe**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Dr. biol. hom.  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Christina Ulm**  
aus Gießen

Gießen 2012

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

Leiter: Prof. Dr. Klaus T. Preissner

Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Geyer

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Meinhardt

Tag der Disputation: 03.12.2012

„Wichtig ist, dass man nicht aufhört zu fragen.“

Albert Einstein, 1955



## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Polysialinsäure (PolySia).....	1
1.1.1	Struktureller Aufbau .....	1
1.1.2	Biosynthese.....	2
1.1.3	Biologische Funktion.....	6
1.2	Neurales Zelladhäsionsmolekül – NCAM .....	7
1.2.1	Struktureller Aufbau .....	7
1.2.2	Biologische Funktionen.....	9
1.3	PolySia-NCAM.....	11
1.3.1	Posttranslationale Modifikationen von NCAM.....	11
1.3.2	Biologische Funktionen.....	12
1.4	Lunge .....	14
1.4.1	Entwicklung und struktureller Aufbau.....	14
1.4.2	Immunologie.....	15
1.4.3	Pathologische Veränderungen .....	19
1.4.4	Bleomycin-Mausmodell.....	23
2	Zielsetzung .....	24
3	Material und Methoden.....	25
3.1	Probenmaterial .....	25
3.2	Biologische Materialien.....	26
3.2.1	Zelllinien.....	26
3.2.2	Antikörper.....	26
3.2.3	Enzyme.....	27
3.3	Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Zellkulturzusätze .....	27
3.3.1	Verbrauchsmaterialien .....	27
3.3.2	Chemikalien .....	28
3.3.3	Nährmedien und Zellkulturzusätze .....	28
3.4	Zellbiologische Methoden.....	28
3.4.1	Kultivierung von A549 Lungenepithelzellen.....	29
3.4.2	Zellzählung mittels Neubauer-Kammer und Trypanblaufärbung.....	31
3.4.3	Inkubation von A549 Zellen mit verschiedenen Wirksubstanzen .....	32
3.4.4	Zytotoxizitätsmessung.....	34
3.5	Histologische Methoden .....	36

3.5.1	Färbemethoden.....	36
3.5.2	Permanentes Eindecken von histologischen Schnitten .....	39
3.5.3	Zellfixierung und Immunfluoreszenzfärbung .....	40
3.6	Proteinanalytische Methoden .....	42
3.6.1	Gewebeaufarbeitung.....	42
3.6.2	Proteinbestimmung.....	42
3.6.3	Affinitätsaufreinigung.....	43
3.6.4	Enzymverdau .....	45
3.6.5	SDS-Gelelektrophorese .....	46
3.6.6	Western Blot.....	47
3.6.7	Immunfärbung und Entwicklung von Blots .....	48
3.6.8	Peptidmassenfingerabdruck.....	49
3.7	HPLC .....	50
4	Ergebnisse .....	52
4.1	Polysialylierung in humanem Lungengewebe .....	52
4.1.1	PolySia-Nachweis in Gewebehomogenaten.....	52
4.1.2	Identifizierung des PolySia Trägers .....	54
4.1.3	Lokalisation von PolySia-NCAM im humanen Bronchialepithel.....	58
4.2	Polysialylierung im Zellkulturmodell .....	60
4.2.1	Charakterisierung des PolySia-Status unbehandelter A549-Zellen.....	60
4.2.2	Charakterisierung des Polysialylierungsstatus in A549-Zellen nach Stimulation .....	64
4.3	Polysialylierung in pathologisch-verändertem Lungengewebe.....	69
4.3.1	PolySia-Nachweis in Lungengewebe von COPD-Patienten .....	69
4.3.2	PolySia-Nachweis in Lungengewebe von Bleomycin-behandelten Mäusen .....	71
4.3.3	PolySia-Nachweis in Lungengewebe von IPF-Patienten .....	73
4.4	Untersuchung zur biologischen Funktion von PolySia-NCAM-110.....	75
4.4.1	Interaktion von löslichem PolySia-NCAM-110 mit extrazellulären Histonen .....	76
4.4.2	Interaktion von löslichem PolySia-NCAM-110 mit NET.....	81
4.4.3	Untersuchung zum Mechanismus der Freisetzung von löslichem PolySia-NCAM-110 .....	82
5	Diskussion .....	84
5.1	Expression von PolySia-NCAM in der adulten Lunge .....	84
5.2	Sekretion von löslichem PolySia-NCAM-110 nach Stimulation .....	86
5.3	Detektion von PolySia-NCAM in entzündlichem Lungengewebe .....	88

5.4	PolySia-NCAM 110 als Gegenspieler der Histon- bzw. NET-induzierten Zytotoxizität .....	91
5.5	Mögliche Rolle von PolySia-NCAM-110 im Entzündungsgeschehen .....	93
6	Zusammenfassung .....	96
7	Summary .....	97
8	Abkürzungsverzeichnis.....	98
9	Abbildungsverzeichnis.....	101
10	Literaturverzeichnis.....	103
11	Kongressbeiträge .....	115
12	Ehrenwörtliche Erklärung .....	117
13	Danksagung.....	118



## 1 Einleitung

Nach unserem heutigen Wissenstand spielen zelluläre Interaktionen eine entscheidende Rolle in einer Fülle verschiedener biologischer, physiologischer und pathologischer Vorgänge, wobei mit der Zellmigration, Proliferation, Embryogenese, Differenzierung, Apoptose und immunmodulatorischen Abläufen nur einige zu nennen sind. Diese spontan stattfindenden und fein regulierten Prozesse basieren unter anderem auf einer funktionierenden Protein-Protein-Wechselwirkung, die je nach Bedarf erfolgt oder durch Regulationsmechanismen inhibiert werden kann. Hierbei wird jedoch nicht ausschließlich der mechanische Zusammenhalt zwischen zwei Zellen gewährleistet bzw. verhindert, sondern auch Signaltransduktionsprozesse ins Zellinnere überwacht, die je nach Anwesenheit eines passenden Liganden, teilweise unter Zuhilfenahme eines Co-Rezeptors, eine Apoptose herbeiführen, die Zellen dazu veranlassen sich zu teilen oder sonstige transkriptionelle Vorgänge beeinflussen können. Diese Mechanismen unterliegen einer hochfeinen Regulation, die sich über 400 Millionen Jahre Evolution etabliert hat.

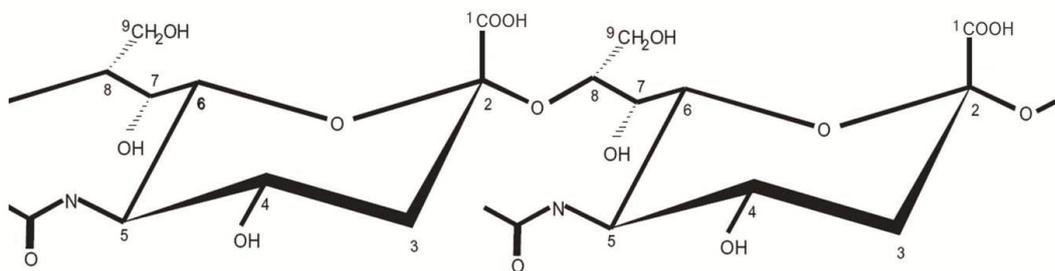
Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einer posttranslationalen Protein-Modifikation, sowie die Auswirkung derer auf verschiedene immunmodulatorische Vorgänge in humanem Lungengewebe.

### 1.1 Polysialinsäure (PolySia)

#### 1.1.1 Struktureller Aufbau

Bei der Polysialinsäure (PolySia) handelt es sich um ein Homopolymer aus verknüpften *N*-Acetylneuraminsäuren (Neu5Ac), welches mehr als 50 Sialinsäurereste enthalten kann [Finne 1982; Galuska *et al.* 2006]. Sialinsäuren sind  $\alpha$ -Ketosäuren und besitzen ein C9-Grundgerüst mit einer Carboxylgruppe in C1-Position und einer Ketogruppe in benachbarter C2-Position (Abbildung 1) [Angata und Varki 2002; Schauer 2004]. Mehr als 50 natürlich vorkommende

Neuraminsäure-Derivate konnten bislang identifiziert werden [Kelm und Schauer 1997; Angata und Varki 2002], wobei nur wenige davon als Baustein für die Polysialinsäure dienen. Neben der hier gezeigten *N*-Acetylneuraminsäure (Abbildung 1) gehören die *N*-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc) und die Deaminoneuraminsäure (KDN) zu den am häufigsten exprimierten Strukturvarianten [Mühlenhoff *et al.* 1998]. PolySia taucht terminal als posttranslationale Modifikation komplexer N-Glykane auf und wird vor allem auf seinem Hauptakzeptormolekül, dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül NCAM (1.2), detektiert.



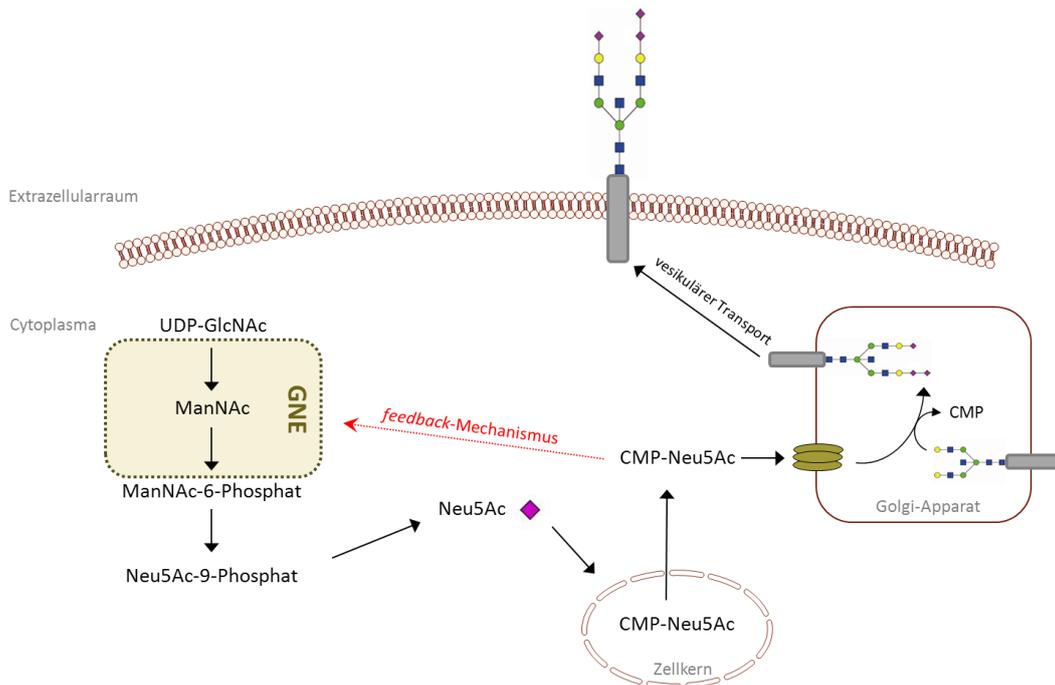
**Abbildung 1** Strukturbeispiel  $\alpha$ 2,8-verknüpfter *N*-Acetylneuraminsäure-Einheiten

## 1.1.2 Biosynthese

### 1.1.2.1 Sialinsäuren

Die Biosynthese von *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) benötigt als Ausgangssubstanz UDP-*N*-Acetyl-D-Glucosamin (UDP-GlcNAc), welches über den Kohlenhydratstoffwechsel der Zelle zur Verfügung gestellt wird. Es kommt anschließend zur Epimerisierung von UDP-GlcNAc zu *N*-Acetyl-D-Mannosamin (ManNAc), welches anschließend in 6-Position phosphoryliert wird [Corfield *et al.* 1982]. Diese Schritte werden von dem Enzym UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (GNE) katalysiert [Hinderlich *et al.* 1997]. ManNAc-6-Phosphat wird unter gleichzeitigem Verbrauch von Phosphoenolpyruvat durch die Neu5Ac-9-Phosphat-Synthase in Neu5Ac-9-Phosphat umgewandelt, und durch Abspaltung der Phosphatgruppe entsteht Neu5Ac. Die Aktivierung aller anderen Monosaccharide findet im Cytosol statt, die Aktivierung der Neu5Ac durch die CMP-Neu5Ac-Synthetase hingegen im Kern [Kean 1991]. Aktiviertes

CMP-Neu5Ac wird dann über den CMP-Neu5Ac-Golgi-Transporter in den Golgi-Apparat transportiert und dort mit Hilfe von Sialyltransferasen auf naszierende Glykokonjugate übertragen [Harduin-Lepers *et al.* 2001]. Die Aktivität der GNE und damit die Aktivität der gesamten Sialinsäurebiosynthese wird durch das Endprodukt CMP-Neu5Ac in einem sogenannten „feedback“-Mechanismus reguliert [Kornfeld *et al.* 1964].



**Abbildung 2** Sialinsäure-Biosynthese

Schematisches Diagramm der Sialinsäure-Biosynthese angefangen von UDP-N-Acetyl-D-Glucosamin (UDP-GlcNAc), welches im Zuge des zellulären Kohlenhydratstoffwechsels zur Verfügung gestellt wird, via der Aktivierung im Zellkern hin zum Transport in den Golgi-Apparat, wo der Transfer auf Glykokonjugate stattfindet. Der Weg endet mit dem vesikulären Transport von sialylierten Glykokonjugaten zur Plasma Membran.

ManNAc, N-Acetyl-D-Mannosamin; GNE, UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase; Neu5Ac, N-Acetylneuraminsäure. Blaues Quadrat, N-Acetylglucosamin; grüner Kreis, Mannose; gelber Kreis, Galactose; violette Raute, N-Acetylneuraminsäure. Glykanstruktur erstellt mit Hilfe [Ceroni *et al.* 2008].

### 1.1.2.2 PolySia

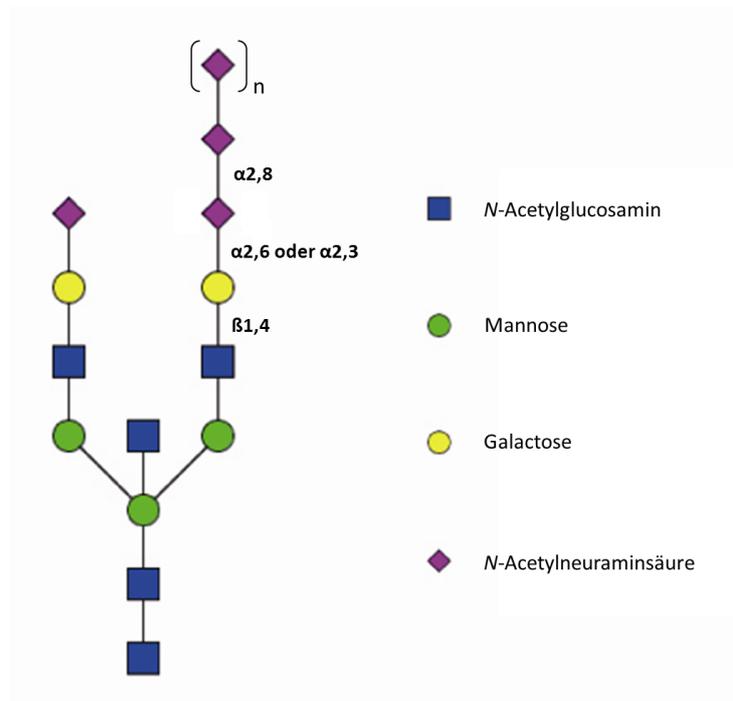
Die Biosynthese von PolySia wird durch zwei Polysialyltransferasen, die durch eine hohe Homologie zueinander charakterisiert sind, katalysiert, ST8SialII und ST8SialIV. Diese gehören zur Sialyltransferasen-Familie der Vertebraten und sind

im Golgi-Apparat der Zelle lokalisiert [Harduin-Lepers *et al.* 2001; Angata und Varki 2002]. Beide Enzyme sind für die Biosynthese von Polysialinsäuren verantwortlich. Neben den  $\alpha$ 2,8-Sialyltransferasen, zu denen ST8SialII und ST8SialIV gehören, gibt es noch verschiedene  $\alpha$ 2,3-Sialyltransferasen und  $\alpha$ 2,6-Sialyltransferasen. Die  $\alpha$ 2,8-Sialyltransferasen benötigen einen terminalen Sialinsäure-Rest als Akzeptormolekül für die aktivierte Sialinsäure, bei den anderen beiden Unterfamilien dienen Galactose, *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylgalactosamin als Akzeptormoleküle.

Bei allen Sialyltransferasen der Vertebraten handelt es sich um Golgi-assoziierte Typ II-Transmembranproteine. Sie setzen sich aus einer kurzen cytoplasmatischen und einer langen, in das Lumen reichenden Domäne zusammen. Diese wiederum besteht aus einer Stammregion und der katalytischen Domäne, die drei Bereiche umfasst: Sialylmotiv L (*long*), S (*small*), VS (*very small*) [Datta und Paulson 1995; Datta *et al.* 1998]. Die Motive L und S sind für das Binden der aktivierten Sialinsäure verantwortlich. Weiterhin besitzen alle Sialyltransferasen eine Transmembrandomäne und sind an mehreren Stellen N-glykosyliert [Mühlenhoff *et al.* 2001].

Eine Besonderheit der beiden Polysialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV ist die Anwesenheit einer sogenannten Polysialyltransferasendomäne (PSTD) [Nakata *et al.* 2006]. Diese Region ist reich an basischen Aminosäuren, die eine Interaktion mit der PolySia-Kette erst ermöglichen. So sind die beiden Enzyme zwar typische Mitglieder der Sialyltransferasen-Familie, jedoch einzigartig in ihrer Fähigkeit, PolySia zu synthetisieren. Alle anderen  $\alpha$ 2,8-Sialyltransferasen können Glykokonjugate lediglich di- (ST8SialI, ST8SialV und ST8SialVI) bzw. oligosialylieren (ST8SialIII und ST8SialIV) [Angata *et al.* 2000; Sato *et al.* 2000]. Die strukturelle Voraussetzung der Polysialylierung durch eine der beiden Polysialyltransferasen sind, wie bereits oben angesprochen, terminale Sialinsäuren, die in einer  $\alpha$ 2,3- oder einer  $\alpha$ 2,6-glykosidischen Bindung mit einer Galaktose verbunden sind. Diese subterminale Galaktose liegt häufig  $\beta$ 1,4-verknüpft an einem *N*-Acetylglucosamin der zentralen Pentasaccharid-Struktur  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  eines di-, tri- oder tetraantennären N-Glykans vor (Abbildung 3) [Liedtke *et al.* 2001;

von Der Ohe *et al.* 2002; Wuhrer *et al.* 2003; Hildebrandt *et al.* 2008]. Die weitere Verknüpfung der Neu5Ac-Untereinheiten erfolgt in  $\alpha$ 2,8-glykosidischer Bindung. Dabei kann die entstehende PolySia-Kette aus über 60 Untereinheiten bestehen [Galuska *et al.* 2008].



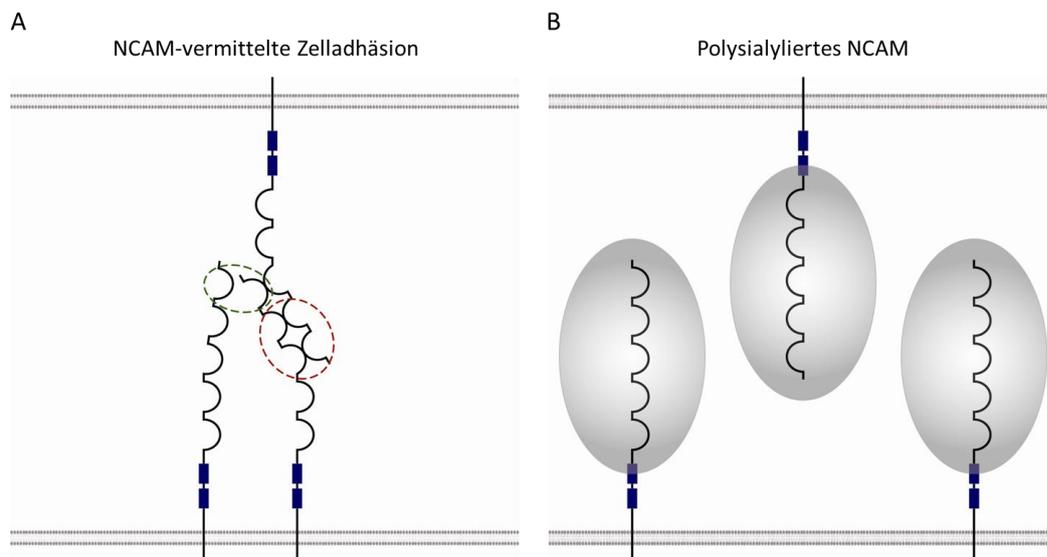
**Abbildung 3** Schematische Darstellung eines polysialylierten N-Glykans

Die Abbildung zeigt ein diantennäres N-Glykan vom komplexen Typ mit einer naszierenden PolySia-Kette. Die Glykanstruktur wurde mit Hilfe des Softwareprogrammes „Glykeworkbench“ erstellt [Ceroni *et al.* 2008].

Die beiden Polysialyltransferasen besitzen neben ihren katalytischen Fähigkeiten gegenüber anderen Glykoproteinen auch die Befähigung zur Autopolysialylierung. Dabei übertragen die Transferasen PolySia auf die im Enzym selbst vorliegenden N-Glykane [Mühlenhoff *et al.* 1996]. Bei durchgeführten *In-vitro*-Studien mit löslichen Formen der Transferasen zeigte sich, dass die Polymerisationseffizienz von ST8SialII geringer war (40 Sialinsäurereste), als die von ST8SialIV (60 Sialinsäurereste) [Kitazume-Kawaguchi *et al.* 2001; Angata *et al.* 2002], die beiden Transferasen unabhängig voneinander, je nach Entwicklungszustand und Bedarf, exprimiert werden können und eine bestmögliche Polysialylierung nur erreicht werden kann, wenn beide Transferasen synergistisch zusammenarbeiten [Angata und Fukuda 2003].

### 1.1.3 Biologische Funktion

Polysialinsäure besitzt aufgrund ihrer großen Anzahl an deprotoniert vorliegenden Carboxylgruppen der einzelnen Neuraminsäure-Untereinheiten eine hohe negative Ladung, was das PolySia-Molekül aufgrund der resultierenden Hydrathülle als eine voluminöse, hydrodynamische Modifikation eines Proteins erscheinen lässt. Die negative Gesamtladung des Moleküls führt zu einer elektrostatischen Abstoßung polysialylierter Proteine, die PolySia eine Funktion als Negativregulator der Zelladhäsion einbrachte und somit Zell/Zell-Interaktionen entgegenwirken kann [Rutishauser *et al.* 1988; Fujimoto *et al.* 2001] (Abbildung 4).



**Abbildung 4** Einfluss von PolySia auf Zelladhäsionsvorgänge

(A) Dargestellt sind NCAM/NCAM-Interaktionen, die sowohl in *cis* (grüner Kreis), als auch in *trans* (roter Kreis) erfolgen können. (B) Durch seine negative Gesamtladung und seine hydrodynamisch, voluminöse Struktur verhindert PolySia die NCAM-vermittelte Zelladhäsion. Modifiziert nach [Gascon *et al.* 2007].

Neben dem Einfluss auf die Funktion von NCAM ist PolySia auch an weiteren zellulären Vorgängen beteiligt: So interagiert das Molekül beispielsweise mit Glutamatrezeptoren. Die Wirkung von Glutamat wird dadurch bei dem NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor Subtyp abgeschwächt und im Gegensatz dazu am AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)-Subtyp verstärkt [Vaithianathan *et al.* 2004; Hammond *et al.* 2006]. Des Weiteren wird

durch die Bindung von BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) an PolySia und die daraus resultierende Konzentrierung des Wachstumsfaktors an der Zelloberfläche dessen Wirkung potenziert [Müller *et al.* 2000; Vutskits *et al.* 2001].

Die Zahl der bisher *in vivo* nachgewiesenen polysialylierten Moleküle beschränkt sich abgesehen von NCAM auf vier weitere: Das Membranprotein CD36 aus der Familie der *Scavenger*-Rezeptoren, welches beim Menschen in der Muttermilch vorkommt und im Gegensatz zu NCAM an O-Glykanen polysialyliert wird [Yabe *et al.* 2003]. Der Rezeptor Neuropilin-2, der auf dendritischen Zellen zu finden ist und demnach wohl Aufgaben im Rahmen des menschlichen Immunsystems erfüllt, ist ebenfalls Träger von PolySia. Hier ist bisher unklar, an welcher Stelle das Molekül polysialyliert wird [Curreli *et al.* 2007]. Ein weiteres PolySia-tragendes Glykoprotein ist die  $\alpha$ -Untereinheit eines spannungsabhängigen Natriumkanals [Zuber *et al.* 1992] in murinen Gehirnen. Das vierte polysialylierte Molekül wurde in unserem Labor nachgewiesen. Es handelt sich um das synaptische Zelladhäsionsmolekül SynCAM [Galuska *et al.* 2010]. Im Folgenden wird jedoch nur auf das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM und dessen Polysialylierung näher eingegangen (1.2).

## **1.2 Neurales Zelladhäsionsmolekül – NCAM**

### **1.2.1 Struktureller Aufbau**

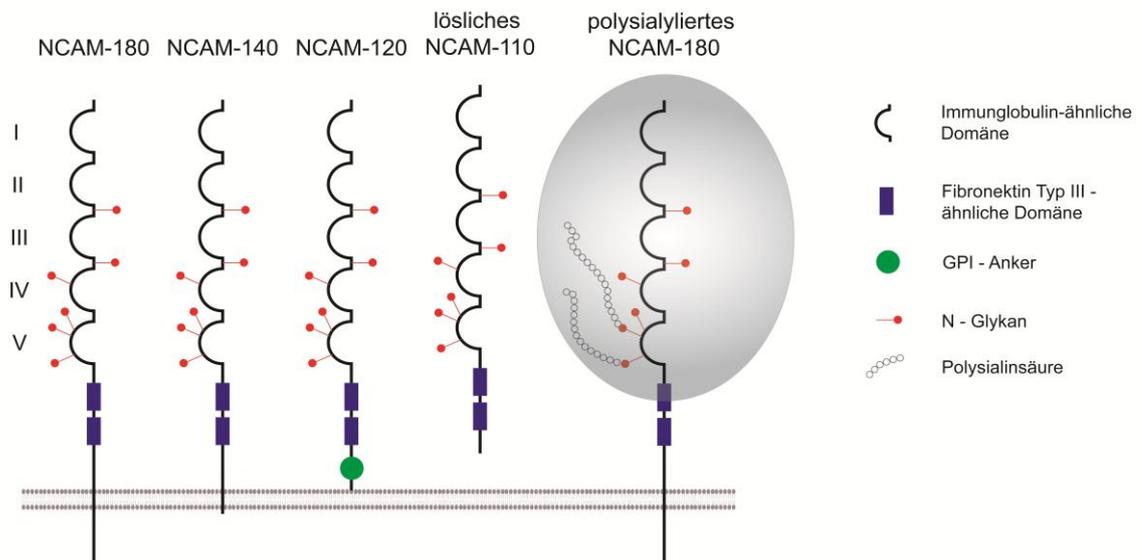
Die erste Beschreibung des Phänomens der Zelladhäsion erfolgte bereits Anfang des 20. Jahrhunderts [Wilson 1907]. Etwas später stieg man vertieft in die Erforschung der CAMs (*cell adhesion molecules*) ein, um alsbald das  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM als ersten Vertreter der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) zu identifizieren [Jorgensen und Bock 1974; Rutishauser *et al.* 1976].

Die IgSF umfasst mehr als 100 Mitglieder und stellt die größte Familie strukturell verwandter Zelladhäsionsmoleküle dar [Brummendorf und Rathjen 1995].

Drei weitere große Familien werden von den Cadherinen, den Selektinen sowie der Familie der Integrine gebildet.

Die Gemeinsamkeit aller Vertreter der IgSF ist das Vorhandensein mindestens einer Immunglobulin-ähnlichen Domäne im extrazellulären Raum. Bei NCAM besteht dieser Bereich aus fünf Ig-Domänen gefolgt von zwei Fibronectin-III-ähnlichen Domänen [Cunningham *et al.* 1987]. NCAM wird von nur einem Gen codiert, welches beim Menschen auf Chromosom 11 [Nguyen *et al.* 1986] lokalisiert ist und durch alternatives Spleißen der prä-mRNA theoretisch über 190 Transkripte zulässt. Auf Proteinebene werden die drei Hauptisoformen entsprechend ihrer apparenten molekularen Massen in NCAM-180, NCAM-140 und NCAM-120 eingeteilt. Bei den beiden Isoformen NCAM-140 und NCAM-180 handelt es sich um *single pass*-Transmembranproteine, die sich durch die Länge ihrer intrazellulären Domänen unterscheiden, diese besteht bei NCAM-140 aus 120 Aminosäuren (AS) und bei NCAM-180 aus 385 AS. NCAM-120 hingegen ist mit einem Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Anker mit der Zellmembran verbunden [Hinsby *et al.* 2004]. Zusätzlich zu den drei membranständigen NCAM-Isoformen existiert noch eine weitere Form, die in diesem Zusammenhang zu erwähnen ist. Letztere ist jedoch nicht mit der Zellmembran verankert und wird deshalb als lösliches NCAM bezeichnet (Abbildung 5). Diese lösliche Form entsteht entweder durch alternatives Spleißen und dem Vorhandensein eines zusätzlichen Exons, was dazu führt, dass NCAM gar nicht erst in die Membran eingebaut wird [Bock *et al.* 1987], durch enzymatische Spaltung der GPI-verankerten NCAM-120-Isoform, wobei postuliert wird, dass eine Phosphatidyl-Inositol-spezifische Phospholipase C die Verbindung zwischen GPI-Anker und Zellmembran löst, oder durch proteolytische Spaltung des extrazellulären Anteils von einer der drei Hauptisoformen von NCAM [Olsen *et al.* 1993; Secher 2010]. Abhängig von dem jeweiligen Freisetzungsmechanismus weisen die löslichen NCAM-Isoformen apparente Molekulargewichte von 110-190 kDa auf. Trotz eingehender Untersuchungen konnten der Ursprung

löslicher NCAM-Fragmente und die für die Abspaltung verantwortlichen Proteasen bisher nicht vollständig aufgeklärt werden.



**Abbildung 5** Aufbau der Hauptisoformen des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM. Dargestellt sind die drei membranständigen Isoformen NCAM-180, -140 und -120, wobei NCAM-180 und NCAM-140 als *single pass*-Transmembranproteine und NCAM-120 als Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-verankertes Protein beschrieben werden. Zusätzlich ist sowohl die lösliche NCAM-110-Isoform als auch NCAM-180 polysialyliert dargestellt. Das NCAM-Protein besteht aus fünf extrazellulären Immunglobulin-Domänen sowie zwei Fibronektin III-ähnlichen Domänen und besitzt sechs N-Glykosylierungsstellen. Modifiziert nach [Kleene und Schachner 2004].

### 1.2.2 Biologische Funktionen

NCAM ist in der Lage durch eine homophile Bindung mit anderen NCAM-Molekülen in einer *cis*-Konfiguration (zwischen NCAM-Molekülen derselben Zelle), als auch in *trans* (zwischen NCAM-Molekülen benachbarter Zellen) zu interagieren (siehe hierzu auch Abbildung 4). Die heterophilen Wechselwirkungen von NCAM sind vielfältig. So tritt NCAM beispielsweise mit dem FGF (*fibroblast growth factor*)-Rezeptor in Wechselwirkung, was wiederum unterschiedliche Folgereaktionen auslösen kann: Zum einen führt die heterophile Interaktion von NCAM mit dem FGF-Rezeptor zur Phosphorylierung des Rezeptors, wodurch eine Signaltransduktionskaskade ins Zellinnere ausgelöst

wird [Williams *et al.* 1994], zum anderen wird in neuronalen Zellen durch NCAM-Bindung direkt eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die zum Neuritenwachstum führt [Kristiansen *et al.* 1999]. Im zentralen Nervensystem (ZNS) wirkt NCAM in Bezug auf GDNF (*glial derived neurotrophic factor*), als sogenannter Co-Rezeptor [Paratcha *et al.* 2003] für dessen eigentlichen Rezeptor GFR $\alpha$  (*GDNF family receptor-alpha*). Es konnte gezeigt werden, dass NCAM nicht nur GDNF binden kann [Durbec *et al.* 1996], sondern dessen Wirkung bei zusätzlicher Anwesenheit von GFR $\alpha$  potenziert und intrazellulär den MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinase-Weg auslöst. Darüber hinaus zeichnet sich NCAM auch durch seine Interaktion mit verschiedenen Neurotrophen aus [Gascon *et al.* 2007]. Bei diesen handelt es sich um sekretierte, basische Proteine, die als Signaltransmitter im Nervensystem fungieren und damit Neuronenwachstum, Differenzierung und Plastizität induzieren können [Miller und Kaplan 2001]. Vier Mitglieder der Neurotrophin-Familie konnten bislang nachgewiesen werden: NGF (*nerve growth factor*), BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), NT 3 (Neurotrophin 3) und NT 4 (Neurotrophin 4). So wird beispielsweise die Wirkung des Wachstumsfaktors BDNF durch die Bindung an die polysialylierte NCAM-Form potenziert [Müller *et al.* 2000]. Weiterhin geht NCAM Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Komponenten der extrazellulären Matrix ein [Walmod *et al.* 2004].

Auch den löslichen NCAM-Formen werden unterschiedliche Aufgaben zuteil. So kann die lösliche Form Zelladhäsionsvorgänge, die durch eine der membranständigen Isoformen vermittelt werden stören [Sadoul *et al.* 1986; Olsen *et al.* 1993] oder die Migration neuronaler Zellen positiv unterstützen [Thomaidou *et al.* 2001]. Weiterhin wurden im Rahmen von Lernprozessen lösliche NCAM-Formen nach induzierter Langzeitpotenzierung im Gyrus dentatus des Hippocampus der Maus nachgewiesen [Fazeli *et al.* 1994]. In pathologischen Zuständen wurde jeweils im Liquor Schizophrenie-erkrankter Patienten sowie von Patienten mit altersbedingter Demenz lösliches NCAM-110 detektiert [Poltorak *et al.* 1995]. Gleiches gilt auch für Seren von Patienten, die unter dem kleinzelligen Lungenkarzinom litten [Jaques *et al.* 1993; Takamatsu *et al.* 1994].

## 1.3 PolySia-NCAM

### 1.3.1 Posttranslationale Modifikationen von NCAM

Alle Isoformen von NCAM können posttranslational modifiziert werden. Dabei gilt es zu unterscheiden, ob der intra- oder der extrazelluläre Anteil des Proteins modifiziert wird. Im N-terminalen Teil der zytoplasmatischen Domäne ist z.B. eine sogenannte Palmitoylierungsstelle zu finden [Murray *et al.* 1987]. Palmitoylierung von NCAM führt zur verstärkten Verankerung in der Zellmembran und zum Einbau in Membranmikrodomänen (*lipid rafts*) [Niethammer *et al.* 2002]. Transmembranäre Isoformen des Proteins können weiterhin intrazellulär über Serin- und Threoninreste phosphoryliert werden [Sorkin *et al.* 1984]. Diese Modifikation vermittelt bei der NCAM-180-Isoform Kontakt zu dem intrazellulären Protein Spektrin, welches einen wesentlichen Bestandteil des Zytoskeletts darstellt [Sytnyk *et al.* 2002]. Die Regulation des NCAM-vermittelten NF $\kappa$ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*)- Signaltransduktionsweges wird über Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von intrazellulären Threoninresten reguliert [Little *et al.* 2001]. Die Sulfatierung von NCAM spielt hauptsächlich während der Entwicklung im Zuge von Zell/Zell- bzw. Zell/Matrix-Interaktionen eine große Rolle [Silberstein und Daniel 1982].

Die Glykosylierung stellt jedoch die bekannteste und weitreichendste posttranslationale NCAM-Modifizierung dar, indem sie Einfluss auf Proteinfaltung, Stabilität und Funktion nimmt. Glykosylierungen finden im Endoplasmatischen Retikulum sowie dem Golgi-Apparat statt [Kiss und Rougon 1997]. Das NCAM-Molekül besitzt sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen (Asn 203, 297, 329, 415, 441 und 470) in den extrazellulären Ig-Domänen [Albach *et al.* 2004], sowie zwei O-Glykosylierungsstellen in den beiden Fibronektin III-ähnlichen Domänen [Walsh *et al.* 1989; Ong *et al.* 2002].

Die Polysialylierung von NCAM stellt in diesem Kontext nicht nur die wichtigste Glykosylierungsform des Proteins dar, sie ist auch die posttranslationale Modifizierung, die im Zusammenhang mit NCAM bislang am eingehendsten charakterisiert wurde und nach wie vor Gegenstand aktueller Studien ist

[Bonfanti 2006; Hildebrandt *et al.* 2008]. Die PolySia-Kette (1.1) wird im Falle von polysialyliertem NCAM (PolySia-NCAM) als terminale Modifikation von N-Glykanen angehängt, die ausschließlich innerhalb der fünften Ig-Domäne lokalisiert sind [Liedtke *et al.* 2001; von Der Ohe *et al.* 2002].

### **1.3.2 Biologische Funktionen**

Eine der wichtigsten Funktionen, die PolySia-NCAM zukommt, ist die Tatsache, dass die NCAM-vermittelte Zell/Zell-Interaktion inhibiert wird (Abbildung 4). Damit einhergehend kann auch der Abstand zwischen benachbarten Membranen, der durch eine NCAM-induzierte Wechselwirkung zustande kam, vergrößert werden [Rutishauser *et al.* 1988]. Dies spielt nicht nur für NCAM selbst eine große Rolle, sondern auch für andere membranständige Proteine, die durch eine PolySia-vermittelte, interzelluläre Raumvergrößerung den Kontakt zu ihren Interaktionspartnern verlieren. Die Polysialylierung von NCAM muss deshalb einem feinen Regulationsmechanismus unterliegen. Während der Embryonalentwicklung wird PolySia-NCAM auf unterschiedlichen Zellen verschiedener Gewebe detektiert, die sich von allen drei Keimblättern (Endoderm, Mesoderm, Ectoderm) ableiten. So konnte PolySia-NCAM in Vorläuferstrukturen der Niere, der quergestreiften Muskulatur, dem Herz und auch der Lunge nachgewiesen werden [Lackie *et al.* 1990; Lackie *et al.* 1991; Lackie *et al.* 1994]. PolySia-NCAM ist weiterhin ein prominenter Regulator der neuronalen Zellmigration und Differenzierung, der axonalen Wegfindung sowie der synaptischen Plastizität während der Entwicklung des Nervensystems und damit einhergehend auch postnatal noch in Strukturen präsent, die im adulten Stadium Neurogenese und Plastizität aufweisen [Fujimoto *et al.* 2001; Kleene und Schachner 2004]. Weitere Funktionen von PolySia-NCAM, die das prä- und postnatale Nervensystem betreffen, werden weiter unten im Kontext verschiedener *knock-out* Studien beschrieben.

Während die Funktionen von PolySia-NCAM im Nervensystem bereits intensiv untersucht wurden und nach wie vor Gegenstand aktueller Forschung darstellen, ist die Rolle von PolySia-NCAM im Immunsystem noch unzulänglich geklärt. Auf

ausgereiften dendritischen Zellen liegt das Oberflächenprotein Neuropilin-2 polysialyliert vor und moduliert hier die Migration dieser Zellen [Bax *et al.* 2009; Rey-Gallardo *et al.* 2010; Rey-Gallardo *et al.* 2011]. Daneben können polysialylierte Glykoproteine auch auf der Oberfläche anderer Immunzellen, wie den Monozyten, natürlichen Killerzellen sowie hämatopoetischen Vorläuferzellen, exprimiert werden [Husmann *et al.* 1989; Curreli *et al.* 2007; Moebius *et al.* 2007; Drake *et al.* 2008; Drake *et al.* 2009].

PolySia-NCAM spielt weiterhin während der Onkogenese und der häufig damit einhergehenden Metastasierung eine Rolle [Daniel *et al.* 2001; Cheung *et al.* 2006]. So konnte polysialyliertes NCAM bereits bei dem kleinzelligen Lungenkarzinom [Kibbelaar *et al.* 1989], dem Wilms-Tumor [Roth *et al.* 1988] sowie in Neuroblastomen [Moolenaar *et al.* 1990] nachgewiesen werden. Da diesen tumorösen Veränderungen allen ein neuro-ektodermaler Ursprung zugrunde liegt, ist davon auszugehen, dass PolySia-NCAM in diesen Geweben reexprimiert vorliegt [Figarella-Branger *et al.* 1990].

### **Mausmodelle zur Untersuchung der biologischen Funktion von PolySia-NCAM im Nervensystem**

Um genaueren Einblick in die biologische Funktion von polysialyliertem NCAM in neuronalen Geweben zu erlangen, wurden Studien mit NCAM-*knock out* (ko)-Mäusen durchgeführt [Cremer *et al.* 1994]. Obwohl NCAM eine zentrale Rolle als Zelladhäsionsmolekül im Gehirn spielt, sind diese Tiere lebensfähig und fertil. Da PolySia-NCAM im adulten Gehirn jedoch primär in Neurogenese-Arealen zu finden ist, zeigen sich hier in späteren Stadien jedoch Defekte. So weist der olfaktorische Bulbus in NCAM-defizienten Mäusen eine deutliche Verkleinerung auf. Neuronale Vorläuferzellen, die der subventrikulären Zone (SVZ) entspringen und entlang des rostralen Migrationsweges (RMS) zum Riechkolben wandern, sind in dieser Funktion gestört [Cremer *et al.* 1997]. Eine weitere morphologische Veränderung ist im Moosfasertrakt des Hippocampus zu finden und betrifft die Faszikulierung der Axone des Gyrus dentatus, die ihrerseits die Pyramidenzellen der CA3 Region innervieren [Cremer *et al.* 1997].

Die generelle Grundlage des Lernens basiert auf der Langzeit-Potenzierung (LTP) der synaptischen Übertragung. In NCAM-ko-Mäusen konnte eine Inhibition dieser LTP im Hippocampus festgestellt werden, was sich in Verhaltensstudien in einer Minderung der Befähigung zu räumlichem Lernen widerspiegelte [Cremer *et al.* 1994]. Weitere Beeinträchtigungen der generierten Tiere sind die Störung der „inneren Uhr“ [Maness und Schachner 2007] und eine geringere Vesikelbildung an Synapsen der motorischen Endplatte [Polo-Parada *et al.* 2001]. Dass Polysialinsäuren im Hirn von großer Bedeutung sind, zeigte sich bereits bei Untersuchungen an Mausmodellen, die zwar NCAM exprimierten, denen jedoch die beiden Polysialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV fehlten. Dies führte zum völligen Verlust von PolySia [Weinhold *et al.* 2005] und zum Tod von über 80 % der Tiere eines Wurfes innerhalb der ersten vier Wochen nach der Geburt. Weiterhin wiesen diese Mäuse ein deutlich reduziertes postnatales Wachstum, Defekte in mehreren Gehirnfasertrakten, einen verkleinerten Bulbus olfactorius sowie einen Hydrocephalus auf.

## 1.4 Lunge

### 1.4.1 Entwicklung und struktureller Aufbau

Die Ausbildung des Respirationstraktes geht vom embryonalen Darmrohr aus, d.h. dass die Lunge aus einem endodermalen sowie einem mesodermalen Anteil besteht. Der endodermale Anteil bildet die späteren Epithelien und Drüsen, aus dem mesodermalen Anteil gehen die glatten Muskelzellen, Bindegewebe, Knorpel und Gefäße hervor.

Das Gewebe der Lungen kann in einen luftleitenden und einen gasaustauschenden Teil gegliedert werden. Der Gasaustausch findet über die sogenannte Blut-Luft-Schranke statt, die in den Alveolen aus den alveolären Epithelzellen (AEZ) von Typ I, den AEZ vom Typ II, die eine Stammzellfunktion haben und sich gegebenenfalls in AEZ Typ I differenzieren können, den Endothelzellen der zuführenden Blutgefäße und einer gemeinsamen Basallamina

besteht. Zusätzlich zu bereits genannten Zellen gehören die immunmodulatorisch wirksamen Alveolarmakrophagen noch zu der physiologischen Ausstattung der Alveolen. Diesen übergeordnet liegt das Bronchialepithel, welches sich aus verschiedenen Zelltypen zusammensetzt: den zilierten Bronchialepithelzellen und den Becherzellen, die zusammen den mukoziliären Apparat der Lunge bilden, den Clara-Zellen, die eine Stammzellfunktion innehaben, sowie den eigentlichen, undifferenzierten Stammzellen, die aufgrund der Lage als Basalzellen bezeichnet werden.

## **1.4.2 Immunologie**

### **1.4.2.1 Überblick**

Bevor auf die spezielle Immunologie der Lunge eingegangen wird, soll vorab ein kurzer Überblick über die allgemeine Einteilung des Immunsystems höherer Lebewesen gegeben werden. Das Immunsystem hat die Fähigkeit, unseren Organismus mittels hochdifferenzierter Abwehrmechanismen vor Eindringlingen, wie Bakterien, oder Parasiten zu beschützen. Dabei ist das System in der Lage, zwischen körpereigenen und körperfremden Substanzen zu unterscheiden. Die Bekämpfung eines eingedrungenen Erregers unterliegt einer hochfeinen Regulation, die in über 400 Millionen Jahren Evolution durch einen Selektionsvorteil entstanden ist. Wird diese intakte Regulation gestört, kann dies massive Auswirkungen auf den Organismus nach sich ziehen. Bei Vertebraten wird generell zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem unterschieden, wobei diese beiden Systeme stets miteinander in Verbindung stehen. Die erste, spontane Immunantwort nach Eindringen eines Erregers wird durch das angeborene Immunsystem vermittelt, welches sehr viel schneller (innerhalb weniger Minuten), aber auch unspezifisch agiert. Dabei ist das Ziel nicht ein einzelnes Antigen auf der Oberfläche des eingedrungenen Erregers zu erkennen, sondern die im Zuge der Evolution hoch konservierten, körperfremden Strukturen zu binden [Janeway 2002]. Diese Strukturen werden als *pathogen-associated-molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet. Beispiele hierfür sind

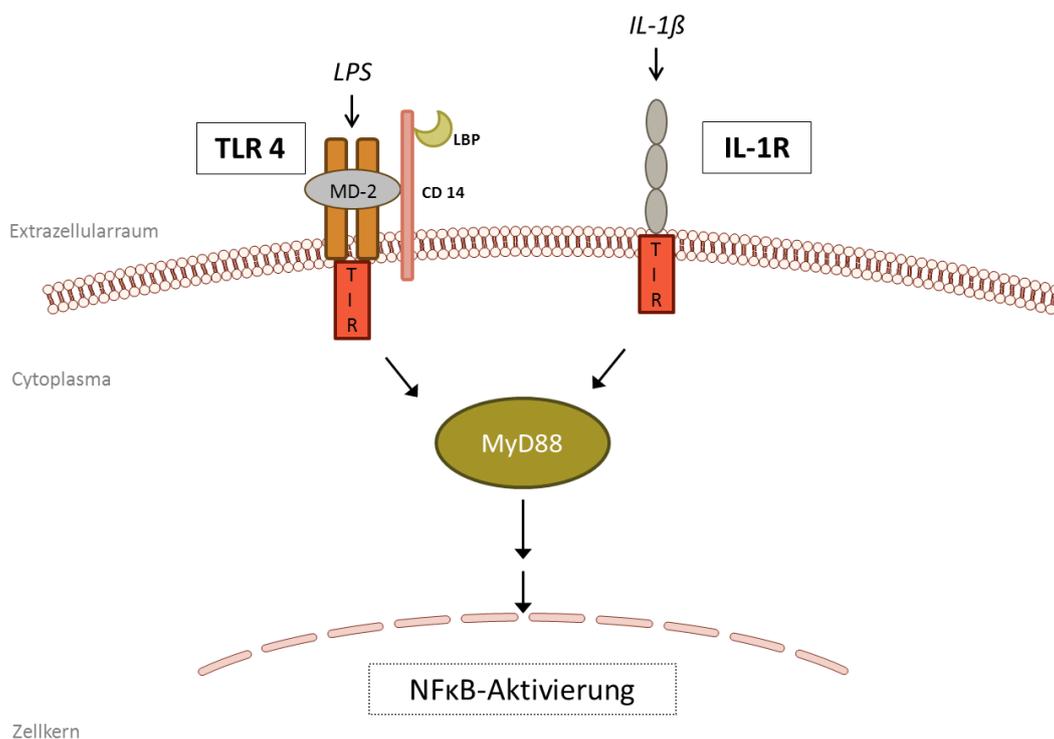
bakterielle DNA, Mannane von Pilzen und Lipopolysaccharide (LPS) von gram-negativen Bakterien [Akira *et al.* 2006].

Die Spezialität der erworbenen Immunantwort besteht darin, dass sich die Effektorzellen Oberflächenmuster der Erreger, mit Hilfe hochspezifischer löslicher Antikörper „merken“ können und damit individuell die äußeren Moleküle des Eindringlings erkennen, binden, Fragmente derselben präsentieren und so die Erreger letztlich bekämpfen können. Die Effektorzellen der erworbenen Immunität sind hauptsächlich T- und B-Zellen [Janeway 2002]. In dieser Dissertation sollen im Folgenden nur zwei Rezeptoren samt zugehörigen Liganden besprochen werden, die im pathologisch veränderten Lungengewebe und damit in der vorliegenden Arbeit eine herausragende Rolle spielen.

#### **1.4.2.2 Toll-like Rezeptor 4 und LPS**

Das *Toll*-Protein wurde erstmals in dem Modellorganismus *Drosophila melanogaster* im Zuge einer dorsoventralen Gewebeausstülpung während der Embryogenese entdeckt [Anderson *et al.* 1985]. Die Familie der *toll-like*-Rezeptoren (TLRs) in Vertebraten umfasst mittlerweile zwölf identifizierte Mitglieder [Akira *et al.* 2006] und zählt zu den *pathogen recognition receptors* (PRRs), die in der Lage sind, hochkonservierte PAMPs zu erkennen. Damit gehört diese Rezeptor-Familie zum angeborenen Immunsystem. TLRs können sowohl intrazellulär als auf der Oberfläche unterschiedlicher Immunzellen exprimiert werden. Bei den besonders intensiv untersuchten Rezeptoren TLR-2 und TLR-4 handelt es sich um transmembranäre Glykoproteine vom Typ I, welche charakterisiert sind durch N-terminale, leucinreiche LRR-Sequenzen (*leucine-rich-repeat*) im Bereich der extrazellulären Domäne. Die cytoplasmatische Signal-Domäne weist Homologien zu der cytoplasmatischen IL-1R-Domäne auf, so dass diese signalgebende Sequenz Toll/IL-1R (TIR)-Domäne genannt wurde [Gay und Keith 1991; Bowie und O'Neill 2000; Beutler 2003]. TLR-4 vermittelt die Erkennung von Lipopolysaccharid (LPS) gram-negativer Bakterien, während TLR-2 die Zellwandbestandteile gram-positiver Bakterien wie Lipoteichonsäure und Peptidoglykane bindet [Hoshino *et al.* 1999]. LPS ist die immunmodulatorische

Komponente von Bakterien, die bislang am Genauesten untersucht wurde. Es ist in der Lage, Entzündungen bis hin zu schwerer Sepsis auszulösen [Beutler und Rietschel 2003]. Eine Aktivierung des TLR-4 über LPS erfordert die Anwesenheit weiterer Co-Rezeptoren, um die komplette Liganden-vermittelte Signalstärke gewährleisten zu können. Bei diesen Co-Rezeptoren handelt es sich um das GPI-verankerte Protein CD 14, das LPS-bindende Protein (LBP), sowie MD-2 [Gioannini *et al.* 2007; Miyake 2007]. Die Signalweiterleitung verläuft über die MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene-88*)-Kaskade hin zur NFκB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*)-vermittelten Transkription im Zellkern [Kagan und Medzhitov 2006], mit dem Ziel proinflammatorische Zytokine wie IL-1β, IL-6, IL-10 oder TNFα zu sekretieren (Abbildung 6).



**Abbildung 6** Der TLR4/IL-1R-Signalweg

Signale über TLR-4 und Interleukin-1-Rezeptoren führen über eine gemeinsame Toll/IL-1R (TIR)-Domäne zu dem Protein MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene-88*), welches über weitere Stufen den Transkriptionsfaktor NFκB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) aktiviert. Dies führt zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. IL-1β (Interleukin 1-β), IL-1R (Interleukin 1-Rezeptor), LPS (Lipopolysaccharid), TLR-4 (*toll-like* Rezeptor-4), LBP (LPS-bindendes Protein), TIR (Toll/IL-1R).

### **1.4.2.3 Interleukin-1-Rezeptor und Interleukin-1 $\beta$**

Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ist eine Unterform des Interleukin-1. Die IL-1-Familie besteht aus drei Mitgliedern: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-1-Rezeptor Antagonist. IL-1 $\beta$  wird bei Entzündung verstärkt von verschiedenen Zelltypen, wie neutrophilen Granulozyten, sekretiert. Das Interleukin wurde zunächst als endogenes Pyrogen beschrieben, es hat jedoch vielfältige weitere proinflammatorische Funktionen [Dinarello 1996]. So kann es beispielsweise weitere Zytokine mit proinflammatorischer Wirkung z.B. *tumor necrose factor-alpha* (TNF $\alpha$ ), IL-10, IL-2 und IL-6 rekrutieren. Der erste Rezeptor für IL-1 wurde 1985 beschrieben, wobei die Rezeptoren für IL-1 $\alpha$  und  $\beta$  identisch sind [Dower *et al.* 1986]. Die zelluläre IL-1 $\beta$ -Antwort wird über den IL-1-Rezeptor vom Typ I (IL-1RI) vermittelt [Sims *et al.* 1993], welcher in geringer Zahl auf fast allen Zellen vorkommt [Sims *et al.* 1988]. Der Rezeptor ist aus einer extrazellulären IL-1-Bindedomäne aufgebaut, die aus drei Ig-ähnlichen Domänen, einer einzelnen Transmembranregion und der cytoplasmatischen TIR-Domäne besteht [O'Neill 1995]. Die intrazelluläre Signalweiterleitung erfolgt dem TLR-4-Signalweg entsprechend (Abbildung 6) [O'Neill 1995].

### **1.4.2.4 Abwehrmechanismen der Lunge**

Zu den wichtigsten Abwehrmechanismen der Lunge zählen neben dem Hustenreflex auch der mukoziliäre Apparat, der von den Becherzellen und den zilierten Bronchialepithelzellen gebildet wird und eingeatmete Fremdstoffe nach außen transportieren soll. Weiterhin zählt die Sekretion von IgG, IgA und verschiedenen antimikrobiellen Proteinen und Peptiden zu den Abwehrreaktionen der Lunge. Die antigenpräsentierenden Alveolarmakrophagen sind in der Lage, Eindringlinge zu phagozytieren, und die Bronchialepithelzellen bedienen sich der Freisetzung unterschiedlicher Mediatormoleküle, allen voran die proinflammatorischen Interleukine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 und TNF $\alpha$ . Weiterhin exprimieren bronchiale Epithelzellen sowohl IL-1R als auch TLR-4 [Parker und Prince 2011], was dem Atemwegsepithel eine entscheidende Rolle in immunmodulatorischen bzw. entzündlichen Prozessen zuteilwerden lässt.

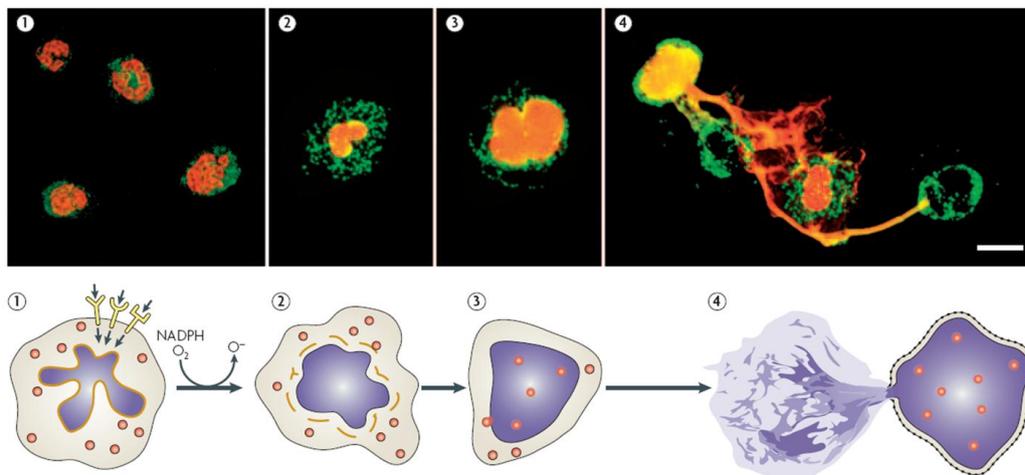
Auf den Entzündungsprozess in der Lunge wird im folgenden Kapitel detaillierter eingegangen.

### **1.4.3 Pathologische Veränderungen**

#### **1.4.3.1 Entzündung**

Bei einer Entzündung handelt es sich *per definitionem* um einen Abwehrmechanismus eines lebenden Organismus auf eine lokale Gewebeschädigung. Aulus Cornelius Celsus beschrieb bereits um 25 v. Chr. die vier noch bis heute gültigen Kennzeichen einer akuten Entzündung: *Tumor, Calor, Rubor und Dolor* (Schwellung, Wärme, Rötung, Schmerz). Heute weiß man, dass bei Entzündungen eine Vielzahl an Interaktionen zwischen Zellen und löslichen Bestandteilen erfolgt, allesamt mit dem Ziel der schnellen Rekonvaleszenz des betroffenen Gewebes. Die Lunge gilt als besonders anfällig für inflammatorische Reize, da sie über die Atemwege sehr gut zugänglich ist für äußere Noxen und damit die erste Verteidigungslinie gegen eingedrungene Erreger bildet (1.4.2.4). Entzündungen der Lunge werden häufig vermittelt durch LPS gram-negativer Bakterien, das über TLR-4 gebunden wird und damit über eine Signaltransduktionskaskade (Abbildung 6) zur Sekretion pro-inflammatorischer Proteine (wie z.B. IL-1 $\beta$ ) führt. Diese löslichen Zytokine wiederum locken Immunzellen der Lunge an. Bei diesen Immunzellen handelt es sich im Zuge einer ersten Verteidigung hauptsächlich um neutrophile Granulozyten [Nathan 2006; Hickey und Kubes 2009]. Neutrophile Granulozyten nehmen nach „Aktivierung“ durch das pro-inflammatorische Interleukin der Bronchialepithelzellen Kontakt zu den Endothelzellen auf, mit dem Ziel, durch das Endothel hindurch in das inflammatorische Gebiet zu extravasieren [Nathan 2002; Hickey und Kubes 2009]. Hier haben die neutrophilen Immunzellen nun verschiedene Möglichkeiten, um die eingedrungenen Erreger zu bekämpfen: (I) Sie erkennen die invasierten Mikroben mit Hilfe der Oberflächen-PAMPs, binden diese über ihre PRRs und internalisieren sie im Rahmen einer Phagozytose-Reaktion. Im entstehenden Phagolysosom (Verschmelzung von Phagosom und Lysosom)

werden die eingedrungenen Erreger mittels proteolytischer und antibakterieller Enzyme bzw. Peptide sowie reaktiver Sauerstoffspezies abgebaut [Nathan 2006]. (II) Eine weitere Maßnahme ist die Sekretion von zelleigenen, antimikrobiellen Proteinen, die in einem Degranulationsprozess freigesetzt werden. Zu diesen antimikrobiellen Proteinen zählen u.a. Lactoferrin, Neutrophile Elastase, Cathepsin G und verschiedene Defensine [Abraham 2003; Hickey und Kubes 2009]. (III) Der dritte Abwehrmechanismus, dessen sich die neutrophilen Granulozyten während einer Entzündungsreaktion bedienen, ist die Bildung von NET (*neutrophil extracellular traps*). Hierbei bilden DNA und Histone zusammen mit einer freigesetzten fibrillären Matrix aus Granula-Proteinen ein antimikrobielles Netz, welches Bakterien und andere Eindringlinge einfangen und an Ort und Stelle zerstören soll [Brinkmann *et al.* 2004]. Bei der Bildung von NET handelt es sich um einen aktiv ablaufenden Prozess, der in Abbildung 7 dargestellt wird.



**Abbildung 7** Die intrazelluläre Bildung der NET-Formation [Brinkmann und Zychlinsky 2007].

Fluoreszenz-Bilder unterstützen die modellhafte Zeichnung. (1) Ausgangssituation, bei der DNA in grün dargestellt ist, die Granula in rot. (2) Die Kernhülle beginnt sich aufzulösen, Degranulierung beginnt. (3) Verlust von Membran-Integrität innerhalb der Zelle. Der Inhalt des Zellkerns sowie die freigesetzten Granula vermischen sich untereinander. (4) Während der finalen Phasen beginnen die Zellen sich zu kontrahieren, um den kompletten Zellinhalt, unter Zerstörung der Zellmembran, zu entladen.

Nach der Rekrutierung und Aktivierung der neutrophilen Granulozyten durch ein sekretiertes pro-inflammatorisches Zytokin (Abbildung 7, 1) kommt es zur

De-Kondensierung des Chromatins im Zellkern des Granulozyten und Hetero- und Euchromatin mischen sich (Abbildung 7, 2). Anschließend kommt es zum Verlust der Kernhüllen-Integrität und zur Degranulation (Abbildung 7, 3). Schlussendlich folgt die Ruptur der Zellmembran und die Ausschüttung von NET (Abbildung 7, 4). Die Bildung von NET wird auch als „nutzbringender Selbstmord“ (*beneficial suicide*) bezeichnet, da die Zelle sich selbst opfert, um die NET-Formation zu generieren, welche die Ausbreitung invasierter Mikroorganismen verhindert [Brinkmann und Zychlinsky 2007]. Ein Nachteil oder Nebeneffekt dieser NET-Formation ist allerdings, dass sich deren Zytotoxizität nicht nur gegenüber den invasierten Mikroorganismen, sondern auch auf die körpereigenen Epithelzellen auswirken kann [Fuchs *et al.* 2011; Saffarzadeh *et al.* 2012]. In den letzten Jahren wurde weiterhin klar, dass NET auch im Rahmen einiger Unfruchtbarkeitsfällen [McCauley *et al.* 1999; Alghamdi und Foster 2005] und Autoimmunerkrankungen als negativer Regulator eine Rolle spielt [Zhong *et al.* 2001; Gupta *et al.* 2005].

#### **1.4.3.2 COPD**

*“Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a lung disease characterized by chronic obstruction of lung airflow that interferes with normal breathing and is not fully reversible. The more familiar terms 'chronic bronchitis' and 'emphysema' are no longer used, but are now included within the COPD diagnosis. COPD is not simply a "smoker's cough" but an under-diagnosed, life-threatening lung disease.”* (<http://www.who.int/respiratory/copd>).

Die chronisch obstruktive Lungenkrankheit (COPD) ist eine entzündliche Lungen-Erkrankung mit progredientem Verlauf, die gekennzeichnet ist durch steigende Prävalenz, Morbidität und Mortalität. Berechnungen zufolge wird die COPD im Jahre 2020 die dritthäufigste Todesursache und die fünfthäufigste Erkrankung darstellen [Benson und Marano 1998]. Die Pathogenese der COPD ist komplex und die Faktoren, durch die es zu einer krankhaften Veränderung kommt, sind sehr vielfältig und reichen von aktiver oder passiver Zigarettenrauchinhalation,

über Ernährung, Geschlecht und berufsbedingte Noxen bis hin zu genetischer Vorbelastung. Die COPD-Pathogenese ist charakterisiert durch eine komplexe Kaskade, in der es zur Aktivierung verschiedener inflammatorischer Mediatoren kommt [Barnes 2000; Barnes 2004]. Durch die Stimulierung von Alveolarmakrophagen, verursacht durch exogene oder endogene Noxen, kommt es zur Freisetzung von Interleukinen, die wiederum neutrophile Granulozyten rekrutieren. Letztere haben das Bestreben, die Entzündung einzudämmen (1.4.3.1), und setzen neben antimikrobiellen Peptiden und Proteasen auch zytotoxische Sauerstoffspezies und NET frei. Da diese Entzündungsprozesse chronisch ablaufen, kommt es nach einiger Zeit zu einem Missverhältnis von sekretierten gewebsschädigenden Stoffen und den benötigten Schutzstoffen. Dieses Ungleichgewicht führt zu einem Abbau elastischer Fasern und vermehrter Mucus-Sekretion. Es entsteht eine Instabilität des Bronchialepithels, die in einem Kollaps und letztlich einem Lungenemphysem resultiert [Doherty 2004]. Bei COPD-Patienten ist IL-1 $\beta$  offensichtlich ein wichtiger Aktivator der Alveolarmakrophagen [Dinarello und Wolff 1993], da im Bronchialepithel dieser Patienten *in vitro* eine vermehrte Freisetzung von IL-1 $\beta$  beobachtet werden konnte [Rusznak *et al.* 2000].

### **1.4.3.3 IPF**

Die idiopathisch pulmonale Fibrose (IPF) zeichnet sich durch übermäßig starke Fibroblastenproliferation und Umbau der extrazellulären Matrix aus, was eine Zerstörung der Lungenarchitektur zur Folge hat [Meltzer und Noble 2008; Guarino *et al.* 2009]. Lassen sich histologisch in physiologischem Gewebe noch gasaustauschende Strukturen, einschließlich der sogenannten Blut-Luft-Schranke, und großlumige Lufträume erkennen, so zeigen Gewebe von IPF-Patienten ein besonderes histopathologisches Merkmal: die multiplen, herdförmigen, fibroblastären Foci, welche wohl den Stellen entsprechen, an denen eine aktive Kollagensynthese stattfindet sowie Bindegewebs-Strukturen, die einen Gasaustausch irreversibel unterbinden. Eine Entzündung gilt nicht als Merkmal der IPF und eine Therapie mit anti-inflammatorischem Konzept führte

demnach bislang nicht zu einer Rehabilitierung des pathologisch-veränderten Gewebes [Selman *et al.* 1998; Selman *et al.* 2001]. Eine Epithelverletzung, die der IPF-Pathogenese zugrunde liegt, kann alleine, ohne Inflammation, zur Ausbildung einer Fibrose führen [Selman *et al.* 2001; Selman und Pardo 2002]. Aktuelle Studien stellen eine pathologische Wechselwirkung zwischen AEZ und Fibroblasten, sowie die Hypothese einer gestörten Wundheilung in den Vordergrund [du Bois 2010].

#### **1.4.4 Bleomycin-Mausmodell**

Bleomycin ist ein antibiotischer Wirkstoff, der in einigen chemotherapeutischen Therapieansätzen als Zytostatikum Verwendung findet [Advani 2011]. Der Nachteil bei der Behandlung ist allerdings, dass die zytotoxischen Nebenwirkungen in der Lunge besonders stark zur Ausprägung kommen [Hay *et al.* 1991]. Die Medikamenten-induzierten Effekte in der Lunge resultieren hierbei in massiv-oxidativen Schäden des respiratorischen Epithels, gefolgt von einer akuten Entzündungsreaktion und schlussendlich einer Lungenfibrose [Chandler 1990; Jules-Elysee und White 1990]. Dieser Nachteil der Bleomycin-Behandlung wird im Mausmodell insofern ausgenutzt, als auf diesem Weg in der Maus eine Entzündungsreaktion mit anschließender Fibrose reversibel induziert werden kann. Damit steht ein experimentelles Tiermodell zur Verfügung, um entweder die molekularen und zellulären Pathomechanismen der pulmonalen Fibrose und der vorangehenden akuten Lungenentzündung oder auch mögliche Therapieansätze zu untersuchen [Grande *et al.* 1998; Mouratis und Aidinis 2011]. Die frühe Phase der Bleomycin-induzierten Immunantwort der Lunge beinhaltet eine Entzündungsreaktion, ausgelöst durch oxidativen Stress, sowie eine daraus resultierende Epithelverletzung. Infolgedessen steigt die Zahl der Immunzellen in den ersten Tagen nach der Verabreichung von Bleomycin stark an. Die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  und *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF $\beta$ ) erreichen zwischen Tag 4 und Tag 7 nach Bleomycin-Darreichung ihre maximale Konzentration und dienen damit als frühe Entzündungsmarker [Nagano *et al.* 2006; Saito *et al.* 2008].

## 2 Zielsetzung

In der Arbeitsgruppe von Prof. Geyer konnte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Günther (Med. Klinik II) bereits gezeigt werden, dass eine IPF- sowie eine COPD-Erkrankung mit einer gesteigerten Expressionsrate der beiden Polysialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV einhergeht. Dieser Effekt war vor allem im Falle von ST8SialII zu beobachten. In Korrelation mit dem erhöhten Spiegel an mRNA der beiden Polysialyltransferasen konnte auch eine Erhöhung des jeweiligen Syntheseprodukts in erkranktem Lungengewebe nachgewiesen werden. Diese Arbeiten wurden von Sandra Müller (*cand. med.*, AG Geyer) durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den genannten ersten Hinweisen auf Vorliegen einer polysialylierten Struktur in der adulten Lunge nachzugehen und diesen gegebenenfalls eine mögliche biologische Funktion zuzuordnen. Dabei standen folgende Ziele im Vordergrund:

- Verifizierung der bereits erzielten Ergebnisse, bezüglich PolySia in der ausgereiften, humanen Lunge.
- Identifizierung des PolySia-Trägerproteins.
- Bestimmung des Polymerisationsgrades der PolySia-Ketten des polysialylierten Glykoproteins.
- Identifizierung des PolySia-exprimierenden Zelltyps.
- Zellkulturversuche mit PolySia-positiven Lungenepithelzellen, um erste Hinweise auf biologische Funktion zu erhalten.
- Aufklärung einer möglichen Rolle von PolySia bei Lungenerkrankungen.
- Einordnung von polysialylierten Strukturen der Lunge in immunologische Fragestellungen.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Probenmaterial**

Donor-, COPD- und IPF-Lungengewebe wurde über die Arbeitsgruppe von Professor Andreas Günther, Medizinische Klinik II des Universitätsklinikums Giessen-Marburg bezogen. Dieses stammte entweder von einer entsprechend erkrankten Lunge, die im Rahmen einer Transplantation durch eine Spenderlunge ersetzt wurde, oder von Donoren, deren Lungen für eine Transplantation nicht in Frage kamen. Die hierfür notwendigen Voten der Ethik-Kommission sind: Nr. 31/93 „Weitergabe von OP-Präparaten“, Nr. 84/93 „Biochemische, pharmakologische und morphologische Studien an bronchoalveolären Lavagen“, 29/01 "Restmengen von Blut und Gewebeproben zu Forschungszwecken". Die Anträge liegen dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität in Kopie vor. Bei Donor-Lungengewebe handelte es sich um vermeintlich gesundes Lungengewebe. Es wurde daher im Rahmen dieser Dissertation als physiologische Kontrolle verwendet. Das Gewebe lag entweder tiefgefroren (zur Western Blot-Analyse) oder paraffiniert, geschnitten und auf Objektträger aufgezogen (zur immunhistochemischen Untersuchung) vor.

Lungengewebe der Maus (Bleomycin-, NaCl – oder unbehandelt) lag ebenfalls im gefrorenen Zustand oder auf Objektträger aufgezogen vor. Der zugehörige Tierversuchsantrag nach § 8 Absatz 1, wurde am 15.02.2012 genehmigt und liegt dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität in Kopie vor. Die Bleomycin-Behandlung (15 mg/kg Körpergewicht in 200 µL 0,9% NaCl-Lösung) bzw. die Kontroll-Behandlung (nur 0,9% NaCl-Lösung) erfolgte ebenfalls in der Medizinischen Klinik II und bezieht sich auf [Wygrecka *et al.* 2007].

## 3.2 Biologische Materialien

### 3.2.1 Zelllinien

A549 Zellen – humane Lungen-Adenocarcinomazelllinie [Giard *et al.* 1973]

### 3.2.2 Antikörper

#### 3.2.2.1 Primärantikörper

	Eigenschaften	Verdünnung Western Blot / IHC	Referenz / Firma*
$\alpha$ -polySia (735)	mAk (Maus IgG2A); erkennt $\alpha$ 2,8–verknüpfte PolySia ab einer Kettenlänge von acht Sialinsäureresten	1 mg/mL 15 mg/mL	[Frosch <i>et al.</i> 1985]
$\alpha$ -NCAM (123C3)	mAk (Maus IgG1); erkennt ein Epitop in den NCAM Exons 11-13, welches abhängig von einer intakten Fibronectin III- ähnlichen Domäne ist.	1,5 $\mu$ g/mL 20 $\mu$ g/mL	[Schol <i>et al.</i> 1988; Gerardy-Schahn und Eckhardt 1994]
$\alpha$ -NCAM (H28)	mAk (Ratte IgG2A); erkennt Peptidsequenz in der zweiten Fibronectin III-ähnlichen Domäne	4 mg/mL 25 mg/mL	[Hirn <i>et al.</i> 1983]
$\alpha$ -KRT5	pAk (Kaninchen IgG); erkennt Peptidsequenz des C- Terminus von Zytokeratin 5	1 $\mu$ g/mL 1 $\mu$ g/mL	abcam
$\alpha$ -CC10	mAk (Ratte IgG1); erkennt humanes, von Clara- Zellen exprimiertes Uteroglobin	1-2 $\mu$ g/mL 15 $\mu$ g/mL	R&D systems
$\alpha$ -HFH4	mAk (Maus IgG1); bindet den Transkriptionsfaktor <i>hepatocyte nuclear factor 3 /</i> <i>forkhead homologue 4</i>	1 $\mu$ g/mL 10 $\mu$ g/mL	abcam
$\alpha$ -pro-SP-C	pAk (Kaninchen IgG); erkennt die Aminosäuren (AS) 1- 33 des pro-Surfactant-Protein C	0,4 $\mu$ g/mL 2-5 $\mu$ g/mL	abcam
$\alpha$ -Ki67	mAk (Maus IgM); erkennt das nukleäre Protein Ki- 67, welches nur während der Mitose zugänglich ist	1:100 1:800	Sigma

\* abcam (Cambridge, Großbritannien); R&D systems (Minneapolis, USA); Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

### 3.2.2.2 Sekundärantikörper

	Konjugat	Firma*
pAk Ziege $\alpha$ -Maus Ig	HRP	Dako
pAk Kaninchen $\alpha$ -Maus Ig	HRP	Dako
pAk Schwein $\alpha$ -Kaninchen Ig	HRP	Dako
pAk Kaninchen $\alpha$ -Ratte IgY(IgG)	HRP	dianova
pAk Ziege $\alpha$ -Maus IgG	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	dianova
pAk Ziege $\alpha$ -Maus IgG	Rhodamin-Rot	dianova

\* Dako (Glostrup, Dänemark); dianova (Hamburg, Deutschland)

### 3.2.3 Enzyme

Endoneuraminidase N (EndoN)	Die Endoneuraminidase N stammt aus einem <i>E. coli</i> K1 Phagen. Sie bindet an $\alpha$ 2,8-verknüpfte Sialinsäuren ab einem Polymerisationsgrad von acht Resten und spaltet ein Oktamer in drei (nicht-reduzierendes Ende) und fünf (reduzierendes Ende) Reste [Stummeyer <i>et al.</i> 2005].
PNGase F	Roche (Mannheim, Deutschland)

## 3.3 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Zellkulturzusätze

### 3.3.1 Verbrauchsmaterialien

Filme	GE Healthcare (Chalfont, Großbritannien)
Filterpapier „Whatman-Paper“	Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland)
Mikrotiterplatten	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Petrischalen	Greiner (Kremsmünster, Österreich)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Polypropylenröhrchen (15 mL, 50 mL)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

PVDF-Membran	GE Healthcare
Reaktionsgefäße (1,5 mL, 0,5 mL)	Eppendorf
Molekulargewichtsmarker	NEB (Massachusetts, USA)
<i>PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder</i>	
[kDa] 250; 130; 95; 72; 55; 36; 28	

### 3.3.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, in p.a.-Qualität bzw. als Lösungsmittel für die HPLC bezogen (Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Fluka, Neu-Ulm; Serva, Heidelberg; Sigma, Taufkirchen; alle Deutschland). Wasser wurde durch eine Elix UV5 Anlage vorgereinigt und mit dem „Milli-Q Ultra-pure water System“ (Millipore, Eschborn) entsalzt und analytisch rein aufgearbeitet. Das so aufgereinigte Wasser wird fortan als Aqua dest. bezeichnet.

### 3.3.3 Nährmedien und Zellkulturzusätze

Alle Nährmedien, Seren, Zusätze und benötigte Reagenzien für die Zellkultur wurden stets in höchster Qualitätsstufe bei der Firma PAA (Marburg, Deutschland) bezogen.

## 3.4 Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturtechnischen Arbeiten erfolgten unter Berücksichtigung der Steriltechnik bzw. der „aseptischen“ Arbeitsweise. Die eingesetzten Lösungen und Verbrauchsmaterialien wurden entweder werkseitig durch Gammastrahlung sterilisiert oder mittels Millipore® Membranfilter (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert, bei 500°C im Glühofen behandelt (Glasgeräte und ungestopfte Pasteurpipetten) bzw. autoklaviert. Als Sicherheitswerkbank diente eine Klasse 2 Werkbank der Firma Nunc (Langenselbold, Deutschland).

### **3.4.1 Kultivierung von A549 Lungenepithelzellen**

Bei der Zelllinie A549 handelt es sich um eine Adenocarcinoma Zelllinie aus der humanen Lunge. Kultiviert werden diese Zellen in „Earles Minimum Essential Medium“ mit L-Glutamin, angereichert mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin. A549 Zellen wachsen adhärent als sogenannte Monolayerkulturen und benötigen zum Wachstum und zur Vitalitätserhaltung Brutschrankbedingungen von 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> (Brutschrank: Binder, Tuttlingen, Deutschland).

#### **3.4.1.1 Passagieren von Zellen**

Bevor eine adhärente Monolayerkultur subkultiviert werden kann, müssen die Zellen sowohl von der Zellkulturschale selbst als auch voneinander gelöst werden. Dafür wird ein Gemisch aus Trypsin, einer Pankreasprotease, das die Zell-Matrix-Verbindungen löst und EDTA, welches als Ca<sup>2+</sup>-Chelator dient und die Zell-Zell-Verbindungen löst, eingesetzt. Die fertige Trypsin-EDTA-Lösung besteht aus 0,5 mg/mL Trypsin und 0,22 mg/mL EDTA, welche in PBS gelöst wurden. Eine nahezu konfluente Zellkulturschale wurde mit angewärmtem Dulbeccos PBS gewaschen und anschließend mit 2-4 mL Trypsin-EDTA-Lösung/75 cm<sup>2</sup> Kulturoberfläche behandelt. Die Inkubationszeit für die Trypsinbehandlung betrug 1-3 min bei 37°C im Brutschrank. Die enzymatische Behandlung wurde nach vollständigem Ablösen aller Zellen (Kontrolle unter dem Mikroskop) mit der doppelten Menge (4-8 mL) Vollmedium abgestoppt, die Zellsuspension in einem 15 mL Röhrchen für 10 min bei 1000 × g abzentrifugiert, das Zellpellet in 1 mL frischem Vollmedium aufgenommen und gründlich homogenisiert. Die Zellsuspension wurde mit 9 mL Medium auf 10 mL Gesamtvolumen aufgefüllt und die Zellen je nach Bedarf 1:10 oder 1:20 verdünnt auf frische Zellkulturschalen ausgesät. Für Versuchsansätze, die in Mehrfachkulturschalen durchgeführt werden sollen, ist es unabdingbar die Zellen vorher zu zählen (3.4.2), um standardisierte Bedingungen gewährleisten zu können.

### 3.4.1.2 Einfrieren der Zellen

Die Lagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  bzw. in der Gasphase oberhalb des flüssigen Stickstoffs ( $-150$  bis  $-160^{\circ}\text{C}$ ), ermöglicht eine nahezu unbegrenzte Lagerung von Zellen und Gewebekulturen. Die gegebenen Bedingungen bewahren die Zellkulturen vor Kontamination, Alterung (Seneszenz), dem Phänomen des „Genetic Drifts“ und anderen möglichen Instabilitäten, da unterhalb von  $-130^{\circ}\text{C}$  keinerlei biochemische Reaktionen mehr ablaufen können. Als Frostschutzmittel zum Einfrieren von Zellen dient Dimethylsulfoxid (DMSO), welches Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle verhindert, indem es sich mit dem Wasser der Zellen verbindet bzw. dieses verdrängt. Das Einfrieren erfolgt grundsätzlich in Suspensionen.

#### Einfriermedium

Lösung I:     80% serumfreies Medium  
              20% DMSO

Lösung II:    60% serumfreies Medium  
              40% FCS

Die zum Einfrieren vorgesehenen Kulturen sollten sich in der späten log-Phase, kurz vor der Konfluenz befinden. Die beiden frisch hergestellten Einfrierlösungen wurden zunächst unter der Werkbank sterilfiltriert und mittels Eisbad gekühlt. Die Zellen einer Kulturschale wurden wie gewohnt mittels Trypsin-EDTA vom Boden der Schale abgelöst, zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in  $500\ \mu\text{L}$  der FCS-reichen Lösung II aufgenommen, resuspendiert und in einem Einfrier-Röhrchen vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe von  $500\ \mu\text{L}$  der DMSO-haltigen Lösung I, beide Lösungen wurden gemischt und auf Eis platziert. Die vorbereitende Lagerung der Zellsuspensionen für die Stickstofflagerung, erfolgte für 2-4 Stunden (h) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  sowie über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Der Einfriervorgang endete mit der Überführung der tiefgekühlten Proben in den  $-196^{\circ}\text{C}$  Stickstofftank.

### **3.4.1.3 Auftauen von Zellen**

Das Auftauen von Zellkulturen sollte möglichst zügig erfolgen, um eventuelle Zellschädigungen zu vermeiden. Nach Entnahme aus dem Stickstoffbehälter wurden die in Einfrier-Röhrchen befindlichen Zellen im Wasserbad (37°C) erwärmt, die aufgetauten Zellsuspensionen in je 9 mL vorgewärmtem Medium aufgenommen und abzentrifugiert, um das Frostschutzmittel DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde nach Zentrifugation verworfen, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine 75 cm<sup>2</sup>-Kulturschale ausgesät.

### **3.4.2 Zellzählung mittels Neubauer-Kammer und Trypanblaufärbung**

Für Zellkulturversuche, die in Mehrfachkulturplatten angesetzt werden, ist es wichtig, eine definierte Zellzahl pro Kavität auszusäen, um Experimente standardisieren zu können. Die Zellen wurden wie gewohnt mittels Trypsin-EDTA von der Kulturoberfläche abgelöst, zentrifugiert und das Zellpellet in einem Gesamtvolumen von 10 mL Medium aufgenommen. Die Neubauer-Kammer ließ sich vorbereiten, indem das Deckglas mit leichtem Druck auf die Stege der Kammer aufgeschoben wurde. Bei korrektem Sitz, konnten sogenannte Newtonsche Ringe an der Auflagefläche beobachtet werden. Das Zählgitter bestand bei der Neubauer-Zählkammer aus 3 × 3 Großquadraten von je 1 mm Kantenlänge und somit einer Fläche von je 1 mm<sup>2</sup>. Je nach Zelldichte wurde die Zellsuspension 1:2 – 1:4 mit Trypanblau verdünnt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der als Anion sehr leicht an Proteine binden kann und als Farbstoff zur Vitalfärbung eingesetzt wird. Bei lebenden Zellen hat der Farbstoff keine Möglichkeit, ins Zellinnere zu dringen, während tote Zellen sich mit besagtem Farbstoff anfärben lassen. Eine mikroskopische Beurteilung der Vitalität der Zellkultur ist dadurch gewährleistet.

Die mit Trypanblau verdünnte Zellsuspension wurde in die Zählkammer gefüllt, indem man die Pipette seitlich am Rand des Deckglases ansetzte und die Lösung in den vorgegebenen Zwischenraum gibt. Von den neun Großquadraten wurden

jeweils die 4 Eckquadrate ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Die Zellzahl ließ sich anschließend wie folgt berechnen:

$$\frac{\Sigma \text{Zellzahl der 4 Eckquadrate} \times \text{Verdünnung}}{4} = \text{Mittelwert Zellzahl / Quadrat}$$

$$\text{Mittelwert Zellzahl / Quadrat} \times 10^4 = \text{Zellen pro mL}$$

$$\text{Zellen pro mL} \times \text{Volumen der Zellsuspension} = \text{Gesamtzellzahl}$$

Bei einer gewöhnlichen Zellzahlbestimmung werden nur lebende, d.h. ungefärbte Zellen ausgezählt. Für eine Vitalitätsüberprüfung werden jedoch sowohl lebende als auch tote Zellen nach oben beschriebener Methode gezählt und der prozentuale Anteil an lebenden Zellen wie folgt bestimmt:

$$\% \text{ lebende Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen}} \times 100$$

Die Zellen wurden je nach Versuchsaufbau in eine Mehrfachkulturschale mit 6, 12 oder 24 Vertiefungen (fortan *well* genannt) ausgesät. Dabei wurden in eine 6-*well*-Platte 500.000 Zellen/*well*, in eine 12-*well*-Platte 200.000-300.000 Zellen/*well* und in eine 24-*well*-Platte 100.000-150.000 Zellen/*well* ausplattiert.

### 3.4.3 Inkubation von A549 Zellen mit verschiedenen Wirksubstanzen

Zellkultursubstanzen werden grundsätzlich in dem zur Zelllinie gehörenden, serumfreien Medium (Hungermedium) angesetzt. Pro Substanzinkubation wurde zusätzlich je eine Kontrolle, die unbehandelt bleibt, mit angesetzt. Weiterhin wurden die Zellen vor Inkubationsbeginn für 1 h „gehungert“, d.h. das serumhaltige Medium wurde durch das entsprechende serumfreie Hungermedium ersetzt.

Bei Experimenten, in denen die Zellen zusätzlich mit der Sialinsäure-Vorläuferstruktur *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) behandelt werden sollten, wurden 100 µM ManNAc/25 mL Hungermedium angesetzt und die Zellen in diesem modifizierten Medium ausplattiert. Dabei wurde Mannosamin (Sigma)

zuvor von Nils Bayer (*cand. med.*, AG Geyer) in einem standardisierten Acetylierungs-Verfahren, welches in unserem Labor etabliert ist, modifiziert, um eine per-acetylierte Variante des Moleküls zu erhalten.

#### **3.4.3.1 IL-1 $\beta$ und LPS**

Rekombinantes Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), welches in *Escherichia coli* exprimiert wurde, (R&D systems) lag in der Stamm-Konzentration 25  $\mu\text{g/ml}$  in PBS-BSA 1 % - Lipopolysaccharid aus *E. coli* (Sigma; Stamm 0127:B8) in der Konzentration 1 mg/mL in PBS vor. Für die Substanzinkubation wurden 500.000 Zellen/*well* in eine 6-*well*-Platte ausgesät. Nach 48 h Wachstum konnte die Inkubation mit den jeweiligen Substanzen begonnen werden. Dabei wird IL-1 $\beta$  in den finalen Konzentrationen 25 ng/mL, 100 ng/mL und 200 ng/mL – LPS in den Konzentrationen 200 ng/ml, 1  $\mu\text{g/ml}$  und 2  $\mu\text{g/mL}$  eingesetzt. Die Inkubationszeit für die beiden eingesetzten Substanzen betrug 5 h unter Brutschrankbedingungen.

Nachfolgend wurden die Zellen zum Teil zusätzlich mit Histonen, *neutrophil extracellular traps* (NET) oder dem Metalloprotease-Inhibitor TAPI-2 (3.4.3.3) behandelt, die Zytotoxizität (3.4.4) bestimmt und/oder die Zellen bzw. die Überstände einer affinitätschromatographischen Aufreinigung (3.6.3) mit anschließender Western Blot Analyse (3.6.6) unterzogen.

#### **3.4.3.2 Histone und NET**

Die Zellen wurden teilweise nach IL-1 $\beta$  und LPS Stimulation noch zusätzlich mit gereinigten Histon-Präparaten (Histone from calf thymus, Type II-A; Sigma) bzw. NET behandelt. Das frisch aufgearbeitete NET wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Preissner (Biochemisches Institut, Justus-Liebig Universität Gießen) zur Verfügung gestellt und nach folgendem Protokoll gewonnen und eingesetzt [Saffarzadeh *et al.* 2012].

Histone wurden in der Konzentration 1 mg/mL in steril-filtrierte  $\text{H}_2\text{O}$  als Stamm-Lösung angesetzt und in den finalen Konzentrationen 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ ,

15 µg/mL, 30 µg/mL zu den bereits substanzbehandelten Zellen gegeben und diese über Nacht bei Brutschrankbedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Zytotoxizität der verschiedenen kombinierten Substanzen auf die Zellen bestimmt (3.4.4).

### 3.4.3.3 TAPI-2

Der Metalloprotease-Inhibitor TAPI-2 (*TNF-α Protease Inhibitor-2*) [Enzo Life Science, Lörrach, Deutschland] wurde in der finalen Konzentration 50 µM nachträglich zu den Zellen pipettiert. Anschließend wurden diese wie oben angegeben unter Brutschrankbedingungen inkubiert.

### 3.4.4 Zytotoxizitätsmessung

Das Absterben von Zellen bzw. der Zelltod wird üblicherweise anhand des Verlusts der Integrität der Zellmembran bestimmt, da sich dann im Kulturüberstand verschiedene Proteine des Zytoplasmas nachweisen lassen. So kann man z.B. die Menge an Laktatdehydrogenase (LDH), einem stabilen zytoplasmatischen Enzym, welches in allen Zellen vorkommt, bestimmen. Im nachfolgenden soll die durchgeführte Zytotoxizitätsmessung mittels des käuflichen Kits „Cytotoxicity Detection Kit (LDH)“ der Firma Roche zur Quantifizierung der Laktatdehydrogenase beschrieben werden. Es handelt sich dabei um eine zweistufige enzymatische Reaktion.

Lösung 1: Katalysator (Diaphorase / NAD<sup>+</sup>-Mixtur)

Lösung 2: Farbstoff (Iodonitrotetrazoliumchlorid [INT] / Natriumlaktat)

(1) In dem ersten enzymatischen Schritt wird Laktat durch die freigesetzte Laktatdehydrogenase zu Pyruvat oxidiert, NAD<sup>+</sup> wird dabei zu NADH + H<sup>+</sup> reduziert. (2) In der nachfolgenden Reaktion wird das INT durch das Enzym Diaphorase zu einem Formazansalz reduziert. Der dabei auftretende

Farbumschlag von Gelb nach Rot kann dann im ELISA-Photometer bei 450 nm nachgewiesen werden. Um Substanzen auf ihre Zelltoxizität zu überprüfen wurden die Zellen wie zur Substanzinkubation in 6-, 12- oder 24-*well* Platten aus und wie oben beschrieben behandelt (3.4.3). Zusätzlich dazu war es von entscheidender Bedeutung sowohl die minimale (spontane) als auch die maximale LDH-Menge zu bestimmen. Für die Minimalkontrolle wurden die Zellen nicht mit Substanz, sondern ausschließlich mit Medium behandelt. Die Maximalkontrolle wurde mit Hilfe des nicht-ionischen Detergenzes Triton X-100 erstellt, welches die Zellwände quantitativ permeabilisiert und damit die maximale Menge an Lactatdehydrogenase freisetzt. Nach der Inkubationszeit wurden die einzelnen Zellkulturüberstände der Proben, sowie von Minimal- und Maximalkontrolle abgenommen und in Reaktionsgefäße überführt. Da die Messung zellfrei erfolgen sollte, unterzog man die Proben einem Zentrifugationsschritt ( $20160 \times g / 15 \text{ min}$ ), bevor die daraus resultierenden Überstände erneut überführt wurden.

Arbeitslösung für 100 Tests:

Lösung 1: 250  $\mu\text{L}$

Lösung 2: 11,25 mL

Je 100  $\mu\text{L}$  der substanzinkubierten Proben, der Minimal- sowie Maximalkontrolle, als auch des verwendeten Mediums (Leerwert), wurden im Rahmen einer Dreifachbestimmung in eine optisch klare 96 *well*-Platte (Nunc) pipettiert und anschließend 1:2 mit der frisch angesetzten Arbeitslösung gemischt. Nach einer 30 minütigen, lichtgeschützten Inkubation bei Raumtemperatur (RT) erfolgte die Messung der Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader. Zur Auswertung des Tests wurde der Mittelwert der Proben-Triplikate gebildet und der Leerwert jeweils subtrahiert. Die so erhaltenen Werte konnten, in untenstehende Formel eingesetzt, eine Aussage über die prozentuale Zytotoxizität der eingesetzten Substanzen treffen:

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = \frac{\text{erhobener Mittelwert} - \text{Minimalkontrolle}}{\text{Maximalkontrolle} - \text{Minimalkontrolle}} \times 100$$

### 3.5 Histologische Methoden

Für die immunhistologischen Methoden wurden bereits fertig aufgezogene Lungen-Paraffinschnitte von IPF und COPD-Patienten, sowie gesunden Spendern verwendet. Die Proben stammten aus der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Giessen-Marburg, Labor Professor Andreas Günter. Vorbereitend für alle nachfolgenden Methoden mussten die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte zunächst entparaffiniert und rehydratisiert werden. Dafür wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe, beginnend mit Xylol bzw. Xylolersatz Schritt für Schritt gewässert:

- 3 x 5min Roti®-Clear (Roth)
- 2 x 3min 100% Ethanol
- 1 x 2min 70% Ethanol
- 1 x 2min 40% Ethanol
- 1 x 5min Aqua dest.

Aus dem letzten Schritt heraus starteten alle hier beschriebenen immunhistologischen Färbemethoden, die Streptavidin-Biotin Methode und auch der Mikrowellenaufschluss, der einigen Primärantikörperbehandlungen vorgeschaltet werden musste.

#### 3.5.1 Färbemethoden

##### 3.5.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung, kurz HE-Färbung genannt, gehört zu den typischen Routinefärbungen im Labor, da sie einen Überblick über die verschiedenen Gewebestrukturen liefert. Der stark basische Farbstoff Hämatoxylin färbt basophile Gewebekomponenten, wie Nukleinsäuren bzw. Zellkerne, Glycosaminoglykane, saure Glykoproteine und Regionen, die reich an rauhem endoplasmatischem Retikulum sind, dunkelblau-violett. Die

Kontrastfärbung erfolgt mit dem schwach sauren Farbstoff Eosin G, der die azidophilen Bestandteile des Gewebes (Mitochondrien, Sekretgranula, Kollagen) rot anfärbt.

Die Färbung erfolgte nach Herstellerangaben ([www.carl-roth.de](http://www.carl-roth.de)). Die verwendeten Farbstoffe wurden vorbereitend in Tropfflaschen umgefüllt und direkt auf das, auf Objektträger (OT) aufgezoogene, Gewebe der Schnitte aufgetropft. Der Vorgang startete mit der Zellkernfärbung mittels der Hämaunlösung nach Mayer (Roth) für 3-5 min. Anschließend wurden die OT kurz mit Aqua dest. abgespült und unter fließendem Leitungswasser für 15 min „gebläut“. Die Hämaunbindung erfolgte im stark sauren Milieu; um diese Färbung zu konservieren, musste anschließend der pH-Wert erhöht werden, was durch Spülen mit Leitungswasser erreicht werden konnte. Dieser Vorgang wird in der Histologie als „Bläuen“ bezeichnet. Die Gegenfärbung wurde durch Inkubation (3 min) mit Eosin-G Lösung (Roth) erzielt, der vorher 1 mL Eisessig/100 mL Eosin-Lösung zugegeben wurde. Die Schnitte wurden anschließend kurz in Aqua dest. gewaschen, über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und nach Roti®-Histol (Roth) Behandlung (Xylolersatz) mit Roti®-Mount (Roth) eingedeckt. Im Mikroskop erscheinen nach erfolgter Färbung die Zellkerne blau und die übrigen Strukturen (Zytoplasma, Kollagenfasern, Erythrozyten) rötlich.

### **3.5.1.2 Mikrowellenaufschluß**

Stammlösung A: 0,1 M Zitronensäure ( $C_6H_8O_7$ )

Stammlösung B: 0,1 M Natriumcitrat ( $C_6H_5Na_3O_7 \times 2 H_2O$ )

Manche Antikörper erkennen als Zielstruktur Transkriptionsfaktoren oder Proteine, die sich innerhalb des Zellkerns befinden. Aus diesem Grund ist eine Antigen-Demaskierung mittels Mikrowelle und Citratpuffer unabdingbar. Um ein Abschwimmen der entparaffinierten Gewebeschnitte zu verhindern, ist es wichtig, beschichtete Objektträger zu benutzen. Die Schnitte wurden in mikrowellene geeignete Plastik – oder Glasgefäße gestellt, die mit 10 mM

Citratpuffer (pH 6) gefüllt waren [1,8 % Stammlösung A + 8,2 % Stammlösung B in Aqua dest.], und die Mikrowelle auf 600 Watt programmiert. Präparate wurden dreimal 5 min sprudelnd aufgekocht, wobei zwischen den einzelnen Kochvorgängen der mögliche Flüssigkeitsverlust in den Gefäßen durch destilliertes Wasser ausgeglichen werden musste, damit die Schnitte während der Prozedur nicht austrockneten. Im Anschluss an den letzten Kochvorgang folgten ein H<sub>2</sub>O- und ein PBS-Waschschritt, bevor mit dem Proteinblock der Streptavidin-Biotin-Methode (3.5.1.3) fortgefahren wurde.

### **3.5.1.3 Streptavidin-Biotin-Methode**

#### PBS-BSA 0,1 % pH 7,4 (Waschpuffer)

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O

0,1 % Bovines Serum Albumin (BSA) [Fraktion IV, Roth]

Ziel dieser immunhistochemischen Streptavidin-Biotin Färbemethode ist die Visualisierung von Gewebe- und Zellantigenen durch Antikörper. Verwendet wurde hierfür das ZytoChem-Plus AP Kit mit FastRed-Färbung (Zytomed Systems, Berlin, Deutschland).

#### Im Kit enthaltene Reagenzien:

Reagenz 1: Blockierlösung (gebrauchsfertig)

Reagenz 2: biotinylierter, polyvalenter Sekundärantikörper (gebrauchsfertig)

Reagenz 3: Streptavidin-Alkalische Phosphatase (AP)-Konjugat (gebrauchsfertig)

Die Reagenzien sollten bei 4°C gelagert und vor Benutzung auf RT gebracht werden. Die Schnittpräparate wurden zunächst wie gewöhnlich entparaffiniert und rehydratisiert (3.5). Um mögliche Hintergrundfärbungen durch unspezifische Antikörper-Bindungen auszuschließen, war der erste Schritt (z.T. nach

Mikrowellenaufschluss) ein fünfminütiger Proteinblock (Reagenz 1). Anschließend wurden die Schnitte in Waschpuffer (PBS-BSA 0,1%) für 2 min unter Rotation in einer Küvette gewaschen, bevor die Inkubation mit entsprechend spezifischem Primärantikörper in optimaler Verdünnung (3.2.2.1) in PBS-BSA 2 % für 30-60 min bei RT oder optional über Nacht bei 4°C erfolgte. Nach einem Waschschrift (dreimal 2 min) wurde der polyvalente, biotinylierte Sekundärantikörper (Reagenz 2) aufgetragen (Inkubation: 10-15 min bei RT), der als Brücke zwischen dem Primärantikörper und dem Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Reagenz 3) diente, das nach einem weiteren Waschschrift (PBS-BSA 0,1 % Waschpuffer; 3 × 2 min) für 10-15 min bei RT auf den Gewebeschnitt aufgetragen wurde. Das Streptavidin bindet hierbei mit hoher Spezifität das Biotin des Sekundärantikörpers. Die enzymatische Reaktion mit der Alkalischen Phosphatase wurde nachfolgend an einen letzten Waschschrift (3 × 2 min) durch Zugabe einer jeweils frisch angesetzten Substrat/Chromogen-Lösung (1 FastRed-Tablette [Chromogen] wurde in einer Flasche Naphtol-Phosphat-Puffer [Substrat] aufgelöst) gestartet, in deren Verlauf sich am Ort der Primärantikörperbindung ein leuchtend roter Farbniederschlag bildete, der im Lichtmikroskop sichtbar war. Gestoppt wurde die Farbreaktion durch destilliertes Wasser, sobald die gewünschte Farbintensität (ständige lichtmikroskopische Kontrolle) erreicht war. Abschließend wurde der Schnitt mit Hämalau gegengefärbt (3.5.1.1), gebläut und permanent eingedeckt.

### **3.5.2 Permanentes Eindecken von histologischen Schnitten**

Bei der Herstellung von Dauerpräparaten gilt es zu unterscheiden, ob es sich dabei um ein sogenanntes wässriges Eindecken, mit wasserlöslichen Präparaten oder Eindecken mit Intermedien, d.h. Xylol oder Roti-Histol (Roth) handelt. Dementsprechend wird das Einbettmittel gewählt.

Hydrophobe Gewebe werden mit dem gebrauchsfertigen Roti®-Histokitt-, hydrophile Gewebe mit Mowiol 4-88/DABCO (Roth) eingebettet. Bei Mowiol handelt es sich um einen teilhydrolysierten Polyvinylalkohol, der üblicherweise

zusammen mit dem Antibleichmittel DABCO (1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)octan) verwendet wird. Hierfür wurden 2,4 g Mowiol zusammen mit 6 g Glycerin gemischt, eine Stunde bei RT unter Rühren gelöst und nach Zugabe von 6 mL Aqua dest. eine weitere Stunde bei RT gerührt. Anschließend versetzte man das Gemisch mit 12 mL 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5) und inkubierte dieses für 2 h bei 50°C. Während dieser Zeit wurde die Mowiol-Lösung alle 20 min kurz auf dem Magnetrührer gemischt. Abschließend wurden pro mL Lösung 25 mg DABCO zugegeben und so lange gerührt, bis eine klare Lösung entstand. Diese wurde in Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wurden die Mowiol/DABCO-Aliquots aufgetaut und sofort auf Eis gestellt. Zu beachten ist hierbei allerdings, dass ein Aliquot dieses Eindeckmittels maximal 2× aufgetaut werden darf. Danach ist die Lösung zu verwerfen.

### 3.5.3 Zellfixierung und Immunfluoreszenzfärbung

Um Zellen permanent zu fixieren, immunfluoreszenz zu färben und einzudecken, müssen adhärente Zellen zunächst auf einer mobilen Unterlage anwachsen. Dafür versieht man 12-well-Platten mit sterilen, runden Deckgläschen (Durchmesser 15 mm) und sät die Zellen wie gewohnt aus (3.4.1). Die angewachsenen Zellen können dann mitsamt dem Deckgläschen entnommen und fixiert werden.

#### PFA-Lösung

80 mM PIPES (Piperazin-*N,N'*-bis(2-ethansulfonsäure)); pH 6,8

2 mM MgCl<sub>2</sub>

4% Paraformaldehyd (PFA)

5 mM EGTA

Fixationsmittel wirken auf unterschiedliche Weise stabilisierend auf Zellkomponenten. In der Regel entziehen sie aber Molekülen ihre Hydrathülle und fällen sie damit aus dem Cytoplasma aus.

In unserem Fall wurde sowohl die Methanol- als auch die Paraformaldehyd (PFA)-Fixierung angewandt. Bei der Methanol-Fixierung wurden die Zellen einmal mit kaltem PBS (+4°C) gewaschen, um anschließend für 10 min bei -20°C mit Methanol fixiert zu werden. Nach der Fixierung wurden die Zellen abermals mit PBS in drei Schritten gewaschen. Die PFA-Fixierung erfolgte auf ähnliche Weise: die Zellen wurden mit PBS gewaschen (RT) und für 10 min bei RT mit PFA-Lösung fixiert. Auch hier folgten drei PBS Waschschrte nach vollständiger Fixierung. Die Zellen können sowohl nach PFA-, als auch nach Methanol-Fixierung für 2-4 Wochen in PBS bei +4°C gelagert werden. Anschließend mussten die unspezifischen Bindungsstellen in einem Blockierungsschritt abgeblockt werden. Dazu versetzte man die Zellen mit PBS-BSA 1 % für 15 min bei RT. Die PFA-fixierten Zellen sollten während dieses Blockierungsschrittes zusätzlich noch permeabilisiert werden, was bei Methanol-fixierten Zellen schon während des Fixierungsschrittes passiert. Dafür wurde der PFA-Blockierungslösung (vor der 15 minütigen Inkubation) zusätzlich noch 1% Triton-X 100 zugesetzt. Anschließend wurde mit einem entsprechenden Primärantikörper in der optimalen Arbeitsverdünnung in PBS-BSA 1 % für 1 h bei RT inkubiert, bevor ein dreimaliger PBS Waschschrte und die Inkubation (1 h, RT, lichtgeschützt) mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper erfolgte. Bei Färbungen gegen PolySia wurde z.T. anstelle des Primärantikörpers  $\alpha$ -PolySia-mAK eine biotinylierte Variante des inaktivierten Enzyms Endoneuraminidase N (EndoN) eingesetzt. Das Enzym (3.2.3) wurde hierbei im aktiven Zentrum durch zwei induzierte Punktmutationen inaktiviert (Arg 596 Ala/Arg 647 Ala), so dass dieses die PolySia-Kette zwar noch binden, jedoch nicht mehr schneiden kann [Schwarzer *et al.* 2009]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das inaktivierte Enzym zusätzlich noch biotinyliert (Protokoll: *Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit*, Thermo Fisher). Das sekundäre, signalgebende Agens war in diesem Fall ein FITC-konjugiertes Streptavidin, welches mit den Biotin-Molekülen auf der Oberfläche des gebundenen Enzyms interagiert.

Zusätzlich zu dem Sekundärantikörper bzw. der Streptavidin-Lösung wurden die Zellen zeitgleich mit dem Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) versetzt,

der in der Lage ist, mit DNA zu interkalieren, und somit die Möglichkeit gibt, den Zellkern anzufärben. Nach einem PBS- und einem zweimaligen H<sub>2</sub>O-Schritt wurden die Deckgläschen permanent eingedeckt (3.5.2).

### **3.6 Proteinanalytische Methoden**

#### **3.6.1 Gewebeaufarbeitung**

##### Lysepuffer

50 mM Tris/HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

5 mM EDTA

1% Triton X-100

0,5% Natrium-Deoxycholat

2 mM PMSF

1 mM Aprotinin

1 mM Leupeptin

Das in dieser Arbeit verwendete Gewebe wurde mittels Dispergier-Aggregat (Kinematica, Luzern, Schweiz) und Ultraschallstab („Sonifier“, Branson, Danbury, USA) homogenisiert und mit Lysepuffer versetzt. Adhärente Zellen wurden direkt mit eiskaltem Lysepuffer von der Zellkulturschale abgelöst und ebenfalls mit Ultraschall behandelt. Die Lyse verlief über Nacht bei 4°C. Zell- und Gewebebestandteile wurden abzentrifugiert (20160 × g / 60 min / 4°C) und die so gewonnenen Lysate weiter verwendet.

#### **3.6.2 Proteinbestimmung**

BCA-Reagenz A: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat in  
0,1 M NaOH gelöst

BCA-Reagenz B: 4% Kupfersulfat

Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe des *BCA assay kit* (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts) Für die Standardreihe wurde BSA in den Konzentrationen 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 und 25 µg/mL in Lysepuffer eingesetzt. Die Gebrauchslösung wurde im Verhältnis 1:50 Reagenz A zu Reagenz B hergestellt und die zu messenden Proben in den Verdünnungen 1:10 und 1:100 in Lysepuffer angesetzt. Je 25 µL der Standards sowie der Proben wurden mit 200 µL der Gebrauchslösung in Doppelbestimmung bzw. bei Proben in Dreifachbestimmung in eine 96well Platte pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37°C im Brutschrank. Zur Auswertung wurde die Absorption mittels Micro-Plate Reader (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt.

### **3.6.3 Affinitätsaufreinigung**

#### **3.6.3.1 Vorbereitung und kovalente Kopplung**

Eine Immunpräzipitation ist eine biochemische Methode, mit der ein bestimmtes Antigen aus dem Gemisch einer Vielzahl von Antigenen einer Lösung isoliert werden kann. Dieses Antigen kann ein Protein oder ein Peptid sein. In der Regel ist ein Antikörper dabei *in vitro* an ein festes Substrat gekoppelt und bindet über seine Affinität ein spezifisches Antigen in einer Lösung. In unserem Fall wurde ein inaktiviertes Enzym als bindendes Agens benutzt. Aus diesem Grund wird das Verfahren hier Affinitätsaufreinigung genannt.

Das Enzym Endoneuraminidase N (3.2.3) wurde im aktiven Zentrum durch zwei induzierte Punktmutationen inaktiviert (Arg 596 Ala/Arg 647 Ala), so dass das Enzym die PolySia-Kette zwar noch binden, jedoch nicht mehr schneiden kann [Schwarzer *et al.* 2009].

Die Affinitätsaufreinigung wurde mit Hilfe magnetischer Dynabeads® (Invitrogen, Karlsbad, USA) [Konzentration: 30 mg/mL] durchgeführt, die werkseitig Tosyl-aktiviert wurden und dadurch eine kovalente Bindung von Dynabead und Enzym zulassen. Aufgrund der magnetischen Eigenschaft der Dynabeads® konnten diese nach Ligandenbindung leicht mit einem Magneten isoliert werden.

Eine Menge von 335  $\mu\text{L}$  (entspricht ca. 10 mg/mL) der im Originalgefäß resuspendierten Dynabeads® (künftig teilweise nur *beads* genannt) wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und durch einen Magneten von der flüssigen Phase getrennt. Anschließend wusch man die *beads* mit 500  $\mu\text{L}$  Na-Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7.4). Generell verliefen Waschvorgänge beim Umgang mit Dynabeads® immer auf die gleiche Weise: man hielt die Suspension an einem Magneten und erlaubte den magnetischen Dynabeads® sich komplett an der Gefäßwandung zu vereinigen. Anschließend konnte der Überstand abgenommen werden und die *beads* in einer neuen Lösung resuspendiert werden. Für den Kopplungsvorgang wurden 200  $\mu\text{g}$  des Liganden zusammen mit Na-Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7.4) so gemischt, dass ein Endvolumen von 150  $\mu\text{L}$  zu den Dynabeads gegeben werden konnte. Anschließend wurden 100  $\mu\text{L}$  des Kopplungspuffers (3 M Ammoniumsulfat-Lösung) zu dem Gemisch gegeben und dieses für 12-18 h bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit reagierten die primären Aminogruppen der Enzyme mit Tosyl-funktionalisierten Gruppen der Dynabeads®. In einer  $\text{S}_{\text{N}}^2$ -Reaktion kam es zur kovalenten Kopplung der inaktivierten Enzyme an die *beads* unter Abspaltung des Tosylrestes und Bildung eines sekundären Amins.

Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand mit Hilfe eines Magneten abgenommen und die Enzym-gekoppelten-Dynabeads® mit 1 mL PBS-BSA 0,5 % versetzt und eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde der Komplex zweimal mit einem PBS-BSA Puffer (0,1% BSA) gewaschen und die fertigen Enzym-Dynabeads in 480  $\mu\text{L}$  PBS-BSA 0,1% aufgenommen. Finale Konzentration: 20 mg/mL

### **3.6.3.2 Ligandenbindung**

#### 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

### Elutionspuffer

100 mM Triethylamin

150 mM NaCl

Vor Gebrauch wurden die EndoN-*beads* resuspendiert, mit 500  $\mu$ L Waschpuffer 2 gewaschen und je nach Probenmenge in der Konzentration 1 -10 mg/ml pro mg Gewebe zu den frisch hergestellten Lysaten gegeben. Die Antigenbindung erfolgte über Nacht bei 4°C unter ständiger Rotation. Mit Hilfe des Magneten wurde der Überstand abgenommen, der *bead*-Liganden-Komplex“ 1  $\times$  mit Waschpuffer 1 und 2  $\times$  mit Waschpuffer 2 gewaschen. Nach den Waschschrritten erfolgte die abschließende Elution, bei der die Liganden wieder von den *beads* getrennt wurden. Der Elutionspuffer hatte dabei einen basischen Charakter, der die reversible Bindung von Enzym und Substrat löste. Das gewonnene Eluat wurde mittels flüssigem Stickstoff eingefroren und in der Speedvac (Jouan RC 10.22; Thermo Fischer) trocken gezogen. Die *beads* konnten in Waschpuffer 2 aufgrund der kovalenten Kopplung bis zu 20  $\times$  wieder verwendet werden.

## **3.6.4 Enzymverdau**

### **3.6.4.1 PolySia Abspaltung mit Endoneuraminidase N (EndoN)**

Als Negativkontrolle versetzte man die Eluate mit der spezifischen aktiven Sialidase EndoN, die  $\alpha$ 2,8-verknüpfte *N*-Acetylneuraminsäuren von Polysialinsäuren bis zur Bildung von Restfragmenten von maximal sieben Untereinheiten abdaut, so dass der mAk 735 (3.2.2.1), der mindestens acht aufeinanderfolgende *N*-Acetylneuraminsäure-Einheiten zur Erkennung benötigt , nicht mehr binden kann. Die EndoN wird 1:1000 in Na-Phosphatpuffer 50 mM pH 7,5 verdünnt und die Probe in 25  $\mu$ L der Verdünnung aufgenommen.

### 3.6.4.2 Freisetzung von N-Glykanen mit PNGase F

Um N-Glykane freizusetzen, wurden die Proben mit dem Enzym N-Glycosidase F (PNGaseF) der Firma NEB behandelt. Im Lieferumfang waren sowohl ein Glykoprotein-Denaturierungspuffer (5% SDS, 400 mM DTT), ein NP-40-Puffer (10% NP40; hierbei handelt es sich um ein nichtionisches Tensid aus der Gruppe der Octylphenoethoxylate) sowie ein PNGaseF-Reaktions-Puffer (500 mM Na-Phosphat, pH 7.5) enthalten. Für den eigentlichen Verdauansatz versetzte man die in der Speedvac getrockneten Proben mit 16  $\mu$ L Glykoprotein-Denaturierungspuffer und kochte diesen für 10 min bei 100°C. Zur abgekühlten Probe wurde 1,5  $\mu$ L 10%iger NP-40 Puffer, 2  $\mu$ L PNGaseF-Puffer sowie 5 *units* des Enzyms PNGase F gegeben. Der Verdau erfolgte 1 h bei 37°C.

### 3.6.5 SDS-Gelelektrophorese

Das Prinzip aller elektrophoretischen Trennmethode für Proteine beruht auf der Wanderung in einem elektrischen Feld. Als Trägermaterial für die Gelelektrophorese wurde Polyacrylamid in den Konzentrationen 10 % (Trenngel) und 3 % (Sammelgel) verwendet. Große Moleküle werden im Acrylamidnetzwerk stärker retardiert als kleine, wodurch die größenabhängige Trennung gewährleistet werden kann. Proteine erhalten durch Zusatz des negativen Detergenzes SDS alle die gleiche negative Ladung und wandern im elektrischen Feld zur Anode.

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

Zur eindimensionalen Auftrennung von Proteinen wurde ein diskontinuierliches Gelsystem nach Lämmli verwendet [Laemmli 1970]. Die Gelelektrophorese erfolgte mit Hilfe des Bio-Rad (München, Deutschland) „Mini-Protean“ Elektrophorese-Systems. Für zwei Gele wurden 2,9 mL Acrylamidlösung, 3 mL Trenngelpuffer, 6 mL Aqua dest. und 120 µL SDS-Lösung gemischt und für ca. 2 min im Ultraschallbad entgast. Anschließend wurden 1/100 Volumen der frisch angesetzten APS-Lösung sowie 1/1000 Volumen TEMED zugefügt, unter Schwenken gemischt, sofort zwischen die eingespannten Glasplatten gegossen und mit Aqua dest. überschichtet. Diese Überschichtung wurde nach Polymerisation des Trenngels entfernt, das Sammelgel (650 µL Acrylamidlösung, 1,25 mL Sammelgelpuffer, 3 mL Aqua dest, 1/100 Volumen der frisch angesetzten APS-Lösung sowie 1/1000 Volumen TEMED) eingegossen und die Trennkämme eingesetzt.

### **3.6.6 Western Blot**

#### Transferpuffer

39 mM Glycin

48 mM Tris

20 % (v/v) Methanol

Unmittelbar nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der getrennten Proteine auf eine proteinbindende Membran. Für die Wahl des Membranmaterials stehen sowohl Nitrocellulose (NC) als auch Polyvinylidendifluorid (PVDF) zur Verfügung. PVDF besitzt eine sehr hohe Proteinbindekapazität, eine hohe Reißfestigkeit und auch ein gutes Signal/Hintergrund-Verhältnis bei Verwendung von Chemilumineszenz-Detektionssystemen. Der Transfer erfolgt senkrecht zur Trennrichtung, damit das Muster der getrennten Proteine auf der Membran genau dem Trennmuster des Gels entspricht. Die Proteine werden durch Anlegen einer Spannung aus dem Gel auf die Membran überführt.

Zur Durchführung des elektrophoretischen Transfers gibt es mit dem Wet – oder Tank Blot und dem Semi-Dry Blot zwei Verfahren, die gleichberechtigt nebeneinander existieren. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ausschließlich das Semi-Dry Verfahren angewandt und der Blot erfolgte auf eine PVDF Membran.

Vor Verwendung der PVDF Membran wurde diese in 100% Methanol und anschließend in Transferpuffer geschwenkt. Die Blotapparatur, bestehend aus zwei horizontalen, parallel liegenden Kohlenstoffelektroden, wurde ebenfalls mit Transferpuffer äquilibriert. Im Semi Dry Verfahren werden von der Anode zur Kathode folgende Bestandteile gestapelt: *Whatman*-Filterpapier, PVDF-Membran, SDS-Gel, *Whatman*-Filterpapier. Die einzelnen Lagen wurden auf die gleiche Größe zugeschnitten, in Transferpuffer getränkt und luftblasenfrei übereinander geschichtet.

Blotprogramm: 1,5 h bei 1 mA/cm<sup>2</sup> Blotpapier.

### **3.6.7 Immunfärbung und Entwicklung von Blots**

#### PBS-T Puffer

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O

0,25 % Tween-20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)

#### Im Chemilumineszenz-Kit enthaltene Lösungen:

Teillösung 1: Luminol / Verstärker-Lösung

Teillösung 2: stabiler Peroxid-Puffer

Alle nachfolgend beschriebenen Wasch- bzw. Inkubationsschritte erfolgten unter leichtem Schütteln. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran direkt im Anschluss an den Blotvorgang in Blockpuffer (Roti<sup>®</sup>-Block) überführt und über Nacht bei 4°C geblockt. Es folgte ein dreimaliger

Waschschritt mit Roti<sup>®</sup>-Block und die anschließende zweistündige Inkubation bei RT mit dem in Blockpuffer verdünnten Primärantikörper (3.2.2.1). Anschließend wurde die Membran erneut mit Roti<sup>®</sup>-Block gewaschen (3 x 10 Min), bevor der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper (3.2.2.2) in der Arbeitsverdünnung für eine weitere Stunde zugegeben wurde. Abschließend wurde der Blot 3 x 10 min mit Roti<sup>®</sup>-Block und 2 x 10 min mit PBS-T gewaschen. Die Chemiluminescence-Lösung (Thermo Fisher/Pierce) wurde frisch aus den Teillösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 hergestellt und die Membran für 5 min in dieser Lösung inkubiert. Nachfolgende Arbeitsschritte sind unter Rotlicht im Fotolabor durchzuführen. Nach dem Inkubationsschritt mit dem Chemiluminescence-Reagenz wurde die Membran sofort auf einen entsprechenden Detektions-Film (GE Healthcare) gelegt, dieser mit dem Blot je nach Bedarf für 10 s, 30 s, 1 min, 2 min oder 1 h belichtet und anschließend entwickelt.

### 3.6.8 Peptidmassenfingerabdruck

Die Identifizierung unbekannter Proteine erfolgte massenspektrometrisch mittels „*peptide mass fingerprint*“.

Hierfür wurde Lungengewebe lysiert, die polysialylierten Proteine mittels Affinitätsaufreinigung (3.6.3) isoliert und gelelektrophoretisch mit Hilfe eines 7,5%igen Fertiggels (Bio-Rad) aufgetrennt. Gelstücke im Bereich des Signals vom Western Blot gegen PolySia wurden ausgeschnitten, die jeweiligen Proteine einer Reduktion sowie einer Carboxymethylierung unterzogen, mit Trypsin verdaut und abschließend die Peptide aus dem Gel extrahiert. Als Anleitung hierfür diente das *In-Gel Digestion Protocol for Low Protein Amounts* (Promega, Mannheim, Deutschland). Extrahierte Peptide wurden über eine C18-Säule (PepMap, 3 µm, 75 µm x 100 mm; Dionex, Idstein, Deutschland) und einem nanoLC System (Dionex) mit einem linearen Gradienten (5 % Acetonitril / 0,1 % Ameisensäure bis hin zu 60 % Acetonitril / 0,1 % Ameisensäure; Flußrate: 0,4 mL/min; Gradientenlaufzeit: 45 min), getrennt. Die separierten Peptide wurden anschließend direkt auf ein *matrix-assisted laser desorption/ionisation*

*time-of-flight* (MALDI-TOF)-Stahltarget (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) aufgegeben und 1:2 mit einer 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)-Matrix (1,5 mg DHB / mL 1 % Phosphorsäure, 50 % Acetonitril) vermischt.

Durch den tryptischen Verdau der polysialylierten Proteine entstand ein charakteristisches Peptidmuster („Fingerabdruck“), welches eine genaue Identifikation über die massenspektrometrische Analyse mit anschließendem, organismusspezifischem Datenbankabgleich erlaubte. Dieses Peptidmuster wurde mittels eines MALDI-TOF Massenspektrometers (MS) (Ultraflex I TOF/TOF MS; Bruker Daltonics) erzielt. Die Messungen wurden im positiven Reflektormodus durchgeführt, unter Verwendung der FlexControl 2.4- sowie der FlexAnalysis 3.0 software (Bruker Daltonics). Die Kalibrierung erfolgte mit einem Peptid (Kalibrierungs)-Standard (~1000 - 4000 Da). Die Auswertung des Peptidmusters erfolgte über das Softwareprogramm Mascot [Perkins *et al.* 1999] und die Datenbank IPI-human (<http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html>).

### 3.7 HPLC

#### **Kettenlängenbestimmung**

Mit dieser Methode können  $\alpha$ -Ketocarbonsäuren mit 1,2-Diamino-4,5-Methylendioxybenzol (DMB) fluoreszenzmarkiert und anschließend mittels HPLC getrennt und detektiert werden. Im ersten Schritt wurden Oligo- und PolySia Ketten unter sauren Bedingungen vom Glykokonjugat abgespalten. Inkubierte man diese mit DMB wurde das reduzierende Ende markiert. Die resultierende DMB-markierten Oligo- und PolySia-Derivate wurde anschließend nach Anzahl der Sialinsäuren mittels Anionenaustauscherchromatographie aufgetrennt, womit nicht nur die Anwesenheit von Oligo- und PolySia nachgewiesen werden konnte, sondern auch eine Aussage über die Länge der Ketten möglich war. Unvermeidlich war bei dieser Methode allerdings die partielle hydrolytische Spaltung interner Sialyl-Verbindungen, die aufgrund der sauren Bedingungen auftrat.

DMB-Puffer

18 mM Na-Hydrogensulfit  
1 M Mercaptoethanol  
40 mM TFA

DMB-Reagenz

1,22 mg DMB in 1 mL DMB-Puffer

Das Gewebe wurde wie beschrieben aufgearbeitet und lysiert (3.6.1). Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt (8°C, 14400 × g, 10 min). Der Überstand wurde einer Affinitätsaufreinigung mit inaktivierten EndoN-*beads* (3.6.3) unterzogen, um ausschließlich polysialylierte Proteine aus dem Lysat zu isolieren. Das daraus resultierende Eluat wurde in der Speedvac trocken gezogen. Frisch angesetzter DMB Puffer wurde in gleichen Teilen mit Tris/HCl (50 mM) gemischt und die getrocknete Probe darin aufgenommen. Die Derivatisierung erfolgte über Nacht bei 11°C.

Die Reaktion wurde durch NaOH-Zugabe gestoppt, die Lösung für 1 h bei RT stehen gelassen, anschließend zentrifugiert (8°C, 14400 × g, 10 min) und der Überstand weiterverwendet. Die Aufgabe auf die HPLC-Säule [DNA Pak 100 (Dionex)] erfolgte mittels eines *Auto-Samplers* (Spark Holland, Emmen, Niederlande).

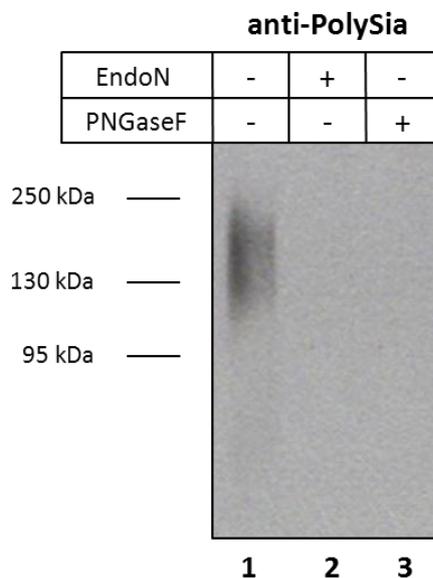
Gemessen wurde bei einer Anregungswellenlänge von 372 nm und einer Emissionswellenlänge von 456 nm. Als Elutionsmittel diente Aqua dest. sowie 1 M NaNO<sub>3</sub> bei einer Flussrate von 1 mL/min und folgendem Gradienten: T<sub>0 min</sub> = 0 % (v/v) NaNO<sub>3</sub>, T<sub>5 min</sub> = 1 % (v/v) NaNO<sub>3</sub>, T<sub>15 min</sub> = 10 % (v/v) NaNO<sub>3</sub>, T<sub>60 min</sub> = 50 % (v/v) NaNO<sub>3</sub>. Gewaschen wurde die Säule mit 100 % (v/v) NaNO<sub>3</sub>. Als Standard wurde 10 µg/mL Colominsäure-Lösung 1:400 mit dem DMB-Tris/HCl Gemisch (v/v) verdünnt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Polysialylierung in humanem Lungengewebe

#### 4.1.1 PolySia-Nachweis in Gewebehomogenaten

Lackie, Zuber und Roth stießen während ihrer Forschungsarbeiten im Jahr 1994 auf polysialyliertes NCAM in Abkömmlingen endo – und mesodermaler Keimblätter während der Entwicklung [Lackie *et al.* 1994]. Um der Fragestellung nach dem eventuellen PolySia-Vorkommen in der ausgereiften Lunge nachzugehen, wurden in unserem Labor bereits im Vorfeld (Sandra Müller, cand. med., AG Geyer) Untersuchungen an gesundem sowie erkranktem Lungengewebe vorgenommen. Um zu gewährleisten, dass alle Untersuchungen von identischen Proteinmengen ausgehen, wurden alle Proben stets durch eine Proteinbestimmung nach der BCA-Methode quantifiziert. In einem ersten Schritt wurde Donor-Lungengewebe aufgearbeitet und lysiert.



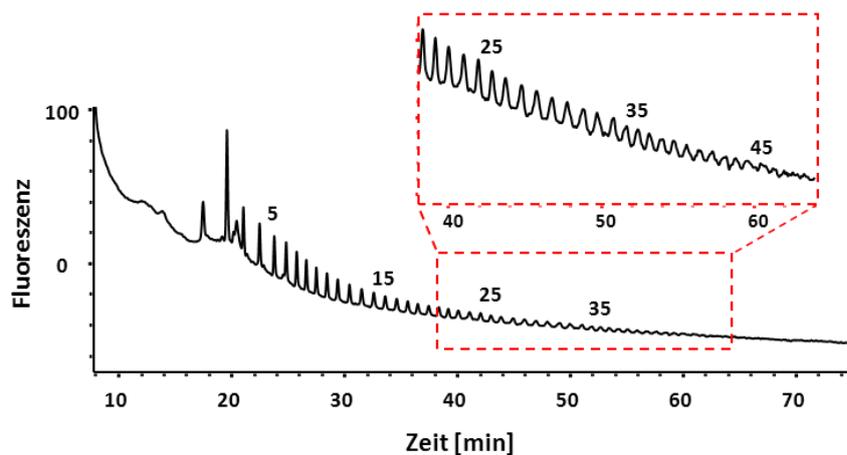
**Abbildung 8** Western Blot-Analyse polysialylierter Proteine in humanem Lungengewebe

Zur Western Blot-Analyse wurde die Probe sowohl unbehandelt (Spur 1) als auch nach enzymatischem Verdau mit EndoN (Spur 2) bzw. PNGaseF (Spur 3) aufgetragen. Die Immunfärbung erfolgte durch einen monoklonalen anti-PolySia-Antikörper (mAk) (3.2.2.1). Die apparenten Molekulargewichte sind in kilo Dalton (kDa) angegeben. Pro Spur wurden 10 µg Gesamtprotein aus Gewebehomogenat aufgetragen. Das Ergebnis dieser Analyse wurde durch sechs biologische Replikate verifiziert.

Die so gewonnenen Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse untersucht. Abbildung 8 zeigt einen Western Blot aus Direktlysaten, der mit einem spezifischen, monoklonalen Antikörper (mAk) gegen PolySia (3.2.2.1) angefärbt wurde. Eine Negativkontrolle wurde bei PolySia-Analysen im Rahmen dieser Dissertation stets durch einen Verdau mit dem Enzym EndoN (3.6.4.1) durchgeführt.

Sichtbar wurde in Spur 1 der typisch-diffuse PolySia-Schmier, der sich über einen Molekulargewichtsbereich von 100-250 kDa zieht. Da in Spur 2, nach dem Verdau mit EndoN, keine PolySia detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass es sich bei dem Signal in Spur 1 um ein spezifisches Signal handelte, womit der Beweis für das Vorkommen von PolySia in adultem Lungengewebe erbracht ist. In einem weiteren Schritt sollte überprüft werden, ob die Polysialinsäureketten über O- oder N-Glykane mit dem bislang noch unbekanntem Trägerprotein verknüpft sind. Dazu diente ein Enzymverdau mit PNGaseF, welche N-glykosidisch gebundene Seitenketten abspaltet. Da in Spur 3 (Abbildung 8) nach Verdau mit PNGaseF kein PolySia-Signal detektiert werden konnte, wohl aber in der unverdauten Probe, konnte somit die Aussage getroffen werden, dass die Polysialylierung des Trägerproteins in der adulten Lungen an N-Glykanen erfolgt.

In vielen Studien wurde mittlerweile darüber berichtet, dass die biologische Funktion von PolySia von der Länge der Polysialinsäure-Kette bestimmt wird. Aufgrund dessen wurde der Polymerisationsgrad in Donor-Lungengewebe (3.1), nach Bindung an inaktivierte EndoN (3.6.3) ermittelt. Zur Kettenlängenbestimmung wurde eine Methode angewandt, die sich milde DMB-Derivatisierung nennt [Inoue und Inoue 2001; Inoue *et al.* 2001]. Die PolySia Ketten wurden durch saure Hydrolyse vom N-Glykan abgespalten und mittels DMB am reduzierenden Ende derivatisiert, um anschließend chromatographisch aufgetrennt und fluorometrisch detektiert werden zu können. Die erhaltenen Chromatogramme zeigten PolySia-Ketten mit mehr als 40 Sialinsäure-Untereinheiten (Abbildung 9). Zur Verifizierung wurden die chromatographischen Analysen je dreifach repliziert.

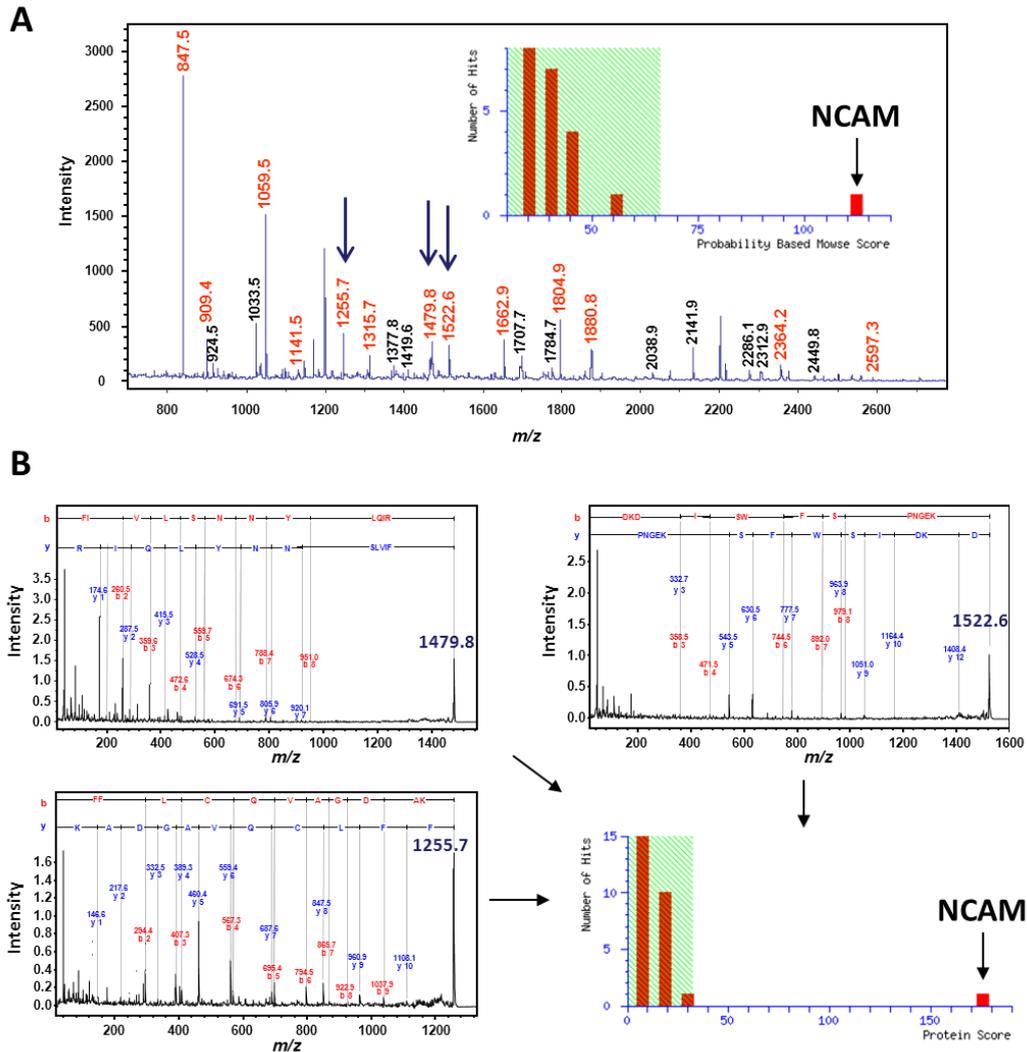


**Abbildung 9** Kettenlängenbestimmung von PolySia mittels milder DMB-HPLC

Die PolySia-Ketten aus Lungengewebehomogenaten wurden nach Affinitätsaufreinigung mit Hilfe inaktivierter EndoN (3.6.3) hydrolytisch gespalten, mit Hilfe von DMB am reduzierenden Ende fluoreszenzmarkiert, anschließend auf einer Anionenaustauschersäule, in Abhängigkeit der Kettenlänge, aufgetrennt und detektiert. Die Anzahl der Sialinsäure-Untereinheiten wird für ausgewählte Peaks oberhalb des entsprechenden Signals angezeigt. Das Ergebnis dieser Analyse wurde durch drei biologische Replikate verifiziert.

#### 4.1.2 Identifizierung des PolySia Trägers

Die Identifizierung des Trägerproteins sollte massenspektrometrisch mittels *peptide mass fingerprint* erfolgen. Diesem Schritt vorangeschaltet wurde die bereits erwähnte Affinitätsaufreinigung des Proteins mittels inaktivierter EndoN (3.6.3). Für den eigentlichen Glycoproteomics-Ansatz wurden die polysialylierten Proteine aus Lungenhomogenaten isoliert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden wie beschrieben (3.6.8) einer Reduktion sowie einer Carboxymethylierung unterzogen, mit Trypsin verdaut, die resultierenden Peptidfragmente durch eine weitere chromatographische Trennung mit Hilfe einer nano-LC aufgetrennt und abschließend mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Durch den tryptischen Verdau der polysialylierten Proteine entstand ein charakteristisches Peptidmuster („Fingerabdruck“), welches eine genaue Identifikation über die massenspektrometrische Analyse mit anschließendem, organismusspezifischem Datenbankabgleich erlaubte.

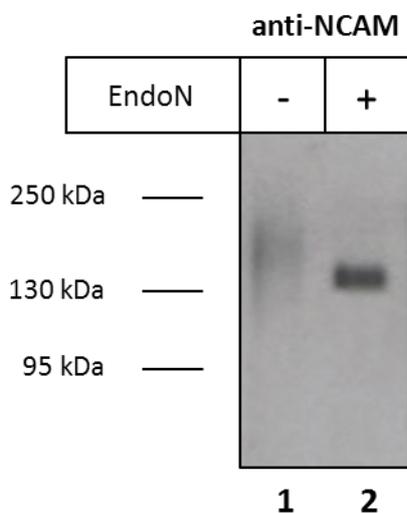


**Abbildung 10** MALDI-TOF-MS Analyse zur Identifizierung polysialylierter Proteine aus Lungenhomogenaten

Nach Gewinnung der polysialylierten Proteine aus Lungenhomogenat durch Affinitätsaufreinigung mit inaktivierter EndoN wurden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt, nach in-Gel-Verdau extrahiert und nach chromatographischer Aufarbeitung massenspektrometrisch detektiert. **(A)** MALDI-TOF-MS Profilspektrum der tryptischen Peptide, wobei monoisotopische Massen, welche NCAM als PolySia-Träger zugeordnet werden konnten, rot markiert sind. Die Pfeile markieren die Massen, die für die MALDI-TOF MS/MS Experimente geliftet wurden. Das Ergebnis der Datenbanksuche (Mascot, IPI human) ist im *inset* abgebildet. **(B)** MALDI-TOF-MS/MS Experimente der Pseudomolekülen  $m/z$  1255.7, 1479.8 und 1522.6. NCAM-sequenzspezifische B-Fragmentationen sind in rot, entsprechende Y-Fragmentationen in blau dargestellt [Galuska *et al.* 2010]. Pfeile verweisen auf das Ergebnis der auf den Fragmentspektren basierenden Datenbanksuche (Mascot, IPI human). Pseudomolekül- und Fragmentationen wurden als Protonenaddukte ( $[M+H]^+$ ) registriert.

Abbildung 10 A zeigt ein Profilspektrum der tryptischen Peptide, welche im Massenbereich von  $m/z = 800 - 2600$  als Pseudomolekülonen ( $[M+H]^+$ ) detektiert wurden. Signale, deren monoisotopischen Massen rot markiert sind, konnten mittels Datenbanksuche Mascot (Abbildung 10 A, Inset) charakteristischen Peptiden von NCAM zugeordnet werden. Hierbei zeigte sich ein signifikantes Ergebnis der Mascot Suche, die über die organismusspezifische Datenbank IPI-Human erfolgte und zusätzlich mit der Datenbank SwissProt bestätigt werden konnte. Zur weiteren Verifizierung der Präsenz von NCAM erfolgten MALDI-TOF-MS/MS Experimente ausgewählter Pseudomolekülonen  $m/z$  1255.6, 1479.8 und 1522.7 (Abbildung 10 A [Pfeile], Abbildung 10 B). Die in den jeweiligen Fragmentspektren rot markierten B-Fragmentationen sowie blau markierten Y-Fragmentationen erlaubten als sequenzspezifische Signale die endgültige Identifizierung von NCAM.

Um das Ergebnis der MS-basierten Identifikation zu bestätigen, wurden mittels inaktivierter EndoN affinitätsaufgereinigte Proben auf NCAM bzw. PolySia-NCAM mittels Western Blot-Analyse (Abbildung 11) untersucht.

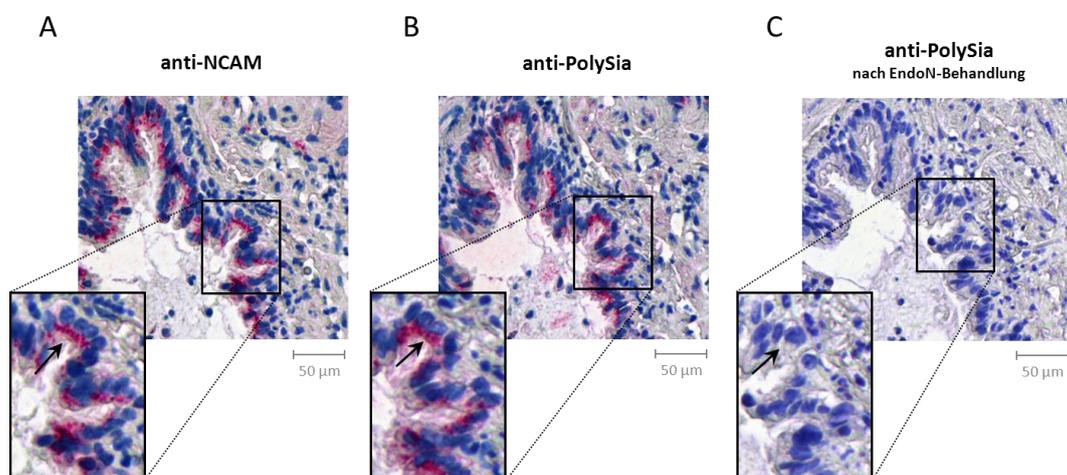


**Abbildung 11** Western Blot-Analyse zur Detektion von polySia-NCAM-140

PolySia-NCAM wurde aus Lungenhomogenat über Affinitätsaufreinigung gewonnen und mittels Western Blot-Analyse visualisiert. Der verwendete Antikörper ist ein anti-NCAM mAk aus der Maus (3.2.2). Dargestellt ist sowohl polysialyliertes (Spur 1), als auch de-polysialyliertes (Spur 2) NCAM nach EndoN-Verdau. Die apparenten Molekulargewichte sind in kDa angegeben. Aufgetragen wurde je  $10 \mu\text{g}$  Protein. Das Ergebnis dieser Analyse wurde durch fünf biologische Replikate verifiziert.

Der verwendete Antikörper war ein monoklonaler anti-NCAM Antikörper (2.2.2.1). Proben der Donor-Lungenlysate wurden jeweils unverdaut und nach einem Verdau mit EndoN aufgetragen. Spur 1 zeigt polysialyliertes NCAM, welches das typische PolySia-Signal im Bereich von 130 – ca. 180 kDa aufweist. In Spur 2 führte ein EndoN-Enzymverdau der PolySia-Kette zu einer scharfen NCAM Bande im Bereich von 140 kDa in Übereinstimmung mit der organismusspezifischen Datenbanksuche Mascot.

Zusätzlich zur Western Blot-Analyse wurde PolySia-NCAM auch mit Hilfe der Immunhistochemie in einer sogenannten Co-Lokalisationsstudie nachgewiesen. Dafür wurden serielle Lungenschnitte angefertigt, die im Abstand von 3-5  $\mu\text{m}$  zueinander lagen und von der AG Günther zur Verfügung gestellt wurden. Zwei aufeinanderfolgende Schnitte wurden jeweils mit einem anti-PolySia, sowie einem anti-NCAM Antikörper, unter Zuhilfenahme der Streptavidin-Biotin-Methode (3.5.1.3), angefärbt.



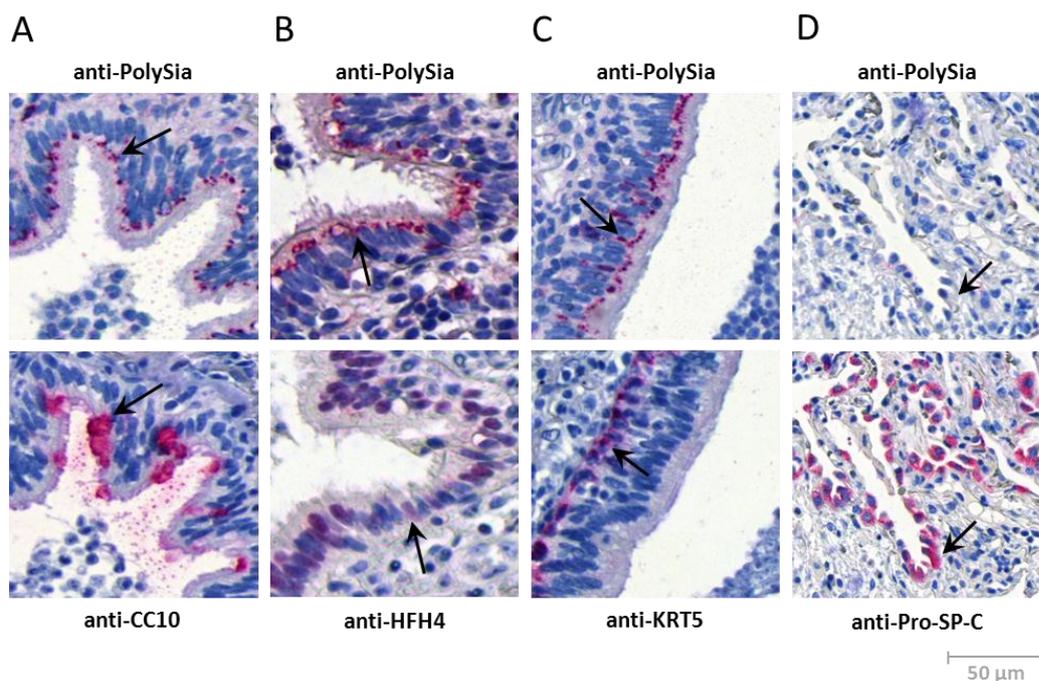
**Abbildung 12** Immunhistologischer Nachweis von PolySia-NCAM in seriellen Paraffinschnitten der humanen Lunge

Paraffin-eingebettete, seriell-erstellte humane Lungenschnitte wurden sowohl mit einem anti-NCAM mAk als auch mit einem anti-PolySia mAk unter Zuhilfenahme der Biotin-Streptavidin-Methode (3.5.1.3) angefärbt. Die Negativkontrolle wurde durch einen Enzymverdau mit EndoN angefertigt. Die Pfeile indizieren identische Areale in allen drei Schnittbildern. Maßstabsangabe = 50  $\mu\text{m}$

Abbildung 12 zeigt deutlich die Co-Lokalisation von PolySia und NCAM (Abbildung 12 A und B Pfeil→) in einem identischen Areal des humanen Bronchialepithels. Die positiven Signale sind als roter Farbniederschlag in den Bildern sichtbar. Zur Verifizierung wurde die PolySia vorher mit EndoN abgedaut, um ein spezifisches Signal bestätigen zu können (Abbildung 12 C).

#### 4.1.3 Lokalisation von PolySia-NCAM im humanen Bronchialepithel

Anschließend galt es zu klären, welcher Zelltyp in humanem Bronchialepithel sich als PolySia-NCAM positiv erweist. Hierfür wurden Antikörper gegen spezielle (Oberflächen-) Marker der verschiedenen Zelltypen in der Lunge eingesetzt (Tabelle: 3.2.2.1). Angewendet wurden Zellmarker, die zilierte Bronchialepithelzellen, Clara-Zellen, alveolare Epithelzellen vom Typ II und Basalzellen erkennen lassen konnten.

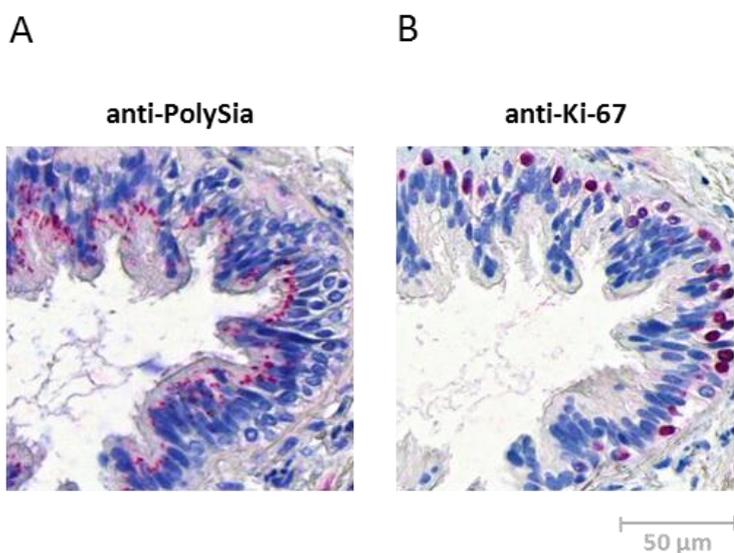


**Abbildung 13** Determination des PolySia-positiven Zelltyps in humanem Lungenepithel

Serielle Paraffinschnitte von humanen Lungen wurden je mit einem mAk anti-PolySia sowie einem AK angefärbt, der gegen einen spezifischen Zellmarker gerichtet war. Zum Einsatz kamen anti-CC10 mAk = ZM für Clara-Zellen, anti-HFH4 mAk = Zellmarker (ZM) für zilierte Bronchialepithelzellen, anti-KRT5 pAk = ZM für Basalzellen, anti-Pro-SP-C pAk = ZM für alveolare Epithelzellen vom Typ II. Der angegebene Messbalken entspricht 50 µm. Pfeile kennzeichnen je positive Bereiche.

Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, exprimieren neben den Clara-Zellen (Abbildung 13 A →) auch die zilierten Bronchialepithelzellen (Abbildung 13 B →) PolySia, was durch rote Anfärbung der Antigenstrukturen indiziert wurde. Das PolySia-Signal ist in diesem Fall im apikalen Bereich der Zelle zu finden und die HFH4-Färbung im jeweils zugehörigen Zellkern. Bei den Basalzellen (Abbildung 13 C →) und alveolaren Zellen (Abbildung 13 D →) konnte keine Überlappung der Signale festgestellt werden.

Zusätzlich zu den Lokalisationsstudien sollte mit Hilfe eines Proliferationsmarkers (3.2.2.1) überprüft werden, ob sich PolySia-positive Zellen im Zellteilungsstadium befinden. Abbildung 14 zeigt die rötlich angefärbten PolySia-Signale (Abbildung 14 A), wie gewohnt im apikalen Teil des Zellverbandes, wohingegen die Ki-67 Färbung (Abbildung 14 B) in den basalen Bereichen des Zellverbandes lokalisiert ist. Daher ist davon auszugehen, dass PolySia-exprimierende Zellen den Zellzyklus bereits durchlaufen haben und sich in der ruhenden G<sub>0</sub>-Phase befinden.



**Abbildung 14** Immunhistologische Darstellung von PolySia-exprimierenden und proliferierenden Zellen im Bronchialepithel

Serielle Paraffinschnitte aus humaner Lunge wurden mittels Biotin-Streptavidin-Methode sowohl gegen PolySia (**A**), als auch gegen das Protein Ki-67 (**B**) abgefärbt. Das Ergebnis dieser Analyse wurde durch drei biologische Replikate verifiziert. Größenbalken = 50 µM

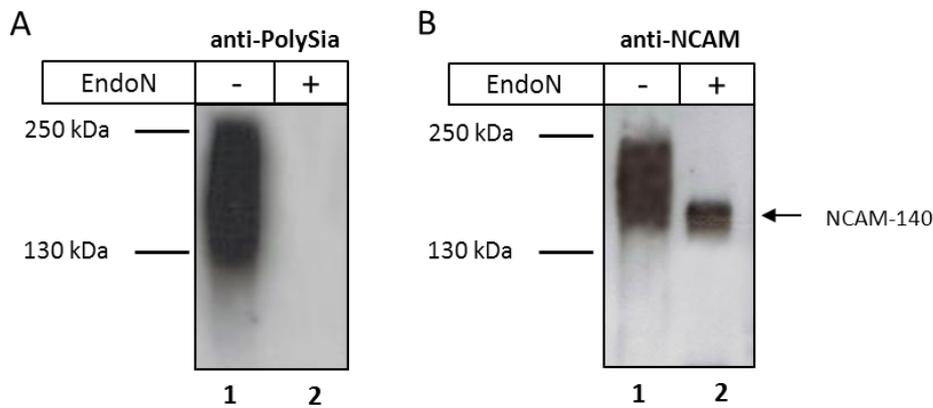
## 4.2 Polysialylierung im Zellkulturmodell

### 4.2.1 Charakterisierung des PolySia-Status unbehandelter A549-Zellen

Die Lungen-Adenokarzinoma-Zelllinie A549 ist ein etabliertes Zellkulturmodell, welches zur Untersuchung des Lungenepithels dient [Van Wetering *et al.* 1997; Muroya *et al.* 2012; Saffarzadeh *et al.* 2012]. Aus diesem Grunde wurde in einer ersten Analyse überprüft, ob es sich bei dieser Zelllinie, um eine PolySia-NCAM positive Zelllinie handelt, und weiterführend, ob die beiden Polysialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV, die für die Polysialinsäure-Synthese verantwortlich sind, in diesen Zellen exprimiert werden. Zunächst wurden hierfür aus Zelllysaten, sowie aus den Überständen der A549 Zellen die – möglicherweise vorhandenen – polysialylierten Proteine mittels Affinitätsaufreinigung mit inaktivierter EndoN isoliert und anschließend einer Western Blot-Analyse unterzogen. Abbildung 15 A bestätigt das Vorhandensein von PolySia in A549 Zellen. Der typische „Schmier“, zu dem polysialylierte Proteine führen, ist in Spur 1 im Bereich von ca. 130 kDa bis ca. 250 kDa zu detektieren. Nach EndoN-Behandlung (Spur 2) verschwand das Signal vollständig, was die Spezifität des PolySia Nachweises unter Beweis stellt. In Abbildung 15 B wurde identisches Material aufgetragen, hier allerdings erfolgte die Western Blot-Färbung mit dem NCAM-spezifischen Antikörper mAk 123C3 (3.2.2.1). In Spur 1 ist das Signal des polysialylierten NCAMs zu sehen, das sich über den Bereich erstreckt, welcher bereits im PolySia-Blot angefärbt werden konnte. Die nach EndoN-Behandlung deutlich erkennbare Bande zeigt ein vollständig de-polysialyliertes NCAM auf der Höhe 140 kDa, was Hinweis auf die Isoform NCAM-140 liefert.

Zusätzlich sollte mittels Immunfluoreszenzfärbung an fixierten A549 Zellen, das Vorhandensein von PolySia und NCAM bestätigt werden (Abbildung 16). Hierbei wurde der Zellkern mit Hilfe von DAPI blau gefärbt (A), die PolySia mittels inaktivierter, biotinylierter EndoN und FITC-konjugiertem Streptavidin grün (B) und NCAM durch ein Rhodamin-Konjugat rot (C). Durch Überlagerung der drei Einzelbilder in einem sogenannten *merge* (Abbildung 16 D) kann die

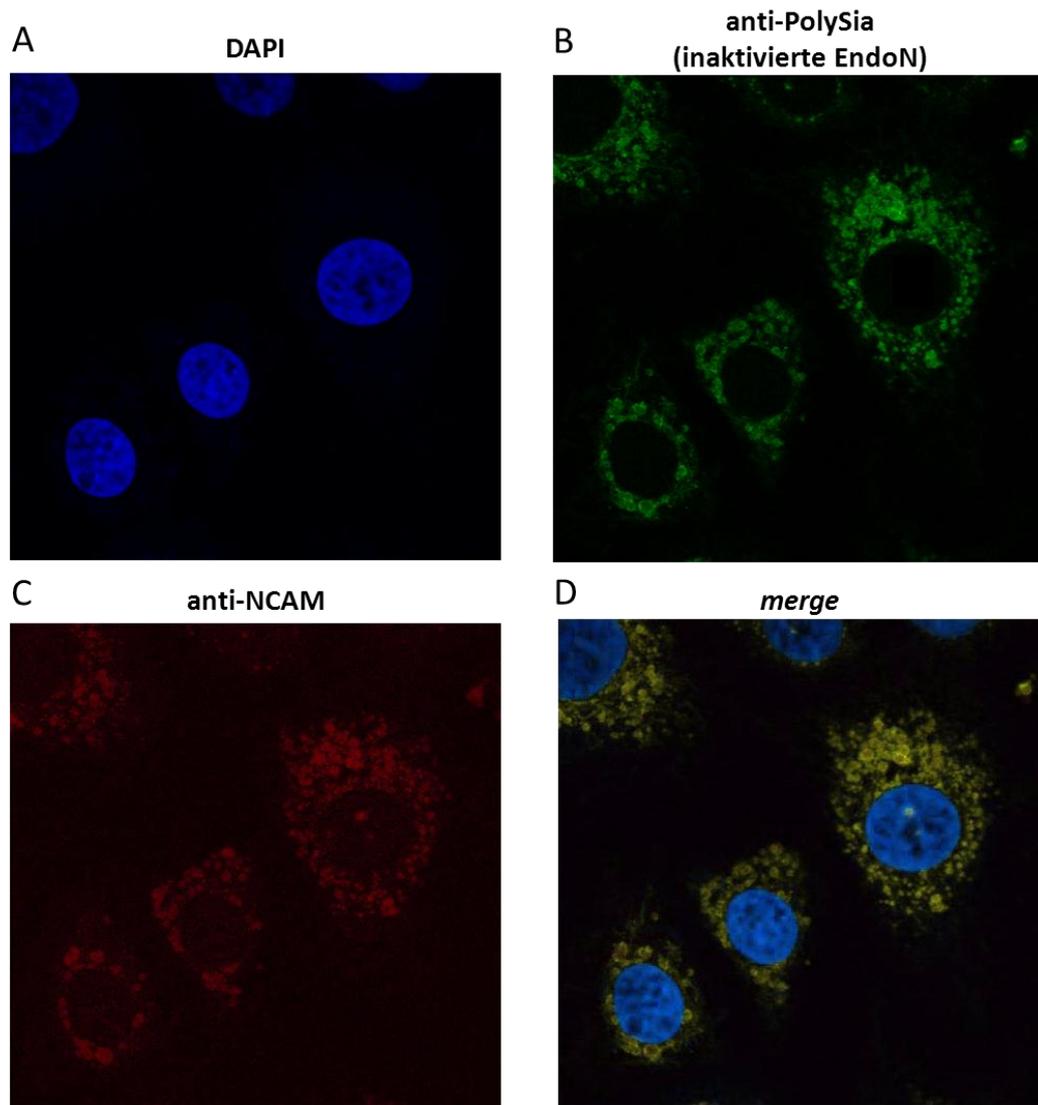
Co-Lokalisation von PolySia und NCAM durch die resultierende gelbliche Färbung nachgewiesen werden.



**Abbildung 15** PolySia-NCAM Nachweis in der A549-Lungenepithel-Zelllinie durch Western Blot-Analyse

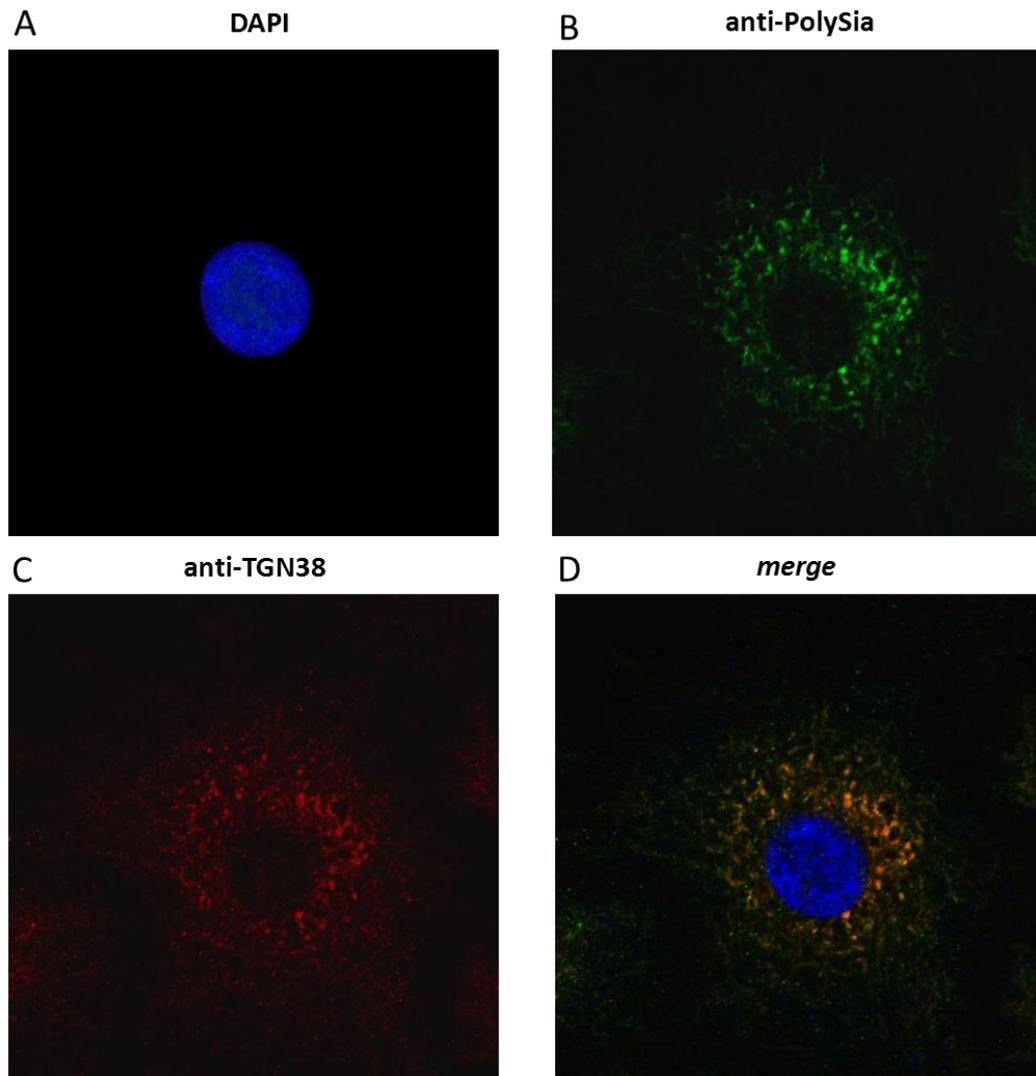
Zur Western Blot-Analyse von affinitätsaufgereinigten (mit inaktivierter EndoN) A549-Zelllysaten wurde sowohl eine Färbung mit anti-PolySia mAk (**A**) als auch mit anti-NCAM mAk (**B**) durchgeführt. Aufgetragen wurde pro Spur je 10 µg Protein, wobei in Spur 1 jeweils die unverdaute Probe und in Spur 2 jeweils die EndoN-verdaute Probe zu sehen ist. Apparente Molekulargewichte sind in kDa angegeben. Das Ergebnis dieser Analyse wurde durch drei biologische Replikate verifiziert.

Aufbauend hierauf sollte die Frage geklärt werden, in welchem Zellkompartiment die Polysialinsäure angesiedelt ist. Hierfür wurde ebenfalls die Immunfluoreszenzfärbung zu Hilfe genommen und zusätzlich zu dem anti-PolySia Antikörper ein Antikörper gegen ein Protein im Trans-Golgi Netzwerk verwendet (3.2.2.1). Auch hier zeigte die Überlagerung der Einzelbilder eine eindeutige Co-Lokalisation von PolySia und dem Trans-Golgi-Marker (Abbildung 17 D), was darauf schließen lässt, dass PolySia in der Zelle im Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert ist.



**Abbildung 16** PolySia-NCAM Nachweis mittels Immunfluoreszenz

A549-Zellen wurden mittels Methanol fixiert (3.5.3) und sowohl mit dem Zellkernmarker (A) 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) als auch einer Kombination aus einer (B) PolySia-bindenden inaktivierten, biotinylierten EndoN sowie einem FITC-konjugierten Streptavidin bzw. (C) einem anti-NCAM mAK angefärbt, der durch einen Rhodamin-markierten Zweitantikörper sichtbar gemacht wurden. Die Überlagerung der Einzelbilder (D) wurde als *merge* bezeichnet.

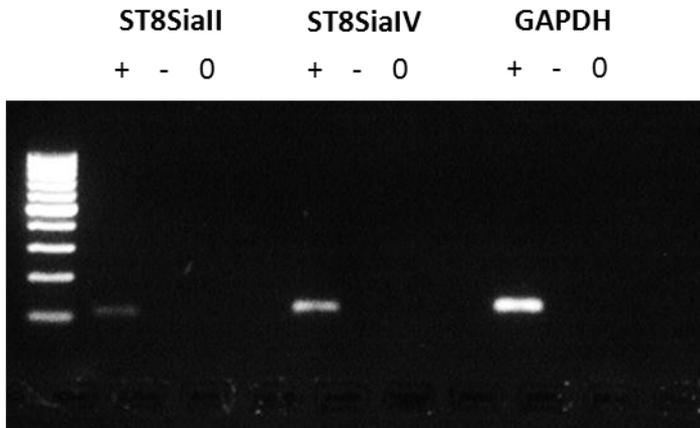


**Abbildung 17** Subzelluläre Lokalisation von PolySia-NCAM mittels Immunfluoreszenz

Kultivierte A549-Zellen wurden Methanol-fixiert (3.5.3) und die beiden primären Antikörper durch je einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper angefärbt. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (A) sichtbar gemacht. Hierbei wurden (B) ein anti-PolySia mAK mit einem FITC-Konjugat und (C) ein mAK gegen das Trans-Golgi-Protein 38 (TGN 38) mittels eines Rhodamin-Konjugats markiert. (D) In einem sogenannter *merge* erfolgte die Überlagerung der Einzelbilder.

Um zu untersuchen, welche Polysialyltransferase in die PolySia-Synthese speziell in A549 Zellen involviert ist, wurde im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Middendorff (Institut für Anatomie, Justus-Liebig Universität Giessen) eine mRNA Analyse durchgeführt. Mittels Reverse Transkriptase-*polymerase-chain-reaction* (RT-PCR), einer Agarose-Gelelektrophorese und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als internem Standard

konnte nachgewiesen werden, dass die Transferase ST8SiaIV offenbar die dominierende Rolle bei der PolySia-Synthese in A549 Zellen übernimmt. Die Bande der Polysialyltransferase ST8SiaII zeigte ein deutlich schwächeres Signal im Gegensatz zur erwähnten ST8SiaIV (Abbildung 18).



**Abbildung 18** Nachweis der Polysialyltransferasen in A549-Zellen durch RT-PCR

Gen-Transkripte der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV wurden durch RT-PCR analysiert und die amplifizierten Produkte durch eine Agarose-Gelelektrophorese (2 % Agarose) separiert. GAPDH diente hierbei als interner Standard. *Legende:* + = Probe; - = Negativkontrolle (eingesetzte Primer ohne Gentranskript); 0 = Leerwert (Probenpuffer).

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass PolySia-NCAM in A549 Zellen, hauptsächlich über die Polysialyltransferase ST8SiaIV synthetisiert wird und vorwiegend im Golgi-Apparat der Zelle vorliegt.

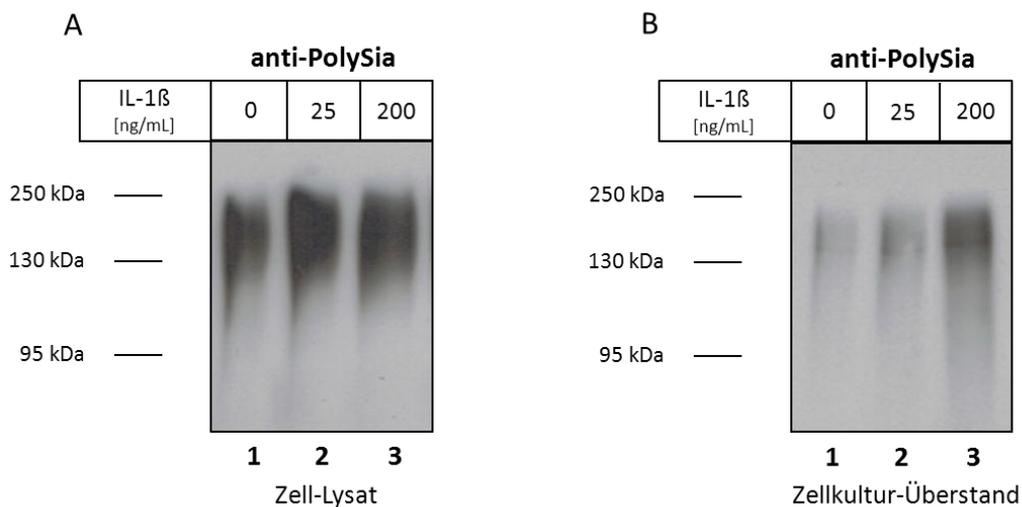
#### 4.2.2 Charakterisierung des Polysialylierungsstatus in A549-Zellen nach Stimulation

Da bronchiale Epithelzellen einen Rezeptor für das Zytokin Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) besitzen [Parker und Prince 2011], gleichzeitig über den *toll-like receptor 4* (TLR 4) für exogene Antigene zugänglich sind und somit zur sogenannten ersten Verteidigungslinie des respiratorischen Traktes gehören, wurden die Zellen sowohl mit dem pro-inflammatorischen IL-1 $\beta$  als auch mit Lipopolysaccharid (LPS) von Bakterien behandelt. Anschließend wurde der daraus resultierende

Einfluss auf den PolySia-Status bzw. die Lokalisation von PolySia innerhalb der Zelle überprüft.

### IL-1 $\beta$ -Stimulation

Nach Inkubation mit steigenden IL-1 $\beta$  Konzentrationen in dem A549-Zellkulturüberstand (3.4.3.1) wurden im Zell-Lysat und im Überstand vorhandene polysialylierte Proteine durch Bindung an inaktivierte EndoN gewonnen und mittels Western Blot analysiert. Stimulierte Zellen wurden zusätzlich mit Methanol fixiert und einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen, um eine mögliche Änderung in der Lokalisation von PolySia detektieren zu können.



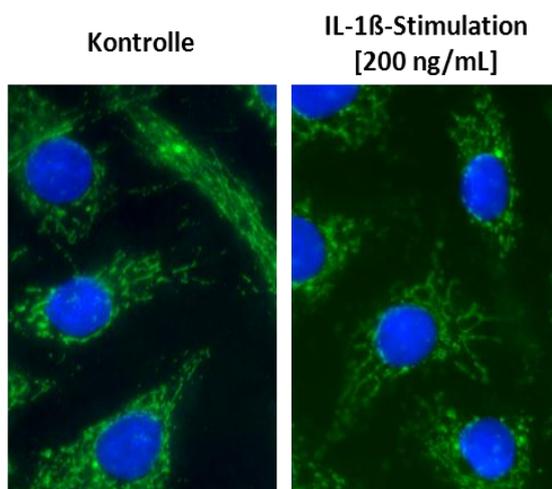
**Abbildung 19** Western Blot-Analyse nach IL-1 $\beta$ -Stimulation von A549-Zellen

Zur Untersuchung des PolySia-Gehalts in **(A)** Zell-Lysaten und **(B)** in Zellkulturüberständen nach Stimulation mit steigenden IL-1 $\beta$ -Konzentrationen wurde die Western Blot-Analyse eingesetzt. Polysialylierte Proteine wurden zuvor durch Bindung an inaktivierte EndoN aus dem Gesamtüberstand isoliert. Molekulargewichtsbereiche sind in kDa angegeben. Das Ergebnis dieser Analyse wurde durch drei biologische Replikate verifiziert.

Abbildung 19 A zeigt in allen drei Spuren PolySia-Signale aus Zell-Lysaten, welche sich typischerweise von 120 – ca. 240 kDa erstrecken. Dabei ist trotz steigenden IL-1 $\beta$ -Konzentrationen, keine deutliche Änderung in der Signalstärke und damit einhergehend der vorhandenen PolySia-Menge feststellbar. Im Gegensatz dazu wiesen die Überstände (Abbildung 19 B) steigende Mengen an polysialyliertem Protein, korrelierend mit zunehmender IL-1 $\beta$  Konzentration auf. In Spur 1 zeigt

sich ein PolySia-Signal im Bereich von 120 – ca. 200 kDa. Nach Behandlung mit 25 ng/mL IL-1 $\beta$  (Spur 2) verstärkt sich die PolySia-Signalintensität, während das Signal nach Behandlung mit 200 ng/mL IL-1 $\beta$  (Spur 3) schon im Bereich densitometrischer Sättigung liegt.

Die beiden Einzelbilder der Abbildung 20 von fixierten, unbehandelten sowie fixierten stimulierten (200 ng/mL IL-1 $\beta$ ) Zellen weisen ebenfalls ähnliche Mengen an PolySia auf, was somit die Western Blot-Analyse von A549-Zell-Lysaten bestätigte (Abbildung 19 A). Es konnte demnach davon ausgegangen werden, dass zunehmende Konzentrationen an IL-1 $\beta$  nicht zu erhöhten intrazellulären PolySia-Spiegeln – wohl aber zu verstärkter PolySia-NCAM-Sekretion in den Überstand führte.



**Abbildung 20** PolySia-Nachweis in stimulierten und unstimulierten methanol-fixierten A549-Zellen durch Immunfluoreszenz

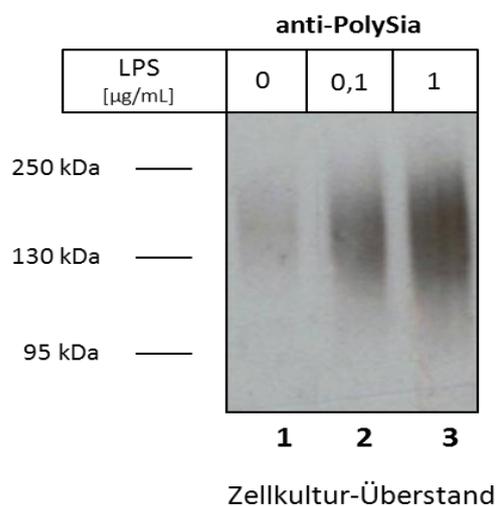
A549-Zellen erfuhren entweder eine Behandlung mit IL-1 $\beta$  oder verblieben unbehandelt, bevor die Zellen mittels Methanol fixiert und mit einem anti-PolySia AK sowie einem FITC-konjugiertem Zweitantikörper angefärbt wurden.

### **LPS-Stimulation**

In einem sich anschließenden Experiment wurde kontrolliert, ob LPS einen ähnlichen Effekt auslösen könnte. Hierfür wurden die A549-Zellen wiederum mit steigenden LPS-Konzentrationen behandelt und der Überstand zunächst auf

PolySia untersucht. Die Zell-Lysate wurden in Anlehnung an die IL-1 $\beta$ -Experimente ebenfalls auf die vorhandene PolySia-Menge (Western Blot-Analyse) und intrazelluläre Lokalisation (Immunfluoreszenzfärbung nach Methanol-Fixation) überprüft (Daten nicht gezeigt.). Die Analyse erbrachte allerdings analog zu den bereits erzielten Ergebnissen keine Änderung der PolySia-Menge oder Lokalisation, so dass die weiterführenden Experimente ausschließlich mit den Zellkulturüberständen durchgeführt wurden.

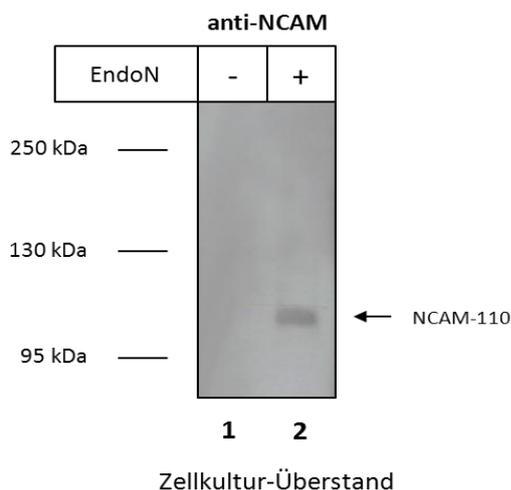
Abbildung 21 zeigt, dass im Vergleich zur unbehandelten Kontroll-Probe (Spur 1) auch nach einer Stimulation mit LPS ein steigender PolySia-Spiegel im Zellkulturüberstand detektiert werden konnte, der mit der LPS-Menge korrelierte (Spuren 2 und 3).



**Abbildung 21** Western Blot-Analyse zur PolySia-Detektion nach LPS-Stimulation von A549-Zellen

Die polysialylierten Proteine wurden aus den A549-Zellkulturüberständen nach Behandlung mit steigenden LPS-Mengen durch Affinitätsaufreinigung mit inaktivierter EndoN isoliert und mittels Western Blot untersucht. Die Proteinmenge wurde durch Zellzählung normiert, und vergleichbare Proteinmengen pro Spur aufgetragen. Apparente Molekulargewichte sind in kDa angegeben. Das Ergebnis dieser Analyse wurde durch drei biologische Replikate verifiziert.

Um in den Überständen nach LPS-Behandlung nicht nur PolySia, sondern auch PolySia-NCAM nachzuweisen, wurden die Proben nach Affinitätsaufreinigung mit inaktivierter EndoN mit einem anti-NCAM Antikörper gefärbt (Abbildung 22). Während in unstimulierten A549-Zellen intrazellulär noch die Isoform NCAM-140 nachweisbar war (Abbildung 15), so zeigte sich nach LPS-Stimulation und enzymatischem Verdau mit EndoN im Überstand (Spur 2) eine Bande in Höhe von ca. 110 kDa, was auf die lösliche NCAM-110-Isoform schließen lässt [Secher 2010]. Diese Analyse wurde auch nach IL-1 $\beta$ -Stimulation durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Das Ergebnis ist analog zu dem Ergebnis des LPS-Experiments und zeigte ebenfalls die lösliche Isoform NCAM-110.



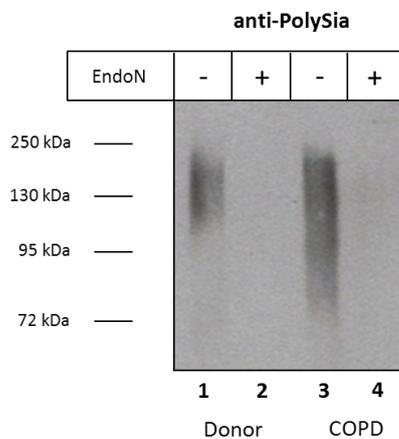
**Abbildung 22** Detektion von NCAM durch Western Blot-Analyse nach LPS-Stimulation von A549-Zellen

Zur Western Blot-Analyse wurde aufgereinigtes PolySia-NCAM (nach Affinitätsaufreinigung mit inaktivierter EndoN) aus dem Überstand von A549-Zellen gewonnen, welche zuvor mit 1  $\mu$ g LPS stimuliert worden waren. Die Proben wurden entweder vor (Spur1) oder nach enzymatischem Verdau mit EndoN (Spur 2) eingesetzt. Apparente Molekulargewichte sind in kDa angegeben. Das Ergebnis dieser Analyse wurde durch drei biologische Replikate verifiziert.

### 4.3 Polysialylierung in pathologisch-verändertem Lungengewebe

#### 4.3.1 PolySia-Nachweis in Lungengewebe von COPD-Patienten

Die Lungenkrankheit COPD ist neben den typischen Merkmalen des Lungenemphysems und der chronischen Entzündung mit einem beständig erhöhten IL-1 $\beta$  Spiegel assoziiert [Dinarello 1996; Rusznak *et al.* 2000; Chung 2001; van Eeden *et al.* 2005]. Um die Wirkung von IL-1 $\beta$  im Zusammenhang mit PolySia-NCAM in humanem Bronchialepithel *in vivo* zu untersuchen, wurde Gewebe von COPD-Patienten zunächst auf die Anwesenheit von PolySia überprüft. Abbildung 23 zeigt eine Western Blot-Analyse von physiologischem Lungengewebe sowie pathologischem COPD-Gewebe.



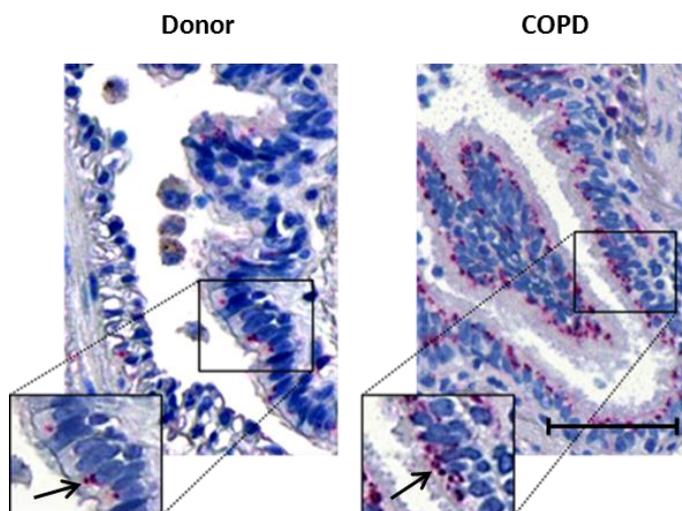
**Abbildung 23** Bestimmung der PolySia-Menge in COPD-Gewebe im Vergleich zu Donor-Gewebe mittels Western Blot-Analyse

Proben aus Lungenhomogenaten von Donoren und COPD-Patienten wurden je unverdaut (Spur 1 und 3) bzw. nach enzymatischem Verdau mit EndoN (Spuren 2 und 4) mittels Western Blot-Analyse untersucht. Aufgetragen wurde hierbei je 10  $\mu$ g Protein aus Gesamthomogenaten. Apparente Molekulargewichte sind in kDa angegeben. Das Ergebnis dieser Analyse wurde durch sechs biologische Replikate verifiziert.

Die detektierten PolySia-Signale im Fall von COPD- wie auch von Donor-Lungengewebe waren nach EndoN-Verdau verschwunden (Spur 2 und Spur 4), wodurch die Spezifität der Analyse bestätigt wurde. Spur 1 zeigt die PolySia-Menge in Donoren, die bereits in vorangegangenen Versuchen nachgewiesen werden konnte (4.1.1). Das Signal erstreckte sich dabei über einen Größenbereich von ca. 120 – 200 kDa und ist in Gewebelysaten von COPD-

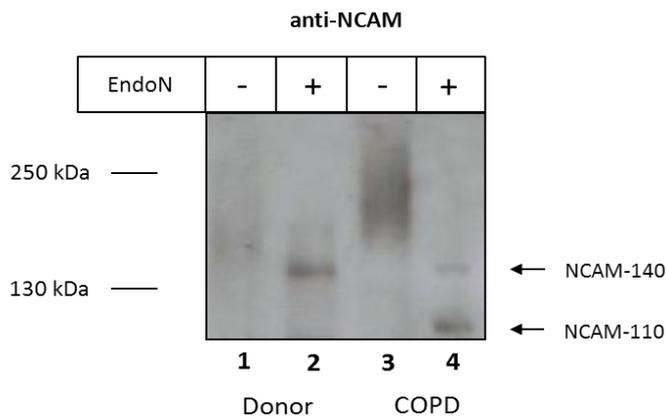
Patienten verstärkt sichtbar, was auf eine erhöhte PolySia-Menge in diesen pathologisch veränderten Lungengewebshomogenaten zurückzuführen ist.

Um die Erhöhung der PolySia-Expression in COPD-Gewebe auch immunhistologisch bestätigen zu können, wurden Paraffin-Schnitte gegen PolySia gefärbt. Wie Abbildung 24 zeigt weisen COPD-Patienten wie auch Donoren PolySia-positive Zellen im Bereich des Bronchialepithels auf, wobei die Färbung im Fall von COPD-Patienten deutlich stärker ist und in einer höheren Anzahl an Zellen detektiert werden konnte. Darüber hinaus wurde PolySia in beiden Fällen intrazellulär und nur in COPD-Patienten zusätzlich auch im Lumen nachgewiesen (Abbildung 24 →). Um die polysialylierte(n) NCAM Isoform(en) in COPD-Gewebe zu bestimmen, wurden Western Blot-Analysen mit und ohne EndoN-Behandlung durchgeführt. Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, konnte in physiologischem wie auch pathologisch-verändertem Gewebe die NCAM-Isoform 140 nach EndoN-Verdau nachgewiesen werden (Abbildung 25, Spur 1 und Spur 3), im Lungengewebe von COPD-Patienten allerdings zusätzlich noch die lösliche Isoform NCAM-110 (Spur 4).



**Abbildung 24** Vergleich der PolySia-Expression in COPD-Gewebe und Donor-Gewebe mittels Immunhistochemie.

Paraffin-eingebettete Lungenschnitte von Donor- sowie COPD-Gewebe wurden mittels immunhistochemischer Biotin-Streptavidin-Methode und einem anti-PolySia mAk angefärbt. Der Größenbalken entspricht 50  $\mu$ m.

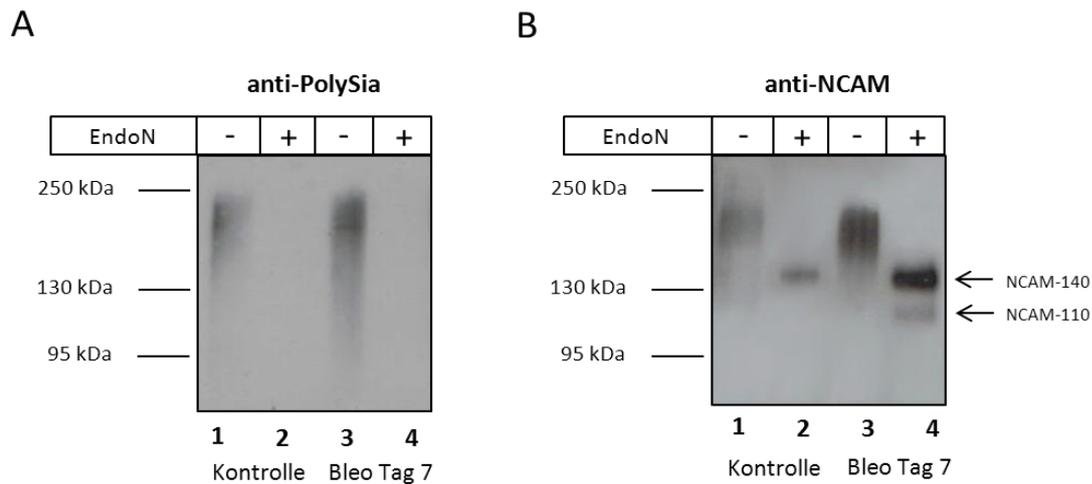


**Abbildung 25** Nachweis von PolySia-NCAM in COPD-Gewebe im Vergleich zu Donor-Gewebe mittels Western Blot-Analyse

Proben von Lungenhomogenaten von Donoren und COPD-Patienten wurden nach Affinitätsaufreinigung mit inaktivierter EndoN jeweils unverdaut (Spuren 1 und 3) bzw. nach enzymatischem Verdau mit EndoN (Spuren 2 und 4) mittels Western Blot-Analyse untersucht. Aufgetragen wurden hierbei je 10 µg Protein. Apparente Molekulargewichte sind in kDa angegeben. Das Ergebnis dieser Analyse wurde durch drei biologische Replikate verifiziert.

#### 4.3.2 PolySia-Nachweis in Lungengewebe von Bleomycin-behandelten Mäusen

Aufgrund der inflammatorischen Immunantwort des Lungengewebes in Bleomycin-behandelten Versuchstieren (1.4.4) sowie des hochregulierten IL-1 $\beta$ -Spiegels wurde, anknüpfend an die bisher erzielten Ergebnisse, überprüft, ob PolySia-NCAM in Bleomycin-behandelten Tieren hochreguliert ist und ob auch hier die lösliche NCAM-Form-110 in polysialylierter Form detektiert werden kann. Eingesetzt wurde hierbei Lungengewebe von Mäusen (*Mus musculus*), die nur eine Behandlung mit Natriumchlorid-Lösung erfuhren und Gewebe von Mäusen, die an Tag 7 nach Bleomycin-Behandlung zu Forschungszwecken euthanasiert wurden.



**Abbildung 26** Untersuchung der PolySia- und NCAM Expression in Lungengewebe Bleomycin-behandelter Mäuse im Vergleich zu Kontroll-Gewebe mittels Western Blot-Analyse

Lysate von Lungenhomogenaten Bleomycin-behandelter Tiere sowie von Kontrolltieren nach NaCl-Behandlung wurden nach Affinitätsaufreinigung mittels inaktivierter EndoN einer Western Blot-Analyse unterzogen. (A) Die Immunfärbung erfolgte durch einen anti-PolySia mAK. Aufgetragen sind in Spuren 1 und 3 die Lysate vor Verdau mit EndoN und in Spuren 2 und 4 die entsprechenden Proben nach EndoN-Behandlung. (B) Die Färbung erfolgte durch einen anti-NCAM mAK. Der Probenauftrag erfolgte wiederum vor (Spuren 1 und 3) bzw. nach (Spuren 2 und 4) EndoN-Behandlung. Aufgetragen wurde hierbei je 10 µg Protein. Apparente Molekulargewichte sind in kDa angegeben. Das Ergebnis dieser Analyse wurde durch drei biologische Replikate verifiziert.

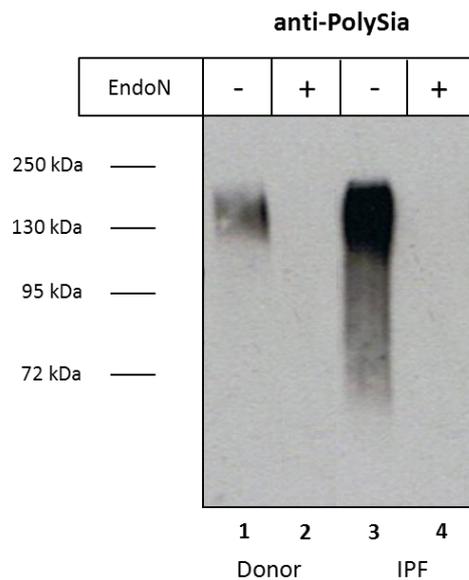
In einem ersten Schritt wurden die Proben wie beschrieben aufgearbeitet (2.6.1), einer Affinitätsaufreinigung mit inaktivierter EndoN unterzogen und mittels Western Blot-Analyse untersucht. Abbildung 26 A zeigt ein hochreguliertes PolySia-Signal in Bleomycin-behandeltem Gewebe (Spur 3) im Gegensatz zum NaCl-Kontrollgewebe (Spur 1) im Bereich von ca. 130 – 230 kDa. Die Spezifität des Nachweises wurde mittels EndoN-Verdau bestätigt (Spur 2 und Spur 4). Identisch behandeltes Gewebe wurde parallel, ebenfalls mittels Western Blot unter Verwendung eines anti-NCAM mAK auf NCAM Expression geprüft. In Abbildung 26 B konnte in Spur 1 (Kontrolle) und Spur 3 jeweils das PolySia-NCAM Signal detektiert werden, wobei auch hier die gesteigerte PolySia-Menge im Bleomycin-Gewebe auffällt. In den Spuren 2 und 4 lässt sich de-polysialyliertes NCAM nach spezifischem EndoN-Verdau nachweisen. Im Kontrollgewebe wurde ein scharfes Signal in Höhe von ca. 140 kDa sichtbar (Spur 2), was auf die

entsprechende NCAM-Isoform hinweist. In Bleomycin-Lungengewebe wurden nach Enzymverdau zwei prominente Proteinbanden sichtbar, im Bereich von 140 kDa sowie im Bereich von 110 kDa (siehe Pfeil in Abbildung 26). Einhergehend mit der Detektion von NCAM-110 in entzündlichem Lungengewebe von COPD-Patienten (Abbildung 23) konnte auch in Bleomycin-Gewebe neben der membranständigen NCAM-140-Isoform auch die lösliche NCAM-110-Isoform nachgewiesen werden, die in den jeweiligen Kontrollgeweben nicht vorhanden war.

#### **4.3.3 PolySia-Nachweis in Lungengewebe von IPF-Patienten**

Im beschriebenen Mausmodell wurde nachgewiesen, dass 21 Tage nach der Bleomycin-Verabreichung eine dadurch induzierte Lungenfibrose zur vollen Ausprägung kommt. Zu diesem Zeitpunkt sind bereits die typischen fibrotischen Merkmale, die auch während einer humanen pulmonalen Fibrose vorkommen, zu beobachten [Izbicki *et al.* 2002].

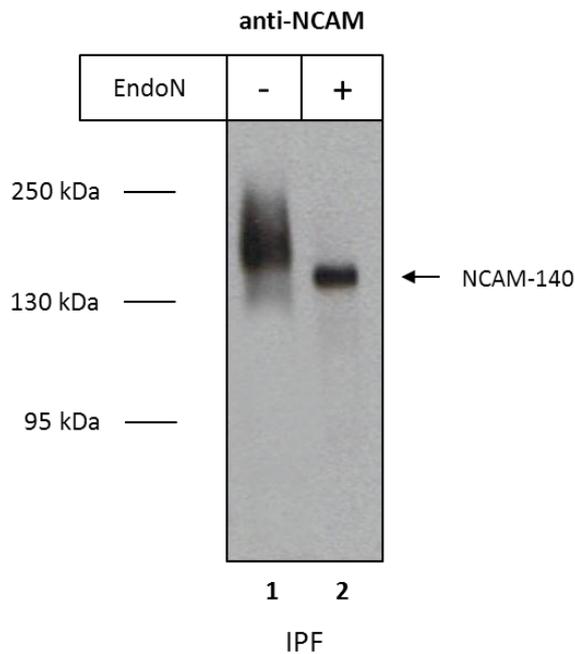
In Anlehnung an die Analysen bei Bleomycin-behandelten Mäusen wurde auch in IPF-Gewebe der PolySia- sowie der PolySia-NCAM-Status, nach Affinitätsaufreinigung mit inaktivierter EndoN, überprüft. Abbildung 27 zeigt ein, erhöhtes PolySia-Signal im Fall von IPF-Gewebe im Vergleich zu physiologischem Donor-Gewebe. Anders als in Lungengewebe Bleomycin-behandelter Mäuse lässt sich in IPF-Gewebe nach enzymatischem EndoN-Verdau nur die membranständige NCAM-140-Isoform nachweisen (Abbildung 28).



**Abbildung 27** Analyse der PolySia-Expression in IPF-Gewebe im Vergleich zu Donor-Gewebe mittels Western Blot.

Gewebehomogenate von Donoren und IPF-Patienten wurden mit Hilfe von inaktivierter EndoN affinitätsaufgereinigt, anschließend unverdaut (Spuren 1 und 3) bzw. nach enzymatischem Verdau mit EndoN (Spuren 2 und 4) gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse untersucht. Aufgetragen wurde hierbei jeweils 10 µg Protein. Apparente Molekulargewichte sind in kDa angegeben.

Dieses Ergebnis legt den Rückschluss nahe, dass offensichtlich das sogenannte *ectodomain-shedding* von NCAM nur bei Entzündungsprozessen stattfindet, um die daraus resultierende Form NCAM-110 als aktives Agens der erworbenen Immunabwehr in der Lunge nutzen zu können.



**Abbildung 28** Untersuchung des PolySia-NCAM-Status in IPF-Gewebe mittels Western Blot-Analyse

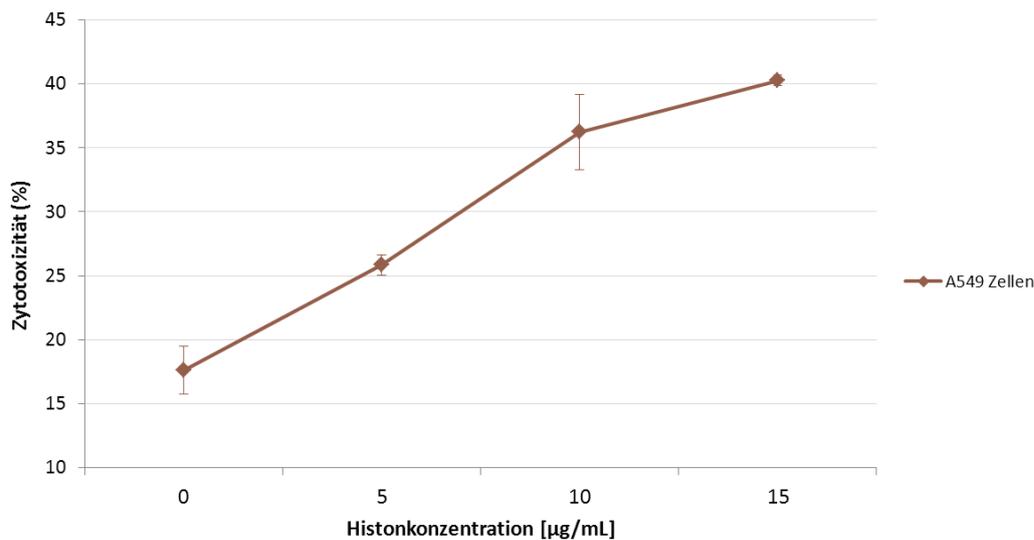
Zur Western Blot-Analyse wurden die polysialylierten Proteine mittels Affinitätsaufreinigung mit Hilfe inaktivierter EndoN aus einem Gesamtlungenlysat isoliert und unverdaut (Spur 1) bzw. nach enzymatischem EndoN-Verdau (Spur 2) aufgetragen. Apparente Molekulargewichte sind in kDa angegeben. Das Ergebnis dieser Analyse wurde durch zehn biologische Replikate verifiziert.

#### 4.4 Untersuchung zur biologischen Funktion von PolySia-NCAM-110

In einer kürzlich veröffentlichten Studie, die gemeinsam mit der AG Prof. Preissner (Biochemisches Institut, JLU Giessen) publiziert werden konnte, zeigte sich, dass Colominsäure – ein Polymer aus  $\alpha$ -2,8 verknüpften *N*-Acetylneuraminsäuren (Neu5Ac) aus *E.coli* (äquivalent zu PolySia in Säugetieren) – die Zytotoxizität von extrazellulären Histonen gegenüber Lungenepithelzellen verringern kann [Saffarzadeh *et al.* 2012]. Analog könnte die Sekretion von löslichem PolySia-NCAM-110 einen möglichen Mechanismus darstellen, der die körpereigenen Bronchialepithelzellen vor der Zerstörung durch extrazelluläre Histone während eines Entzündungsprozesses schützt, zumal bereits nachgewiesen wurde, dass Histon H1 ein Interaktionspartner von Polysialinsäure ist [Mishra *et al.* 2010].

#### 4.4.1 Interaktion von löslichem PolySia-NCAM-110 mit extrazellulären Histonen

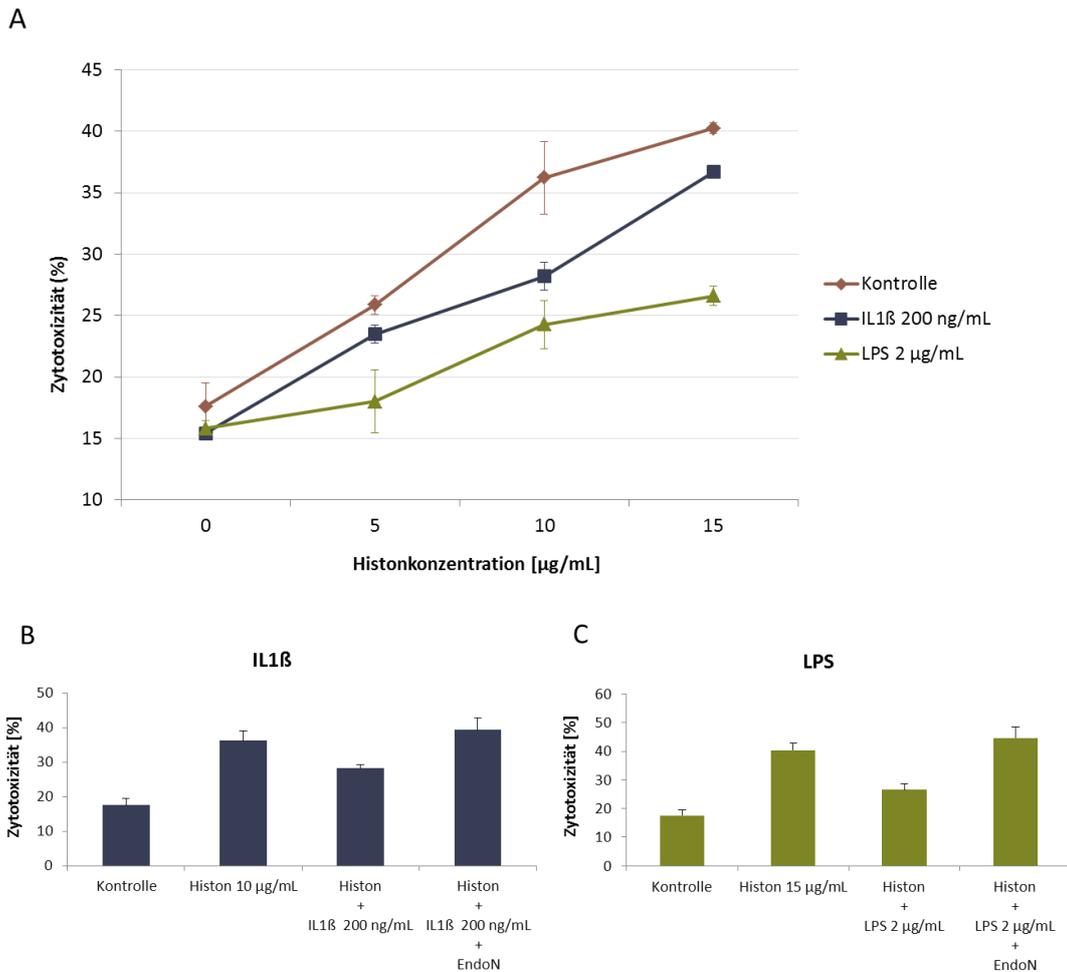
In einem ersten Versuch wurden A549 Zellen mit steigenden Konzentrationen an Histonen inkubiert. Anschließend wurde die zytotoxische Wirkung der Histone auf die Zellen mittels eines herkömmlichen Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Zytotoxizitätstest bestimmt und die Sterberate der Zellen in % berechnet (3.4.4). Wie in Abbildung 29 zu sehen ist, nimmt die Zahl der abgestorbenen Zellen korrelierend mit steigender Histon-Konzentration von 17% auf 40 % stetig zu.



**Abbildung 29** LDH-Zytotoxizitätstest nach Behandlung von A549-Zellen mit extrazellulären Histonen

Die zytotoxische Wirkung steigender Histonkonzentrationen auf kultivierte A549-Zellen wurde mittels LDH-Messung (3.4.4) bestimmt. Der Messung lag jeweils eine Dreifachbestimmung zugrunde. Die Werte wurden in Relation zu einer Positiv-Kontrolle (Behandlung der Zellen mit Triton-X, um maximale LDH-Mengen zu erhalten) und einer Negativkontrolle (unbehandelte Zellen, um die spontan freiwerdende LDH als Hintergrundwert abziehen zu können) bestimmt und in % angegeben. Das Ergebnis dieser Analyse wurde durch drei biologische Replikate verifiziert. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Inkubierte man die Zellen nun vorher mit LPS bzw. IL-1 $\beta$ , um die Sekretion von PolySia-NCAM-110 zu induzieren und behandelte diese anschließend abermals mit steigenden Histonkonzentrationen, so zeigte sich, dass sowohl eine vorherige LPS- als auch eine IL-1 $\beta$ -Stimulation den zytotoxischen Effekt von extrazellulären Histonen abmildern konnte (Abbildung 30 A).



**Abbildung 30** LDH-Zytotoxizitätstest nach Behandlung von A549-Zellen mit extrazellulären Histonen nach vorheriger Stimulation durch IL-1 $\beta$  und LPS

Mittels LDH-Messung (2.4.4) wurde die zytotoxische Wirkung von Histonen auf kultivierte A549-Zellen nach vorangegangener Stimulation durch IL-1 $\beta$  und LPS bestimmt. **(A)** Vergleich der zytotoxischen Wirkung von steigenden Histonkonzentrationen auf unstimulierte (braune Kurve), IL-1 $\beta$ -stimulierte (blaue Kurve) und LPS-stimulierte (grüne Kurve) Zellen. Der Messung lag jeweils eine Dreifachbestimmung zugrunde. Die Werte wurden in Bezug auf eine Positiv-Kontrolle (Behandlung der Zellen mit Triton-X, um maximale LDH-Mengen zu erhalten) und einer Negativkontrolle (unbehandelte Zellen, um die spontan freiwerdende LDH als Hintergrundwert abziehen zu können) bestimmt und in % angegeben. **(B)** Quantifizierung des zytotoxischen Effektes auf IL-1 $\beta$ -stimulierte A549-Zellen. Es wurde eine unbehandelte Kontrolle, mit einer unstimulierten – Histon-behandelten Probe, einer IL-1 $\beta$ -stimulierten – Histon-behandelten Probe sowie einer IL-1 $\beta$ -stimulierten-Histon-behandelten und gleichzeitig EndoN-behandelten Probe verglichen. Die Messwerte sowie die Standardabweichung beziehen sich auf drei unabhängige Messungen. **(C)** Zytotoxischer Effekt der Histone auf LPS-stimulierte A549-Zellen. Es wurden vier unterschiedlich behandelte Proben miteinander verglichen: Kontrolle, unstimulierte Histonkontrolle, stimulierte Histonkontrolle, Probe nach LPS-Stimulation und Probe nach LPS-Stimulation und EndoN-Verdau. Die Messwerte sowie die Standardabweichung beziehen sich auf drei unabhängige Messungen. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm.

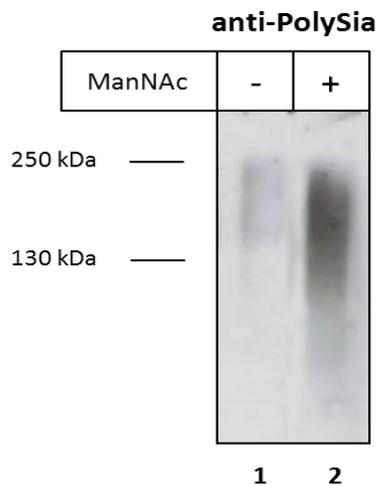
Diese Beobachtung wurde in beiden Fällen zusätzlich durch eine Negativkontrolle bekräftigt (Abbildung 30 B + C), in der durch Behandlung mit EndoN die Inhibition des zytotoxischen Effekts der Histone komplett aufgehoben werden konnte. Offensichtlich stellen die durch EndoN abgebauten PolySia-Ketten von NCAM-110 eine wichtige Voraussetzung für die Interaktion mit extrazellulären Histonen dar.

### **Zusätzliche Behandlung mit natürlichen Vorläuferstrukturen**

Verschiedene Studien konnten bereits belegen, dass der Polymerisationsgrad der PolySia-Ketten eines Proteins durch Zugabe von natürlichen Sialinsäure Vorläuferstrukturen (1.1.2.1) erhöht werden kann [Bork *et al.* 2005]. Um zu überprüfen ob der schützende Effekt, den durch Stimulation induziertes PolySia gegenüber extrazellulären Histonen aufweist, noch zusätzlich verstärkt werden kann, wurden Zellkulturversuche durchgeführt, in denen die Zellen zuvor mit der per-acetylierten Variante des Sialinsäure-Vorläufer-Moleküls *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) behandelt wurden. Diese Variante wurde genutzt, um die zelluläre Aufnahme der Substanz zu erhöhen [Du *et al.* 2009]. Abbildung 31 zeigt einen Western Blot von affinitätsaufgereinigten A549-Zelllysaten. In Spur 1 ist das PolySia-Signal der unstimulierten Kontrolle und in Spur 2 das PolySia-Signal des ManNAc-stimulierten Lysates zu sehen, welches eine deutlich stärkere Intensität aufweist, was wiederum einen Rückschluß auf eine erhöhte PolySia-Menge in ManNAc-stimulierten A549-Zellen zulässt.

Weiterführend sollte überprüft werden, ob die gesteigerte PolySia-Menge in ManNAc-behandelten Zellen einen positiven Einfluss auf die Wechselwirkung mit extrazellulären Histonen nimmt. Dazu wurden A549-Zellen gemeinsam mit 100  $\mu$ M ManNAc ausplattiert, danach wie üblich mit IL-1 $\beta$  bzw. LPS-stimuliert um anschließend mit steigenden Histon-Konzentrationen behandelt zu werden. Die zytotoxische Wirkung der Histone auf A549-Zellen wurde mittels LDH-Zytotoxizitätstest bestimmt. Abbildung 32 A zeigt die zytotoxische Wirkung steigender Histon-Konzentrationen sowohl auf unbehandelte Kontroll-Zellen, IL-1 $\beta$ -stimulierte Zellen sowie ManNAc-behandelte-IL-1 $\beta$ -stimulierte Zellen. Es

zeigte sich, dass eine ManNAc-Behandlung in A549-Zellen zu einer erhöhten Polysialylierung führt, die zusätzlich zur induzierten Freisetzung von PolySia-NCAM-110 einen zytotoxischen Effekt von extrazellulären Histonen abmilderte.

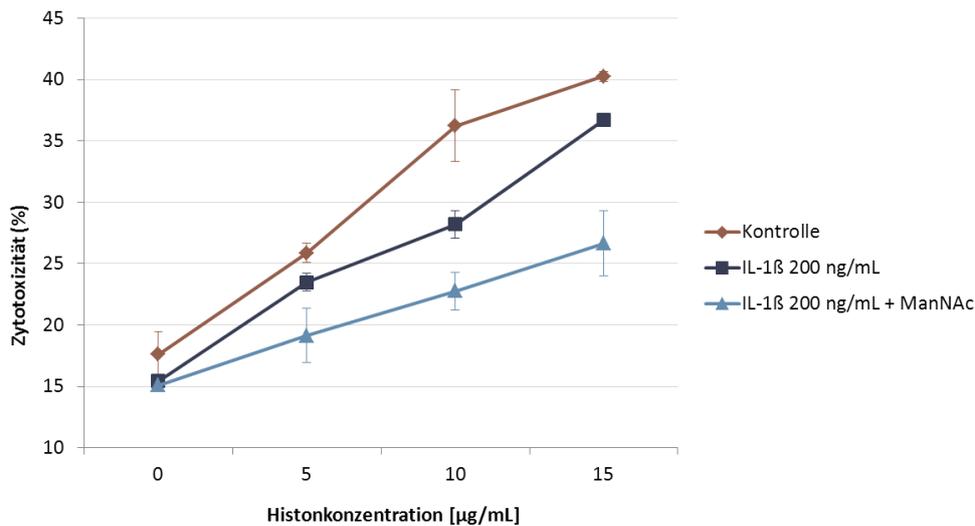


**Abbildung 31** Western Blot Analyse nach Behandlung von A549-Zellen mit Sialinsäure-Vorläuferstrukturen

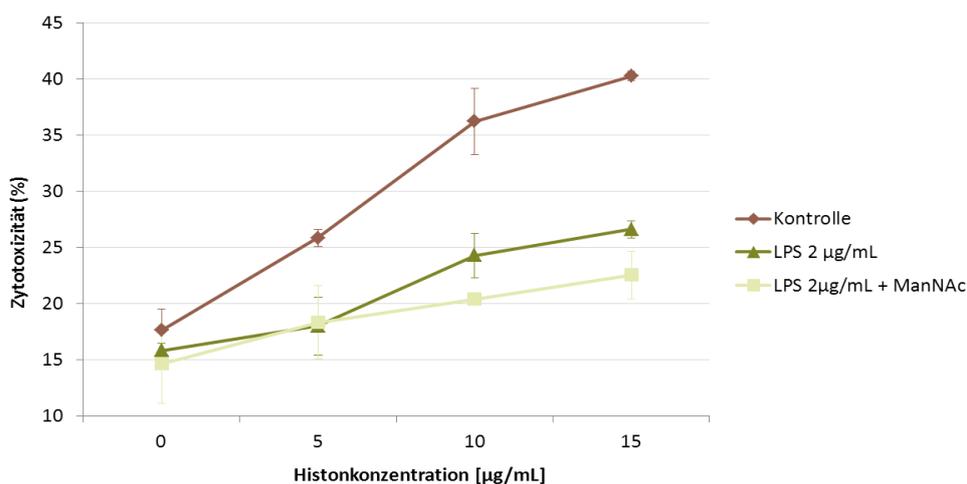
Zur Western Blot-Analyse von affinitätsaufgereinigten (mit inaktivierter EndoN) A549-Zelllysaten wurde eine Färbung mit anti-PolySia mAk durchgeführt. Bei dem Lysat aus Spur 1 handelt es sich um ein Homogenat unbehandelter Zellen, in Spur 2 wurden die Zellen zuvor mit dem per-acetylierten Sialinsäure-Vorläufer-Molekül *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) behandelt. Apparente Molekulargewichte sind in kDa angegeben. Das Ergebnis dieser Analyse wurde durch drei biologische Replikate verifiziert.

Dieser Beobachtung zeigte sich in ähnlicher Form für LPS-stimulierte-ManNAc-behandelte Zellen (Abbildung 33 B), wobei die gesteigerte Resistenz gegenüber dem zytotoxischen Effekt von extrazellulären Histonen erst ab einer Konzentration von 10 µg/mL Histon zum Tragen kam. Beide Zellpopulationen (LPS-stimulierte und LPS-stimulierte-ManNAc-behandelte) erwiesen sich jedoch deutlich weniger sensitiv gegenüber Histon-vermittelter Zytotoxizität als die unbehandelten, unstimulierten Zellen.

A



B

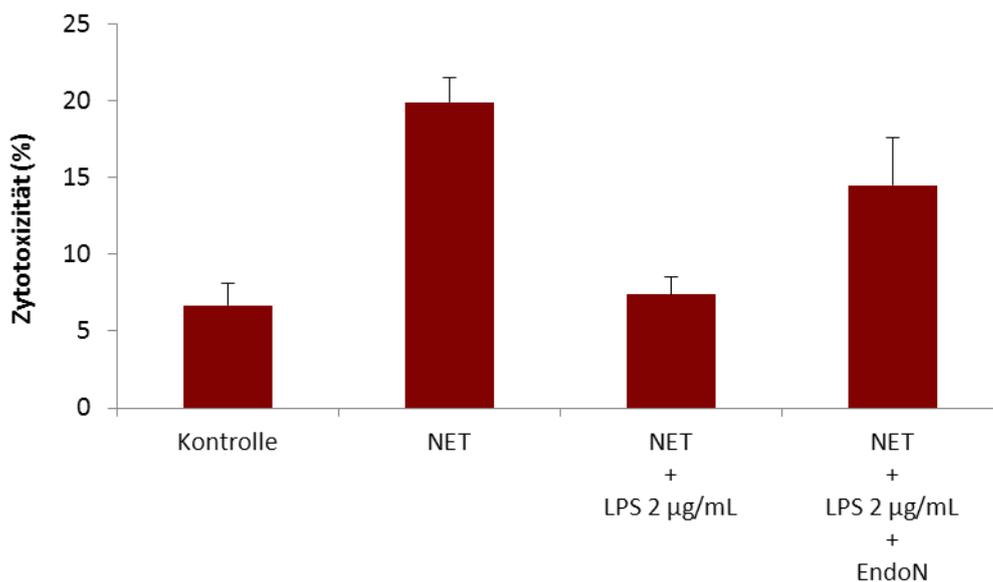


**Abbildung 32** LDH-Zytotoxizitätstest von extrazellulären Histonen auf A549-Zellen nach Stimulation durch Sialinsäure-Vorläuferstrukturen

Mittels LDH-Messung (2.4.4) wurde die zytotoxische Wirkung von steigenden Histonkonzentrationen auf kultivierte A549-Zellen nach vorangegangener Behandlung mit dem Molekül *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) und zusätzlicher Stimulation bestimmt. **(A)** Vergleichsanalyse von unstimulierten (braune Kurve), IL-1 $\beta$ -stimulierten (dunkelblaue Kurve) und IL-1 $\beta$ -stimulierten-ManNAc-behandelten (hellblaue Kurve) Zellen. **(B)** Vergleichsanalyse von unstimulierten (braune Kurve), LPS-stimulierten (dunkelgrüne Kurve) und LPS-stimulierten-ManNAc-behandelten (hellgrüne Kurve) Zellen. Den Messungen lag jeweils eine Dreifachbestimmung zugrunde. Die Werte wurden in Bezug auf eine Positiv-Kontrolle (Behandlung der Zellen mit Triton-X, maximale LDH-Mengen) und einer Negativkontrolle (unbehandelte Zellen, spontan freiwerdende LDH) bestimmt und in % angegeben. Die Messwerte sowie die Standardabweichung beziehen sich auf drei unabhängige Messungen. Die Absorptionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm.

#### 4.4.2 Interaktion von löslichem PolySia-NCAM-110 mit NET

In einem anknüpfenden Experiment wurde überprüft, ob auch die zytotoxische Wirkung einer NET (*neutrophil extracellular traps*)-Formation (1.4.3.1), wie sie in Lungengewebe während einer Entzündungsreaktion von Zellen als Abwehrmechanismus eingesetzt wird, minimiert werden kann. Hierzu wurden zunächst neutrophile Granulozyten aus Vollblut gewonnen und dann die NET-Bildung induziert [Saffarzadeh *et al.* 2012]. Anschließend wurde jeweils die Hälfte der LPS-stimulierten und der unstimulierten Zellen mit NET behandelt, die andere Hälfte verblieb als Referenz ohne entsprechende Behandlung.



**Abbildung 33** LDH-Zytotoxizitätstest nach Behandlung von A549-Zellen mit NET nach Stimulation durch LPS

Die Bestimmung des zytotoxischen Effektes von NET auf unstimulierte, LPS-stimulierte und LPS-stimulierte, gleichzeitig mit EndoN inkubierte A549-Zellkulturen erfolgte mittels LDH-Zytotoxizitätsmessung. Zusätzlich wurde eine unbehandelte Kontrolle als Referenzwert gemessen. Die Werte sowie die Standardabweichung beziehen sich auf drei unabhängige Experimente. Die Absorptionmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm.

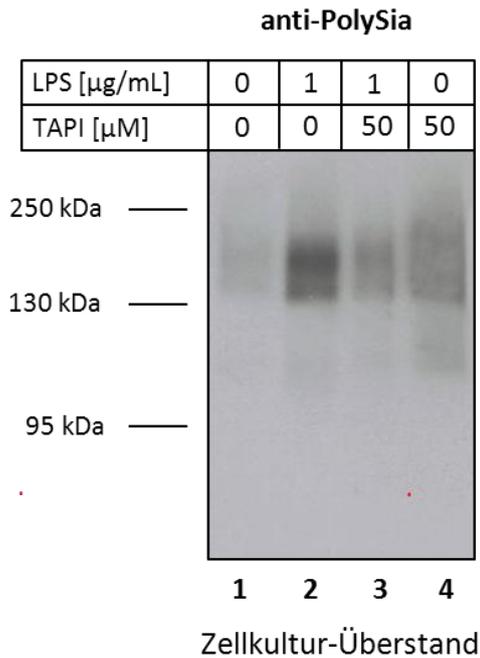
Der Vergleich der freigesetzten LDH-Menge - als Maß für die Zytotoxizität – bei den verschiedenen Inkubationsbedingungen zeigte, dass auch bei Behandlung mit komplettem NET dessen Zytotoxizität für A549-Zellen durch eine LPS-induzierte PolySia-NCAM-110 Sekretion kompensiert wurde. Ein Verdau der

PolySia-Kette mit EndoN bestätigte den Befund, da die Sterblichkeit der Zellen danach wieder zunahm (Abbildung 33). Zusammenfassend belegen die erzielten Resultate, dass freigesetztes PolySia-NCAM-110 einer extrazellulären NET- bzw. Histon-vermittelten Zytotoxizität entgegenwirkt.

#### **4.4.3 Untersuchung zum Mechanismus der Freisetzung von löslichem PolySia-NCAM-110**

Um herauszufinden, durch welchen Mechanismus bzw. durch welche(s) Enzym(e) die Ektodomäne des NCAM-140 im Zuge einer Entzündungsreaktion abgespalten wird, wurde TAPI-2 (*TNF- $\alpha$ -Protease Inhibitor-2*), ein Inhibitor für verschiedene Metalloproteasen (darunter: TACE (*TNF $\alpha$ -converting enzyme*), ADAMs und Secretase) eingesetzt. Der Inhibitor wurde nach Beginn der Inkubation mit der höchsten LPS-Konzentration zu den A549-Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen wie angegeben weiter inkubiert. Wie in Abbildung 34 zu sehen ist, konnte eine erhöhte PolySia-Menge im Überstand LPS-stimulierter Zellen (Spur 2) im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen (Spur 1) nachgewiesen werden.

Bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit LPS und TAPI-2 ist die im Überstand nachweisbare PolySia-Menge dagegen deutlich geringer als bei alleiniger LPS-Stimulation (Spuren 2 und 3), was vermuten lässt, dass PolySia-NCAM-140, zumindest zum Teil, durch eine der oben genannten Metalloproteasen gespalten wird, die durch den eingesetzten Inhibitor gehemmt werden kann. Die Substanzkontrolle (Spur 4), bei der nur TAPI-2 zugesetzt wurde, weist annähernd vergleichbare PolySia-Signalintensität auf wie die Probe nach LPS-Stimulation und TAPI-2 Gabe (Spur 3).



**Abbildung 34** Überprüfung einer möglichen Inhibitorwirkung von TAPI-2 bei der NCAM-110 Freisetzung

Zur Western Blot-Analyse wurden Überstände von unbehandelten (Spur 1) A549-Zellen, mit LPS (Spur 2), mit LPS + TAPI-2 (Spur 3) oder ausschließlich mit TAPI-2 (Spur 4) behandelten Zellen einer Affinitätsaufreinigung mit inaktivierter EndoN unterzogen und die erhaltenen Eluate aufgetragen. Apparente Molekulargewichte sind in kDa angegeben. Das Ergebnis dieser Analyse wurde durch drei biologische Replikate verifiziert.

Dieses Ergebnis lässt den Rückschluss auf Metalloprotease-Aktivität in humanen Bronchialepithelzellen zu, die während eines inflammatorischen Auslösers in der Lage ist, lösliches PolySia-NCAM-110, durch Schneiden des extrazellulären Anteils des PolySia-NCAM-140, freizusetzen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Expression von PolySia-NCAM in der adulten Lunge

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM in polysialylierter Form als PolySia-NCAM in der humanen Lunge vorliegt. Das Protein wurde dabei mit Hilfe massenspektrometrischer Techniken, wie MALDI-TOF-MS und MALDI-TOF-MS/MS, anhand seines spezifischen Peptidfragmentmusters und unter Zuhilfenahme einer organismusspezifischen Datenbanksuche eindeutig als PolySia-Träger identifiziert. Bisher war PolySia-NCAM nur während der embryonalen Entwicklung der Lunge, in den beiden Keimblättern Mesoderm und Endoderm [Lackie *et al.* 1994], sowie - in der ausgereiften Lunge - in kleinzelligen Lungenkarzinomen nachgewiesen worden, wobei PolySia-NCAM zur Unterscheidung eines kleinzelligen Lungenkarzinoms von einem Lungenkarzinoid herangezogen werden kann [Komminoth *et al.* 1991]. Unsere Untersuchungen zeigten, dass polysialyliertes NCAM im respiratorischen Epithel in zilierten Bronchialepithelzellen sowie in Clara-Zellen exprimiert wird. Dabei wurde weiterhin festgestellt, dass der Polymerisationsgrad der PolySia-Ketten des Proteins, bei über 40 Sialinsäure-Untereinheiten liegt. Darüber hinaus konnte PolySia-NCAM im Zellkulturmodell, in der Lungenepithelzelllinie A549, im späten Trans-Golgi-Apparat lokalisiert werden. Im physiologischem Zustand, d.h. in Donor-Lungengewebe, sowie in unstimulierten A549 Zellen wurde jeweils die Expression der NCAM-140 Isoform detektiert, die von anderen Autoren bereits während der Embryonalphase in den respiratorischen Vorläuferstrukturen nachgewiesen werden konnte [Lackie *et al.* 1994].

Während der Entwicklung des Nervensystems, bei welcher axonale Wegfindung, Neuronenbildung und synaptische Plastizität die entscheidenden Schüsselschritte darstellen, ist PolySia-NCAM, ebenso wie die beiden involvierten Polysialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV, nahezu durchgängig exprimiert [Hildebrandt *et al.* 1998; Mühlhoff *et al.* 2009]. Auch die

physiologische Rolle von polysialyliertem NCAM in adultem Nervensystem wurde bereits intensiv untersucht [Bonfanti 2006], wobei sich zeigte, dass PolySia vor allem in Arealen zu finden ist, die sich auch im ausgereiften Stadium durch Neurogenese und synaptische Plastizität auszeichnen. Bei diesen Regionen handelt es sich z.B. um den Hippocampus, der die Fähigkeit zur Langzeitpotenzierung bzw. Langzeitdepression besitzt, die subventrikuläre Zone, den rostralen Migrationsweg und Teile des Hypothalamus [Seki 2004]. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass der Nucleus suprachiasmaticus, die sogenannte „innere Uhr“, auch im adulten Hirn polysialyliert vorliegt.

Eine Überlegung dahin gehend, dass sich PolySia-NCAM auch in der adulten Lunge in Stammzell-Regionen befinden könne, konnte allerdings nicht bestätigt werden. Unsere Untersuchungen hierzu zeigten, dass die Basalzellen der Lunge, die im Bronchialepithel als undifferenzierte Stammzellen fungieren, kein PolySia-NCAM exprimieren (Abbildung 13 B). Weiterführend wurde ein Antikörper gegen das Protein Ki-67 eingesetzt, welches während der G1-, S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus exprimiert wird, aber in ruhenden Zellen fehlt. Dies zeichnet Ki-67 u.a. als einen gut geeigneten Marker aus, um die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation zu bestimmen (Scholzen and Gerdes 2000). Wie Abbildung 14 jedoch zeigte, befinden sich PolySia-tragende Zellen nicht im proliferierenden Zustand, sondern verweilen in fertig ausdifferenzierter Form in der G0-Phase.

Um PolySia nicht nur auf Proteinniveau in der humanen Lunge zu bestimmen, wurden PCR-Analysen durchgeführt, mittels derer die beiden Polysialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV in A549-Zellen quantifiziert werden sollten. Als interner Standard diente dabei die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein Enzym der Glykolyse. Abbildung 18 zeigt einen deutlichen, quantitativen Expressionsunterschied der beiden Transferasen, wobei jedoch als wichtigere Transferase im Hinblick auf die Polysialylierung im respiratorischen System die Polysialyltransferase ST8SialIV identifiziert werden konnte.

## 5.2 Sekretion von löslichem PolySia-NCAM-110 nach Stimulation

Um der Frage nach der Bedeutung von polysialyliertem NCAM in der Lunge im Falle einer Entzündung nachzugehen, wurden zunächst Zellkultur-Experimente in Gegenwart von Interleukin IL-1 $\beta$  und aufgereinigtem LPS als exogenem Pyrogen durchgeführt. IL-1 $\beta$  wurde bereits hinreichend als proinflammatorisches Zytokin beschrieben, welches als zentraler Botenstoff des Organismus in Reaktion auf exogene Noxen angesehen werden kann [Rathinam *et al.* 2012]. Bronchiale Epithelzellen besitzen einen Rezeptor für IL-1 $\beta$  [Parker und Prince 2011] und sind weiterhin über den *toll-like receptor 4* (TLR-4) durch LPS von Bakterien stimulierbar [Romanovsky *et al.* 2006]. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass nach Stimulation von A549 Zellen, entweder mittels ansteigender IL-1 $\beta$ - oder LPS-Konzentrationen, die lösliche Isoform PolySia-NCAM-110 proportional zu den jeweiligen Konzentrationen dieser Substanzen in den Zellkulturüberständen nachgewiesen werden konnte. Offensichtlich wurde im Zuge einer induzierten Entzündungsreaktion (*via* IL-1 $\beta$  bzw. LPS) der Membrananker von PolySia-NCAM proteolytisch abgespalten, um die verbleibende Ektodomäne in den Überstand bzw. in das Bronchiallumen abzugeben. Da der intrazelluläre PolySia-Spiegel nach Stimulation nicht nennenswert anstieg, ist davon auszugehen, dass während eines Entzündungszustandes die abgespaltene PolySia-Menge direkt von den Zellen nachgebildet wurde. Der Vorgang, bei dem Transmembranproteine in einen löslichen und einen weiterhin membrangebundenen Teil gespalten werden, wird *ectodomain-shedding* genannt. Er konnte bereits für neuronale Zellen und für verschiedene pathologische Vorgänge wie Zelldegeneration, Entzündungen und Onkogenese beschrieben werden [Dello Sbarba und Rovida 2002; Secher 2010]. Auch während der Morbus Alzheimer-Pathogenese spielt z.B. das *ectodomain-shedding* eine Schlüsselrolle. Das Amyloid-Precursor-Protein (APP) ist ein Typ I-Transmembranprotein, welches einen Abschnitt enthält, der als  $\beta$ -Amyloid-Peptid (A $\beta$ -Peptid) bezeichnet wird. Während sogenannte  $\alpha$ -Sekretasen, die zur Familie der Metalloproteasen gehören, das APP innerhalb dieses A $\beta$ -Peptids schneiden (physiologische Regulation), durchtrennt eine  $\beta$ -Sekretase das APP

außerhalb des A $\beta$ -Peptid-Bereiches (fehlgeleitete – und damit pathologische Regulation). Ein drittes Enzym spaltet im weiteren Verlauf – unabhängig davon, ob zuvor die  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Sekretase das APP geschnitten hat, – den APP-Rest innerhalb der Transmembrandomäne. Dieser Schnitt führt in der pathologischen Situation zur kompletten Freisetzung des  $\beta$ -Amyloids, welches wiederum zur Ausbildung der Alzheimer-typischen Proteinplaques führt (Lichtenthaler 2006). Dieses Beispiel soll aufzeigen, dass sich positive Eigenschaften von Proteasen unter pathologischen Umständen in negative Effekte umkehren können.

Im Falle von neuronalen Zellen wurde das NCAM *ectodomain-shedding* bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben, wobei mehrere Mechanismen zur Abspaltung der extrazellulären Domäne von NCAM diskutiert werden. (i) Ein Sekretionsmechanismus wurde bereits 1987 von Bock und Mitarbeitern als Möglichkeit zur Freisetzung von löslichem NCAM aufgezeigt. Dabei wurde angenommen, dass das Protein nach Synthese im Golgi-Apparat gar nicht erst in die Zellmembran eingebaut wird, sondern direkt sekretiert wird [Bock *et al.* 1987]. (ii) Eine weitere Studie zeigte, dass die beiden transmembran-gebundenen-Isoformen von NCAM (NCAM-180 und NCAM-140) gemeinsam mit dem gebundenen Membrananker in voller Länge als lösliche Formen abgegeben werden können [Olsen *et al.* 1993]. (iii) Die enzymatische Abspaltung der extrazellulären NCAM-Domäne durch Proteasen ist der bislang am besten charakterisierte Mechanismus. Dabei wurde anhand von Gehirnhomogenaten festgestellt, dass es sich bei den involvierten Proteasen um Metalloproteasen handeln muss [Diestel *et al.* 2005; Hubschmann *et al.* 2005]. Metalloproteasen gehören zur Superfamilie der zinkabhängigen Metzinkine und werden weiter in Matrixmetalloproteasen (MMPs) und in ADAM ( *$\alpha$  disintegrin and a metalloprotease*) Vertreter unterteilt.

Im Hinblick auf lösliches NCAM wurden in oben genannten Studien Western Blot-Analysen der Hirnhomogenate durchgeführt, in welchen die lösliche NCAM-110-Isoform detektiert werden konnte. Die Bildung dieses Fragments wurde erfolgreich unterbunden, wenn eine Behandlung mit verschiedenen Metalloprotease-Inhibitoren vorangeschaltet wurde, was zu der Annahme

fürhte, dass proteolytisches NCAM-*shedding* durch eine Metalloprotease vermittelt wird [Diestel *et al.* 2005; Hubschmann *et al.* 2005; Hinkle *et al.* 2006], zumal Serin- und Cystein-Protease Inhibitoren nicht in der Lage waren, die Freisetzung der NCAM-Ektodomäne zu unterbinden. Hinkle und Mitarbeiter spezifizierten dieses Ergebnis noch insofern, als sie durch Ausschlussverfahren feststellen konnten, dass ein Metalloprotease-Vertreter aus der ADAMs Familie für das NCAM-*ectodomain-shedding* verantwortlich war und nicht ein Mitglied der Familie der MMPs [Hinkle *et al.* 2006].

Um die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation in den Kontext der oben genannten Forschungsergebnisse einordnen zu können, wurde eine Studie mit dem Metalloprotease-Inhibitor TAPI-2 (*TNF- $\alpha$  Protease Inhibitor*) durchgeführt. Dieser Inhibitor gilt als TACE (*TNF- $\alpha$  converting enzyme*)-spezifischer Inhibitor, zeigt jedoch auch Wirkung gegenüber anderen ADAMs sowie Sekretasen. TACE ist ein 70 kDa Enzym, welches ebenfalls zur ADAMs-Familie gehört und in der Literatur auch häufig als ADAM 17 bezeichnet wird [Cerretti 1999]. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 34 zusammengefasst und zeigen, dass eine LPS-vermittelte Freisetzung von NCAM-110 durch den Inhibitor TAPI-2 verhindert werden kann. Dieses Resultat lässt sich insofern mit bereits publizierten Studien in Einklang bringen, als nun postuliert werden kann, dass das proteolytische *ectodomain-shedding* von PolySia-NCAM durch eine Metalloprotease der ADAMs-Familie im Falle einer Entzündungsreaktion von bronchialen Epithelzellen induziert wird, was zur Freisetzung der löslichen NCAM-110 Isoform führt.

### **5.3 Detektion von PolySia-NCAM in entzündlichem Lungengewebe**

Eine Gruppe aus den Niederlanden veröffentlichte 2011 eine Studie, in welcher ein möglicher Zusammenhang zwischen der Lungenkrankheit COPD und der Metalloprotease ADAM 17/TACE untersucht wurde [Heijink *et al.* 2011]. Die Pathogenese der COPD ist gekennzeichnet durch ein Zusammenspiel unterschiedlicher Noxen, wobei eine chronische Entzündungsreaktion die

Grundlage dieser Krankheit darstellt. Damit einhergehend wurde bereits in mehreren Studien gezeigt, dass erhöhte IL-1 $\beta$  Spiegel in COPD-Gewebe nachweisbar waren [Rusznak *et al.* 2000; Chung 2001; van Eeden *et al.* 2005; Doz *et al.* 2008; Churg *et al.* 2011; Heijink *et al.* 2011]. Die bislang erzielten Ergebnisse dieser Doktorarbeit, sowie vorangegangene Arbeiten anderer Forschergruppen [Churg *et al.* 2011; Mocchegiani *et al.* 2012] bezüglich der Erhöhung des IL-1 $\beta$  Spiegels und eines durch Metalloproteasen vermittelten *ectodomain-shedding* in COPD-Gewebe legten nahe, die Frage nach dem PolySia-Status in Gewebe von Patienten mit COPD näher zu untersuchen. In einem ersten Schritt konnte, anknüpfend an bereits erzielte Ergebnisse der Arbeitsgruppe Prof. Geyer, bestätigt werden, dass generell die PolySia-Menge in Gewebe von COPD-Patienten höher ist als in Donor-Gewebe. Histologische Untersuchungen ergaben zusätzlich, dass PolySia-NCAM in einer höheren Anzahl von Zellen des erkrankten Bronchialepithels vorkam, während es im physiologischen Epithel nur vereinzelt nachweisbar war (Abbildung 25). Einhergehend mit den mRNA-Analysen von A459-Zellen konnte in vorangegangenen Versuchen (Sandra Müller, *cand. med.*, AG Prof. Geyer) mittels PCR belegt werden, dass der mRNA-Spiegel der beiden Polysialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV in COPD-Gewebe im Vergleich zu Donor-Gewebe deutlich erhöht war. Dabei ist allerdings zu beachten, dass im Falle der Transferase ST8SialIV die Expression deutlich erhöht vorlag, unabhängig von physiologischem oder pathologisch-verändertem Gewebe, was darauf schließen lässt, dass ST8SialIV die hauptverantwortliche Polysialyltransferase im humanen Lungenepithel ist. Dieses Ergebnis bestätigt die PCR-Analyse von A549-Zellen, in der die mRNA von ST8SialIV ebenfalls als dominierend in diesen Zellen nachgewiesen wurde (Abbildung 18). Im zentralen Nervensystem (ZNS), wo NCAM als Hauptakzeptor für Polysialinsäure gilt, wirken ST8SialII und ST8SialIV jedoch synergistisch im Hinblick auf die PolySia-Synthese [Angata und Fukuda 2003]. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Gerardy-Schahn (Medizinische Hochschule Hannover) konnte dagegen festgestellt werden, dass beispielsweise im Falle des synaptischen Zelladhäsionsmoleküls SynCAM die

Polysialylierung des Proteins nur über die Transferase ST8SialII erfolgt. Neuere Arbeiten entwickelten mittlerweile die Hypothese, dass die Polysialyltransferase ST8SialIV überwiegend in immunmodulatorische Prozesse eingebunden ist, daher auch im Thymus exprimiert wird und dort je nach Bedarf durch Regulationsprozesse des körpereigenen Immunsystems gesteuert werden kann [Curreli *et al.* 2007; Drake *et al.* 2008; Drake *et al.* 2009]. In unseren Arbeiten konnte die Transferase ST8SialIV ebenfalls als dominierend sowohl im physiologischen als auch im pathologisch-veränderten respiratorischen Epithel detektiert werden. Dies lässt, zusammen mit bereits publizierten Ergebnissen, die Vermutung zu, dass PolySia, und die Polysialyltransferase ST8SialIV in der Lunge immunmodulatorische Aufgaben erfüllen.

Um neben der erhöhten PolySia-Expression in COPD-Gewebe auch die involvierte NCAM-Isoform nachzuweisen, wurden entsprechende Western Blot-Analysen durchgeführt, welche den Nachweis der bereits in entzündlichen Prozessen nachgewiesenen NCAM-110 Isoform in Gewebe von COPD-Patienten erbrachte, wie bei Donoren wurde zusätzlich auch die NCAM-140 Isoform nachgewiesen (Abbildung 25).

Um dieses *in vivo* Ergebnis zu verifizieren, wurde Lungengewebe von Bleomycin-behandelten Mäusen (1.4.4) auf Anwesenheit von PolySia bzw. PolySia-NCAM untersucht. Die frühe Phase der Bleomycin-induzierten Immunantwort der Lunge beinhaltet eine Entzündungsreaktion aufgrund des ausgelösten oxidativen Stresses sowie einer daraus resultierenden Epithelverletzung. Die Zahl der Immunzellen steigt von Tag 0 bis Tag 7 nach Bleomycin-Gabe drastisch an. Pro-inflammatorischen Zytokine (darunter auch IL-1 $\beta$ ) erreichen zwischen Tag 4 und Tag 7 nach Bleomycin-Verabreichung ihr Maximum und dienen damit als frühe Entzündungsmarker [Nagano *et al.* 2006; Saito *et al.* 2008]. Eine durchgeführte Vergleichsanalyse von Lungengewebe Bleomycin-behandelter Mäuse vom Tag 7 nach Substanzgabe und unbehandeltem Lungengewebe ergab sowohl eine gesteigerte PolySia-Expression im inflammatorischen Gewebe im Gegensatz zum

physiologischen Gewebe als auch die Detektion der NCAM-110 Isoform im Entzündungsmodell (Abbildung 26).

Um der Frage nachzugehen, ob die Freisetzung von NCAM-110 das gleichzeitige Vorhandensein einer entzündlichen Immunantwort bedingt, wurden parallel entsprechende Analysen an fibrotischem, nicht-entzündlichem Lungengewebe von IPF-Patienten durchgeführt. Es zeigte sich, dass PolySia während der IPF-Pathogenese im Vergleich zu physiologischem Donor-Gewebe stärker exprimiert vorlag, allerdings konnte in beiden Fällen nur die membranständige NCAM-140 Isoform nachgewiesen werden (Abbildung 28). Resümierend kann damit festgestellt werden, dass sowohl *in vitro* (Zellkulturmodell) als auch *in vivo* (COPD- und Bleomycin-Gewebe) PolySia-NCAM-140 ein *ectodomain-shedding* durch eine Metalloprotease der ADAMs-Familie in Folge von Entzündungsreaktionen erfährt, welches in der Freisetzung der löslichen NCAM-110 Isoform resultiert.

#### **5.4 PolySia-NCAM 110 als Gegenspieler der Histon- bzw. NET-induzierten Zytotoxizität**

Lösliche NCAM-Fragmente wurden bereits in verschiedenen Medien, wie Zellkulturüberständen [Rutishauser *et al.* 1976], zellfreien Überständen von Hirnhomogenaten [Gennarini *et al.* 1984] und in verschiedenen Körperflüssigkeiten, wie Serum und Fruchtwasser [Jorgensen und Norgaard-Pedersen 1981; Ibsen *et al.* 1983] detektiert. Das im Rahmen dieser Dissertation nachgewiesene Fragment NCAM-110 stellt dabei den am häufigsten anzutreffenden Typus der löslichen NCAM-Varianten dar [Bock *et al.* 1987; Nybroe *et al.* 1989]. Um die biologischen Funktionen des löslichen NCAM-110 während einer Entzündungsreaktion zu evaluieren, wurden Zellkulturexperimente mit A549-Zellen durchgeführt. Dabei wurde insbesondere der Zusammenhang zwischen löslichem NCAM-110 und der von neutrophilen Granulozyten-vermittelten Immunantwort während eines inflammatorischen Prozesses genauer untersucht. Während einer Entzündungsreaktion bedienen

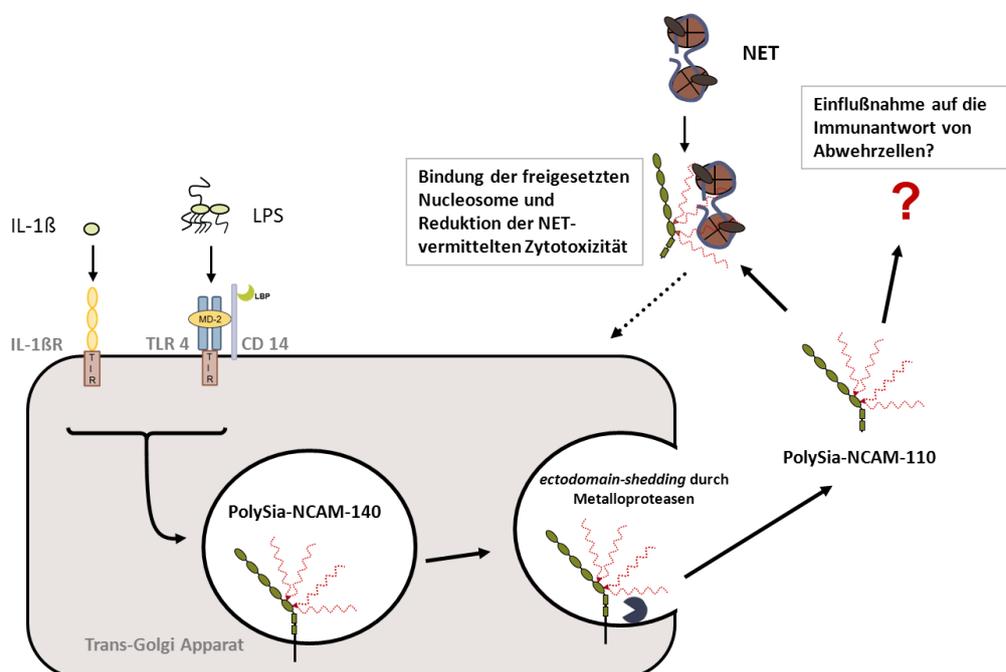
sich neutrophile Granulozyten verschiedenster Maßnahmen, um Eindringlinge zu bekämpfen (1.4.3.1): (i) Phagozytose, (ii) Sekretion antimikrobieller Proteine und Peptide, und (iii) die Bildung von NET. Ein entscheidender Nachteil dieser NET-Formation ist allerdings, dass sie nicht nur gegenüber den invasierten Mikroorganismen sondern auch gegenüber körpereigenen Epithelzellen zytotoxisch wirkt [Fuchs *et al.* 2011; Saffarzadeh *et al.* 2012]. In einer bereits durchgeführten Studie konnte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Preissner (Biochemisches Institut, Justus-Liebig Universität Gießen) bereits gezeigt werden, dass PolySia (hier in Form von Colominsäure aus *E. coli*) mit den, im Zuge einer NET-Formation freigesetzten Histonen interagieren kann, was die Zytotoxizität der Histone gegenüber körpereigenen Zellen herabsetzte. Auf diese Resultate aufbauend wurde in der vorliegenden Dissertation in einem ersten Schritt lösliches PolySia-NCAM-110 in A549-Zellen durch Gabe von LPS bzw. IL-1 $\beta$  induziert und in einem weiteren Schritt aufgereinigte Histone zugegeben. Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, konnte die Zytotoxizität der extrazellulären Histone sowohl durch eine vorherige IL-1 $\beta$ - als auch durch eine LPS-Stimulation abgemildert werden. Um diesen Effekt ausschließlich dem löslichen PolySia-NCAM-110 zuschreiben zu können, wurden dessen PolySia-Ketten nach Stimulation durch IL-1 $\beta$  bzw. LPS mit Hilfe des Enzyms EndoN hydrolytisch abgespalten und die Zellen ebenfalls mit extrazellulären Histonen behandelt. Da die Zytotoxizität der Histone gegenüber A549-Zellen nach EndoN-Behandlung wieder deutlich zunahm (Abbildung 30 B und C), kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den PolySia-NCAM-110 Interaktionen mit extrazellulären Histonen um eine PolySia-spezifische Wechselwirkung handelte. Die Inhibition der Zytotoxizität durch lösliches PolySia-NCAM-110 galt jedoch nicht nur für Histone, sondern auch für die komplette NET-Formation (Abbildung 33). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die NET-Inaktivierung durch PolySia-Ketten auf Glykoproteinen eine wichtige Rolle während der inflammatorischen Immunantwort spielt, durch welche die Zellen vor einer überschießenden Reaktion des angeborenen Immunsystems geschützt werden. Polysialylierte Glykokonjugate, die bereits auf Monozyten und Dendritischen Zellen

nachgewiesen wurden, wirken möglicherweise in ähnlicher Weise als Schutzmechanismus gegenüber immunmodulatorisch-generierten Abwehrmaßnahmen, wie z.B. NET. Die Interaktion des löslichen PolySia-NCAM-110 mit Immunzellen könnte möglicherweise einen Therapieansatz bei Krankheiten darstellen, die geprägt sind von den zytotoxischen Nebeneffekten einer neutrophilen NET-Antwort, wie z.B. dem Systemischen Lupus Erythematosus oder der Zystischen Fibrose [Marcos *et al.* 2010; Villanueva *et al.* 2011]. Eine mögliche therapeutische Maßnahme könnte die Stimulation der körpereigenen Polysialylierung durch Sialinsäure-Vorläuferstrukturen darstellen, welche in orientierenden Vorversuchen bereits im Rahmen dieser Dissertation im Zellkulturmodell untersucht wurde. Hier wurden die A549-Zellen mit dem Vorläufermolekül ManNAc behandelt, welches auch bei der natürlichen Polysialinsäure-Biosynthese als Ausgangsbaustein dient (1.1.2.1). Dabei wurde die per-acetylierte Variante gewählt, da diese besser von Zellen aufgenommen werden kann [Du *et al.* 2009]. Die erzielten Ergebnisse belegen, dass zum einen die Polysialylierung nach ManNAc-Behandlung ansteigt (Abbildung 31), und zum anderen die ManNAc-behandelten, IL-1 $\beta$ - bzw. LPS-stimulierten A549-Zellen eine verringerte Sensitivität gegenüber einer NET-vermittelten Zytotoxizität aufweisen (Abbildung 32). Ein ähnlicher anti-zytotoxischer Effekt gegenüber extrazellulären Histonen wurde kürzlich für Heparin beschrieben [Fuchs *et al.* 2011].

## 5.5 Mögliche Rolle von PolySia-NCAM-110 im Entzündungsgeschehen

Die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese der PolySia-NCAM-110-vermittelten anti-toxischen Wirkung wird in Abbildung 35 dargestellt, welche die bislang erzielten Ergebnisse in einer Hypothese zusammenfasst. Diese besagt, dass PolySia-NCAM nach Gabe eines Entzündungsstimulus (IL-1 $\beta$  oder LPS) in bronchialen Epithelzellen hochreguliert wird und/oder durch proteolytische Spaltung mit Hilfe einer Metalloprotease der Familie der ADAMs (möglicherweise ADAM 17/TACE) vermehrt ein *ectodomain-shedding* erfährt. Die resultierende lösliche NCAM-110 Isoform kann ihrerseits wiederum mit exogenen und/oder

endogenen Noxen (Histone / NET) interagieren und damit den zytotoxischen Effekt auf die eigene Zelle herabsetzen. Eine weitere Überlegung, wie die PolySia-NCAM-110 Isoform die Immunantwort regulieren könnte, zielt darauf ab, dass die proteolytisch gespaltene lösliche Form eine Vielzahl an verschiedenen Zellen des angeborenen Immunsystems innerhalb der Lunge erreichen kann. Sowohl Monozyten als auch Makrophagen tragen auf ihrer Oberfläche sogenannte *sialic acid binding Ig-like lectins* (Siglecs), die Sialinsäuren binden können. Siglecs sind transmembranständige Proteine und gehören zu der Immunglobulin Superfamilie [Crocker 2005; Crocker *et al.* 2007]. Wang und Mitarbeiter berichteten 2010 über eine Siglec-11 Variante auf neuronaler Mikroglia, über die PolySia-NCAM binden und in einem *cross-linking*-Prozess mit dem TLR 4-Rezeptor und daran gebundenem LPS die Transkription des IL-1 $\beta$  codierenden Genabschnittes beeinflussen kann [Wang und Neumann 2010].



**Abbildung 35** Arbeitsmodell zur Freisetzung von PolySia-NCAM-110

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Meinhardt (Institut für Anatomie, Justus-Liebig-Universität Giessen) zeigten erste Ergebnisse, dass

induziertes, affinitätschromatographisch aufgereinigtes PolySia-NCAM-110 in peripheren Monozyten des Blutes die Ausschüttung des Interleukins IL-6 hervorrufen kann. Diesem Entzündungsmediator wird insofern eine ganz besondere Rolle zuteil, als IL-6 eine Schlüsselfunktion als Bindeglied zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem im Kontext einer Entzündungsreaktion inne hat [Jones 2005]. Auch wenn die angesprochenen Untersuchungen noch weiter vertieft werden müssen, zeigten diese Vorversuche, dass nach der Induktion von PolySia-NCAM-110 durch LPS, proportional zur LPS-Konzentration, eine erhöhte Menge an IL-6 detektiert werden konnte. Um diesen Befund zu überprüfen und zu verifizieren, müssen weitere Versuche durchgeführt werden.

Abschließend lassen sich die erzielten Ergebnisse wie folgt zusammenfassen: In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der humanen Lunge NCAM-140 in polysialylierter Form in Bronchialepithelzellen vorliegt und die Polysialyltransferase ST8SialIV als hauptverantwortlich für die Polysialinsäure-Biosynthese in den genannten Zellen bezeichnet werden kann. Nach Stimulation der Bronchialepithelzellen mit exogenen Substanzen wie LPS (über TLR 4) oder endogenen Substanzen wie IL-1 $\beta$  (über IL-1R) wird der PolySia-Spiegel hochreguliert und die PolySia-NCAM-140 Isoform erfährt in einem *ectodomain-shedding* durch eine Metalloprotease der ADAMs-Familie eine proteolytische Spaltung, die in dem löslichen PolySia-NCAM-110 Fragment resultiert. Diese lösliche PolySia-NCAM-110 Isoform ist wiederum in der Lage, mit zytotoxischen Stoffen, die während einer inflammatorischen NET-generierten Immunantwort freigesetzt werden, zu interagieren und somit den zytotoxischen Nebeneffekt für die Epithelzellen abzumildern. Weiterhin könnte lösliches PolySia-NCAM-110 über Rezeptoren auf anderen Immunzellen im respiratorischen System diese zur Sekretion weiterer pro-inflammatorischer Zytokine oder Interleukine anregen. Alles in allem präsentiert sich lösliches PolySia-NCAM-110 als ein neues Werkzeug des fein regulierten, angeborenen Immunsystems in der Lunge.

## 6 Zusammenfassung

Bei Polysialinsäure (PolySia) handelt es sich um ein Homopolymer aus  $\alpha$ 2,8-verknüpften *N*-Acetylneuraminsäuren, welches überwiegend als posttranslationale Modifikation des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM in Säugetieren vorliegt. Durch die hohe Anzahl an negativ geladenen Carboxylgruppen erschwert PolySia die Zelladhäsion und spielt damit eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Zellkontakten und Migrationsprozessen. Die große Bedeutung von PolySia wird im Zuge eines *knock out*-Modells deutlich, in dem die Abwesenheit des Moleküls zu einem letalen Phänotyp in der Maus führte. Während die funktionelle Relevanz von PolySia im Nervensystem bereits vielfach untersucht wurde, ist deren Rolle in anderen Organsystemen noch weitgehend ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde PolySia-NCAM in der humanen, adulten Lunge vorwiegend auf bronchialen Epithelzellen detektiert. Unter Zuhilfenahme eines Zellkulturmodells konnte weiterhin gezeigt werden, dass Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) oder Lipopolysaccharid (LPS) von gram-negativen Bakterien zu einem *ectodomain shedding* des Glykoproteins führen, was wiederum die Freisetzung von löslichem PolySia-NCAM-110 induziert. Darüber hinaus konnten auch in Lungengewebe von Patienten, die an der chronisch-inflammatorischen Lungenerkrankung COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*) litten, welche mit einem erhöhten IL-1 $\beta$ -Spiegel einhergeht, gesteigerte Mengen an löslichem PolySia-NCAM-110 detektiert werden. Letzteres konnte auch in entzündlichem Gewebe Bleomycin-behandelter Mäuse nachgewiesen werden, nicht jedoch in der fibrosierenden, nicht-entzündlichen Lungenerkrankung IPF (Idiopathisch pulmonale Fibrose). Zusätzlich wurde gezeigt, dass lösliches PolySia-NCAM-110 direkt mit extrazellulären Histonen sowie dem von neutrophilen Granulozyten produzierten NET (*neutrophil extracellular traps*) in Wechselwirkung tritt und somit in der Lage ist, deren Zytotoxizität für körpereigene Zellen abzumildern. Ausgehend von diesen Daten kann postuliert werden, dass lösliches PolySia-NCAM-110, welches im Zuge einer inflammatorischen Immunantwort des Lungengewebes durch *ectodomain-shedding* freigesetzt wird, eine Rolle als immunmodulatorisches Agens im Kontext der angeborenen Immunität der Lunge spielen könnte.

## 7 Summary

Polysialic acid (polySia), a homopolymer consisting of  $\alpha$ 2,8-linked *N*-acetyl neuraminic acid residues, is mainly present as a posttranslational modification of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in mammals. Due to its high number of negatively charged carboxyl groups polySia counteracts cell adhesion and plays therefore a crucial role in the regulation of cell contact/repulsion as well as migration processes. The importance of polySia becomes apparent using a knock out model, where the absence of polySia results in a lethal phenotype in mice. While the functional impact of polySia in the neuronal system has been considerably studied, the biological relevance of polysialylation in other organ systems is less established.

Within this doctoral thesis polySia-NCAM was prevalently detected on bronchial epithelial cells in the adult, human lung. Using a cell culture model, it could be further shown, that interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) or lipopolysaccharide (LPS) from gram-negative bacteria induced an ectodomain shedding of the glycoprotein, resulting in a release of soluble polySia-NCAM-110. Moreover this soluble form could be similarly detected in lung tissue of patients suffering from COPD (chronic obstructive pulmonary disease), which comes along with high-levels of IL-1 $\beta$ . PolySia-NCAM-110 is also present in inflammable tissue of bleomycin-treated mice, but not in fibrotic tissue from patients with IPF (idiopathic pulmonary fibrosis).

Intriguingly, polySia-NCAM interacts with extracellular histones as well as NET (neutrophil extracellular traps) generated by neutrophil granulocytes, thus decreasing their cytotoxic effects on endogenous epithelial cells. Based on these observations it can be assumed that soluble polySia-NCAM-110, which is released by ectodomain-shedding during an inflammatory response of lung tissue, may represent a novel player within the scenario of the innate immunity of the lung.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

AEZ	alveoläre Epithelzellen
ADAM	<i>a disintegrin and a metalloprotease</i>
AK	Antikörper
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
AP	alkalische Phosphatase
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CAM	<i>cell adhesion molecule</i>
CC10	<i>Clara-cell protein 10</i>
CD	Oberflächenantigen (cluster of differentiation)
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMB	1,2-Diamino-4,5-Methylendioxybenzol
DMSO	Dimethylsulfoxid
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EndoN	Endoneuraminidase N
FCS	fetales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
GNE	UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol

---

h	Stunde
HCl	Salzsäure
HFH4	<i>Hepatocyte nuclear factor-3/forkhead homologue 4</i>
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IL	Interleukin
IP	Affinitätsaufreinigung
kDa	kilo Dalton
KRT	Zytokeratin
LBP	LPS-Bindeprotein
LPS	Lipopolysaccharid
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>
ManNAc	N-Acetyl-D-mannosamine
min	Minute
MPP	Matrixmetalloprotease
MS	Massenspektrometrie
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene-88</i>
NCAM	neurales Zelladhäsionsmolekül
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of B-cells</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NRP-2	Neuropilin-2
OT	Objektträger
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNGaseF	N-Glycosidase F
PolySia	Polysialinsäure

PolySia-NCAM	polysialyliertes NCAM
Pro-SP-C	Prosurfactant-Protein C
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PST-Domäne	Polysialyltransferasen-Domäne
RMS	<i>rostral migratory stream</i>
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
rt-PCR	<i>real-time PCR</i>
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SiaM	Sialylierungsmotiv
SVZ	Subventrikuläre Zone
TACE	<i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math>-converting enzyme</i>
TAPI	<i>TNF-<math>\alpha</math> Protease Inhibitor</i>
TEMED	N,N,N`N`-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-beta</i>
TGN 38	Trans-Golgi Netzwerkprotein 38
TIR	Toll/IL-1R
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TM	Transmembrandomäne
TNF- $\alpha$	<i>tumor-necrose-factor-alpha</i>
TOF	<i>time of flight</i>
Tween	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
VS	very small
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Strukturbeispiel $\alpha$ 2,8-verknüpfter <i>N</i> -Acetylneuraminsäure-Einheiten .....	2
Abbildung 2	Sialinsäure-Biosynthese [Schauer 2004].....	3
Abbildung 3	Schematische Darstellung eines polysialylierten <i>N</i> -Glykans .....	5
Abbildung 4	Einfluss von PolySia auf Zelladhäsionsvorgänge.....	6
Abbildung 5	Aufbau der Hauptisofornen des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM .....	9
Abbildung 6	Der TLR4/IL-1R-Signalweg.....	17
Abbildung 7	Die intrazelluläre Bildung der NET-Formation [Brinkmann und Zychlinsky 2007].....	20
Abbildung 8	Western Blot-Analyse polysialylierter Proteine in humanem Lungengewebe.....	52
Abbildung 9	Kettenlängenbestimmung von PolySia mittels milder DMB-HPLC...54	
Abbildung 10	MALDI-TOF-MS Analyse zur Identifizierung polysialylierter Proteine aus Lungenhomogenaten .....	55
Abbildung 11	Western Blot-Analyse zur Detektion von polySia-NCAM-140.....	56
Abbildung 12	Immunhistologischer Nachweis von PolySia-NCAM in seriellen Paraffinschnitten der humanen Lunge .....	57
Abbildung 13	Determination des PolySia-positiven Zelltyps in humanem Lungenepithel .....	58
Abbildung 14	Immunhistologische Darstellung von PolySia-exprimierenden und proliferierenden Zellen im Bronchialepithel .....	59
Abbildung 15	PolySia-NCAM Nachweis in der A549-Lungenepithel-Zelllinie durch Western Blot-Analyse .....	61
Abbildung 16	PolySia-NCAM Nachweis mittels Immunfluoreszenz .....	62
Abbildung 17	Subzelluläre Lokalisation von PolySia-NCAM mittels Immunfluoreszenz .....	63
Abbildung 18	Nachweis der Polysialyltransferasen in A549-Zellen durch RT-PCR.64	
Abbildung 19	Western Blot-Analyse nach IL-1 $\beta$ -Stimulation von A549-Zellen .....	65
Abbildung 20	PolySia-Nachweis in stimulierten und unstimulierten methanol-fixierten A549-Zellen durch Immunfluoreszenz .....	66
Abbildung 21	Western Blot-Analyse zur PolySia-Detektion nach LPS-Stimulation von A549-Zellen .....	67
Abbildung 22	Detektion von NCAM durch Western Blot-Analyse nach LPS-Stimulation von A549-Zellen .....	68

Abbildung 23	Bestimmung der PolySia-Menge in COPD-Gewebe im Vergleich zu Donor-Gewebe mittels Western Blot-Analyse .....	69
Abbildung 24	Vergleich der PolySia-Expression in COPD-Gewebe und Donor-Gewebe mittels Immunhistochemie. ....	70
Abbildung 25	Nachweis von PolySia-NCAM in COPD-Gewebe im Vergleich zu Donor-Gewebe mittels Western Blot-Analyse .....	71
Abbildung 26	Untersuchung der PolySia- und NCAM Expression in Lungengewebe Bleomycin-behandelter Mäuse im Vergleich zu Kontroll-Gewebe mittels Western Blot-Analyse .....	72
Abbildung 27	Analyse der PolySia-Expression in IPF-Gewebe im Vergleich zu Donor-Gewebe mittels Western Blot. ....	74
Abbildung 28	Untersuchung des PolySia-NCAM-Status in IPF-Gewebe mittels Western Blot-Analyse .....	75
Abbildung 29	LDH-Zytotoxizitätstest nach Behandlung von A549-Zellen mit extrazellulären Histonen .....	76
Abbildung 30	LDH-Zytotoxizitätstest nach Behandlung von A549-Zellen mit extrazellulären Histonen nach vorheriger Stimulation durch IL-1 $\beta$ und LPS .....	77
Abbildung 31	Western Blot Analyse nach Behandlung von A549-Zellen mit Sialinsäure-Vorläuferstrukturen .....	79
Abbildung 32	LDH-Zytotoxizitätstest von extrazellulären Histonen auf A549-Zellen nach Stimulation durch Sialinsäure-Vorläuferstrukturen .....	80
Abbildung 33	LDH-Zytotoxizitätstest nach Behandlung von A549-Zellen mit NET nach Stimulation durch LPS .....	81
Abbildung 34	Überprüfung einer möglichen Inhibitorwirkung von TAPI-2 bei der NCAM-110 Freisetzung .....	83
Abbildung 35	Arbeitsmodell zur Freisetzung von PolySia-NCAM-110 .....	94

## 10 Literaturverzeichnis

- Abraham, E. (2003). "Neutrophils and acute lung injury." Crit Care Med **31**(4 Suppl): S195-9.
- Advani, R. (2011). "Optimal therapy of advanced Hodgkin lymphoma." Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2011**: 310-6.
- Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- Albach, C., E. Damoc, T. Denzinger, M. Schachner, M. Przybylski and B. Schmitz (2004). "Identification of N-glycosylation sites of the murine neural cell adhesion molecule NCAM by MALDI-TOF and MALDI-FTICR mass spectrometry." Anal Bioanal Chem **378**(4): 1129-35.
- Alghamdi, A. S. and D. N. Foster (2005). "Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps." Biol Reprod **73**(6): 1174-81.
- Anderson, K. V., G. Jurgens and C. Nusslein-Volhard (1985). "Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product." Cell **42**(3): 779-89.
- 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): 36808-17.
- 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): 18594-601.
- Angata, T. and A. Varki (2002). "Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective." Chem Rev **102**(2): 439-69.
- Barnes, P. J. (2000). "Mechanisms in COPD: differences from asthma." Chest **117**(2 Suppl): 10S-4S.
- Barnes, P. J. (2004). "Small airways in COPD." N Engl J Med **350**(26): 2635-7.
- Bax, M., S. J. van Vliet, M. Litjens, J. J. Garcia-Vallejo and Y. van Kooyk (2009). "Interaction of polysialic acid with CCL21 regulates the migratory capacity of human dendritic cells." PLoS One **4**(9): e6987.
- Benson, V. and M. A. Marano (1998). "Current estimates from the National Health Interview Survey, 1995." Vital Health Stat **10**(199): 1-428.
- Beutler, B. (2003). "Innate immune responses to microbial poisons: discovery and function of the Toll-like receptors." Annu Rev Pharmacol Toxicol **43**: 609-28.
- Beutler, B. and E. T. Rietschel (2003). "Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin." Nat Rev Immunol **3**(2): 169-76.
- 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): 33-6.
- Bonfanti, L. (2006). "PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis." Prog Neurobiol **80**(3): 129-64.

- 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): 5079-83.
- Bowie, A. and L. A. O'Neill (2000). "The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products." *J Leukoc Biol* **67**(4): 508-14.
- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch and A. Zychlinsky (2004). "Neutrophil extracellular traps kill bacteria." *Science* **303**(5663): 1532-5.
- Brinkmann, V. and A. Zychlinsky (2007). "Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs." *Nat Rev Microbiol* **5**(8): 577-82.
- Brummendorf, T. and F. G. Rathjen (1995). "Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily." *Protein Profile* **2**(9): 963-1108.
- Ceroni, A., K. Maass, H. Geyer, R. Geyer, A. Dell and S. M. Haslam (2008). "GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans." *J Proteome Res* **7**(4): 1650-9.
- Cerretti, D. P. (1999). "Characterization of the tumour necrosis factor alpha-converting enzyme, TACE/ADAM17." *Biochem Soc Trans* **27**(2): 219-23.
- Chandler, D. B. (1990). "Possible mechanisms of bleomycin-induced fibrosis." *Clin Chest Med* **11**(1): 21-30.
- Cheung, I. Y., A. Vickers and N. K. Cheung (2006). "Sialyltransferase STX (ST8SialI): a novel molecular marker of metastatic neuroblastoma." *Int J Cancer* **119**(1): 152-6.
- Chung, K. F. (2001). "Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease." *Eur Respir J Suppl* **34**: 50s-59s.
- Churg, A., S. Zhou and J. L. Wright (2011). "Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Matrix metalloproteinases in COPD." *Eur Respir J* **39**(1): 197-209.
- 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): 521-5.
- Cremer, H., G. Chazal, C. Goridis and A. Represa (1997). "NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus." *Mol Cell Neurosci* **8**(5): 323-35.
- Cremer, H., R. Lange, A. Christoph, M. Plomann, G. Vopper, J. Roes, R. Brown, S. Baldwin, P. Kraemer, S. Scheff and et al. (1994). "Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning." *Nature* **367**(6462): 455-9.
- Crocker, P. R. (2005). "Siglecs in innate immunity." *Curr Opin Pharmacol* **5**(4): 431-7.
- Crocker, P. R., J. C. Paulson and A. Varki (2007). "Siglecs and their roles in the immune system." *Nat Rev Immunol* **7**(4): 255-66.
- Cunningham, B. A., J. J. Hemperly, B. A. Murray, E. A. Prediger, R. Brackenbury and G. M. Edelman (1987). "Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing." *Science* **236**(4803): 799-806.
- Curreli, S., Z. Arany, R. Gerardy-Schahn, D. Mann and N. M. Stamatou (2007). "Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions." *J Biol Chem* **282**: 30346-56.
- 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): 1497-500.
- 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): 9608-14.
- 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): 1777-84.
- Dinarello, C. A. (1996). "Biologic basis for interleukin-1 in disease." Blood **87**(6): 2095-147.
- Dinarello, C. A. and S. M. Wolff (1993). "The role of interleukin-1 in disease." N Engl J Med **328**(2): 106-13.
- Doherty, D. E. (2004). "The pathophysiology of airway dysfunction." Am J Med **117 Suppl 12A**: 11S-23S.
- Dower, S. K., S. R. Kronheim, T. P. Hopp, M. Cantrell, M. Deeley, S. Gillis, C. S. Henney and D. L. Urdal (1986). "The cell surface receptors for interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta are identical." Nature **324**(6094): 266-8.
- Doz, E., N. Noulin, E. Boichot, I. Guenon, L. Fick, M. Le Bert, V. Lagente, B. Ryffel, B. Schnyder, V. F. Quesniaux and I. Couillin (2008). "Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent." J Immunol **180**(2): 1169-78.
- Drake, P. M., J. K. Nathan, C. M. Stock, P. V. Chang, M. O. Muench, D. Nakata, J. R. Reader, P. Gip, K. P. Golden, B. Weinhold, R. Gerardy-Schahn, F. A. Troy, 2nd and C. R. Bertozzi (2008). "Polysialic acid, a glycan with highly restricted expression, is found on human and murine leukocytes and modulates immune responses." J Immunol **181**(10): 6850-8.
- Drake, P. M., C. M. Stock, J. K. Nathan, P. Gip, K. P. Golden, B. Weinhold, R. Gerardy-Schahn and C. R. Bertozzi (2009). "Polysialic acid governs T-cell development by regulating progenitor access to the thymus." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(29): 11995-2000.
- du Bois, R. M. (2010). "Strategies for treating idiopathic pulmonary fibrosis." Nat Rev Drug Discov **9**(2): 129-40.
- Du, J., M. A. Meledeo, Z. Wang, H. S. Khanna, V. D. Paruchuri and K. J. Yarema (2009). "Metabolic glycoengineering: sialic acid and beyond." Glycobiology **19**(12): 1382-401.
- Durbec, P., C. V. Marcos-Gutierrez, C. Kilkenny, M. Grigoriou, K. Wartiovaara, P. Suvanto, D. Smith, B. Ponder, F. Costantini, M. Saarma and et al. (1996). "GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase." Nature **381**(6585): 789-93.
- Fazeli, M. S., K. Breen, M. L. Errington and T. V. Bliss (1994). "Increase in extracellular NCAM and amyloid precursor protein following induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of anaesthetized rats." Neurosci Lett **169**(1-2): 77-80.
- Figarella-Branger, D. F., P. L. Durbec and G. N. Rougon (1990). "Differential spectrum of expression of neural cell adhesion molecule isoforms and L1 adhesion molecules on human neuroectodermal tumors." Cancer Res **50**(19): 6364-70.
- Finne, J. (1982). "Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain." J Biol Chem **257**(20): 11966-70.

- 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): 1194-8.
- Fuchs, T. A., A. A. Bhandari and D. D. Wagner (2011). "Histones induce rapid and profound thrombocytopenia in mice." Blood **118**(13): 3708-14.
- 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): 31745-51.
- 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 ST8SiaIV." 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. Mühlenhoff 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): 10250-5.
- Gascon, E., L. Vutskits and J. Z. Kiss (2007). "Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons." Brain Res Rev **56**(1): 101-18.
- Gay, N. J. and F. J. Keith (1991). "Drosophila Toll and IL-1 receptor." Nature **351**(6325): 355-6.
- Gennarini, G., M. Hirn, H. Deagostini-Bazin and C. Goridis (1984). "Studies on the transmembrane disposition of the neural cell adhesion molecule N-CAM. The use of liposome-inserted radioiodinated N-CAM to study its transbilayer orientation." Eur J Biochem **142**(1): 65-73.
- Gerardy-Schahn, R. and M. Eckhardt (1994). "Hot spots of antigenicity in the neural cell adhesion molecule NCAM." Int J Cancer Suppl **8**: 38-42.
- Giard, D. J., S. A. Aaronson, G. J. Todaro, P. Arnstein, J. H. Kersey, H. Dosik and W. P. Parks (1973). "In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors." J Natl Cancer Inst **51**(5): 1417-23.
- Gioannini, T. L., A. Teghanemt, D. Zhang, P. Prohinar, E. N. Levis, R. S. Munford and J. P. Weiss (2007). "Endotoxin-binding proteins modulate the susceptibility of bacterial endotoxin to deacylation by acyloxyacyl hydrolase." J Biol Chem **282**(11): 7877-84.
- Grande, N. R., M. N. D. Peao, C. M. d. Sa and A. P. Aguas (1998). "Lung fibrosis induced by bleomycin: Structural changes and overview of recent advances." Scanning Microscopy **12**(3): 487-494.
- Guarino, M., A. Tosoni and M. Nebuloni (2009). "Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition." Hum Pathol **40**(10): 1365-76.
- Gupta, A. K., P. Hasler, W. Holzgreve, S. Gebhardt and S. Hahn (2005). "Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia." Hum Immunol **66**(11): 1146-54.
- 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): 34859-69.
- 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): 727-37.
- Hay, J., S. Shahzeidi and G. Laurent (1991). "Mechanisms of bleomycin-induced lung damage." *Arch Toxicol* **65**(2): 81-94.
- Heijink, I. H., S. M. Brandenburg, J. A. Noordhoek, D. J. Slebos, D. S. Postma and A. J. van Oosterhout (2011). "Role of aberrant metalloproteinase activity in the pro-inflammatory phenotype of bronchial epithelium in COPD." *Respir Res* **12**: 110.
- Hickey, M. J. and P. Kubes (2009). "Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels." *Nat Rev Immunol* **9**(5): 364-75.
- Hildebrandt, H., C. Becker, M. Murau, R. Gerardy-Schahn and H. Rahmann (1998). "Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development." *J Neurochem* **71**(6): 2339-48.
- Hildebrandt, H., M. Muhlenhoff and R. Gerardy-Schahn (2008). "Polysialylation of NCAM." *Neurochem Res*.
- 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): 24313-8.
- Hinkle, C. L., S. Diestel, J. Lieberman and P. F. Maness (2006). "Metalloprotease-induced ectodomain shedding of neural cell adhesion molecule (NCAM)." *J Neurobiol* **66**(12): 1378-95.
- Hinsby, A. M., V. Berezin and E. Bock (2004). "Molecular mechanisms of NCAM function." *Front Biosci* **9**: 2227-44.
- Hirn, M., M. S. Ghandour, H. Deagostini-Bazin and C. Goridis (1983). "Molecular heterogeneity and structural evolution during cerebellar ontogeny detected by monoclonal antibody of the mouse cell surface antigen BSP-2." *Brain Res* **265**(1): 87-100.
- Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda and S. Akira (1999). "Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product." *J Immunol* **162**(7): 3749-52.
- 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): 826-37.
- Husmann, M., T. Pietsch, B. Fleischer, C. Weisgerber and D. Bitter-Suermann (1989). "Embryonic neural cell adhesion molecules on human natural killer cells." *Eur J Immunol* **19**(9): 1761-3.
- Ibsen, S., V. Berezin, B. Norgaard-Pedersen and E. Bock (1983). "Quantification of the D2-glycoprotein in amniotic fluid and serum from pregnancies with fetal neural tube defects." *J Neurochem* **41**(2): 363-6.
- Inoue, S. and Y. Inoue (2001). "Developmental profile of neural cell adhesion molecule glycoforms with a varying degree of polymerization of polysialic acid chains." *J Biol Chem* **276**(34): 31863-70.
- Inoue, S., S. L. Lin, Y. C. Lee and Y. Inoue (2001). "An ultrasensitive chemical method for polysialic acid analysis." *Glycobiology* **11**(9): 759-67.
- Izbicki, G., M. J. Segel, T. G. Christensen, M. W. Conner and R. Breuer (2002). "Time course of bleomycin-induced lung fibrosis." *Int J Exp Pathol* **83**(3): 111-9.
- Janeway, C. A. (2002). *Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

- Jaques, G., B. Auerbach, M. Pritsch, M. Wolf, N. Madry and K. Havemann (1993). "Evaluation of serum neural cell adhesion molecule as a new tumor marker in small cell lung cancer." Cancer **72**(2): 418-25.
- Jones, S. A. (2005). "Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6." J Immunol **175**(6): 3463-8.
- Jorgensen, O. S. and E. Bock (1974). "Brain specific synaptosomal membrane proteins demonstrated by crossed immunoelectrophoresis." J Neurochem **23**(4): 879-80.
- Jorgensen, O. S. and B. Norgaard-Pedersen (1981). "The synaptic membrane D2-protein in amniotic fluid from pregnancies with fetal neural tube defects." Prenat Diagn **1**(1): 3-6.
- Jules-Elysee, K. and D. A. White (1990). "Bleomycin-induced pulmonary toxicity." Clin Chest Med **11**(1): 1-20.
- Kagan, J. C. and R. Medzhitov (2006). "Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling." Cell **125**(5): 943-55.
- Kean, E. L. (1991). "Sialic acid activation." Glycobiology **1**(5): 441-7.
- Kelm, S. and R. Schauer (1997). "Sialic acids in molecular and cellular interactions." Int Rev Cytol **175**: 137-240.
- Kibbelaar, R. E., C. E. Moolenaar, R. J. Michalides, D. Bitter-Suermann, B. J. Addis and W. J. Mooi (1989). "Expression of the embryonal neural cell adhesion molecule N-CAM in lung carcinoma. Diagnostic usefulness of monoclonal antibody 735 for the distinction between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer." J Pathol **159**(1): 23-8.
- Kiss, J. Z. and G. Rougon (1997). "Cell biology of polysialic acid." Curr Opin Neurobiol **7**(5): 640-6.
- 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): 15696-703.
- Kleene, R. and M. Schachner (2004). "Glycans and neural cell interactions." Nat Rev Neurosci **5**(3): 195-208.
- Komminoth, P., J. Roth, P. M. Lackie, D. Bitter-Suermann and P. U. Heitz (1991). "Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule distinguishes small cell lung carcinoma from carcinoids." Am J Pathol **139**(2): 297-304.
- 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**: 371-9.
- Kristiansen, L. V., F. A. Marques, V. Soroka, L. C. Ronn, V. Kiselyov, N. Pedersen, V. Berezin and E. Bock (1999). "Homophilic NCAM interactions interfere with L1 stimulated neurite outgrowth." FEBS Lett **464**(1-2): 30-4.
- 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): 933-47.
- 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): 119-31.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Liedtke, S., H. Geyer, M. Wuhrer, 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): 373-84.

- Little, E. B., K. L. Crossin, L. A. Krushel, G. M. Edelman and B. A. Cunningham (2001). "A short segment within the cytoplasmic domain of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is essential for N-CAM-induced NF-kappa B activity in astrocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2238-43.
- Maness, P. F. and M. Schachner (2007). "Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration." Nat Neurosci **10**(1): 19-26.
- Marcos, V., Z. Zhou, A. O. Yildirim, A. Bohla, A. Hector, L. Vitkov, E. M. Wiedenbauer, W. D. Krautgartner, W. Stoiber, B. H. Belohradsky, N. Rieber, M. Kormann, B. Koller, A. Roscher, D. Roos, M. Griese, O. Eickelberg, G. Doring, M. A. Mall and D. Hartl (2010). "CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation." Nat Med **16**(9): 1018-23.
- McCauley, T. C., H. Zhang, M. E. Bellin and R. L. Ax (1999). "Purification and characterization of fertility-associated antigen (FAA) in bovine seminal fluid." Mol Reprod Dev **54**(2): 145-53.
- Meltzer, E. B. and P. W. Noble (2008). "Idiopathic pulmonary fibrosis." Orphanet J Rare Dis **3**: 8.
- Miller, F. D. and D. R. Kaplan (2001). "Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis." Cell Mol Life Sci **58**(8): 1045-53.
- Mishra, B., M. von der Ohe, C. Schulze, S. Bian, T. Makhina, G. Loers, R. Kleene and M. Schachner (2010). "Functional role of the interaction between polysialic acid and extracellular histone H1." J Neurosci **30**(37): 12400-13.
- Miyake, K. (2007). "Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors." Semin Immunol **19**(1): 3-10.
- Mocchegiani, E., R. Giacconi and L. Costarelli (2012). "Metalloproteases/anti-metalloproteases imbalance in chronic obstructive pulmonary disease: genetic factors and treatment implications." Curr Opin Pulm Med **17** Suppl 1(2012): S11-9.
- Moebius, J. M., D. Widera, J. Schmitz, C. Kaltschmidt and C. Piechaczek (2007). "Impact of polysialylated CD56 on natural killer cell cytotoxicity." BMC Immunol **8**: 13.
- Moolenaar, C. E., E. J. Muller, D. J. Schol, C. G. Figdor, E. Bock, D. Bitter-Suermann and R. J. Michalides (1990). "Expression of neural cell adhesion molecule-related sialoglycoprotein in small cell lung cancer and neuroblastoma cell lines H69 and CHP-212." Cancer Res **50**(4): 1102-6.
- Mouratis, M. A. and V. Aidinis (2011). "Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin." Curr Opin Pulm Med **17**(5): 355-61.
- Mühlenhoff, M., M. Eckhardt, A. Bethe, M. Frosch and R. Gerardy-Schahn (1996). "Autocatalytic polysialylation of polysialyltransferase-1." Embo J **15**(24): 6943-50.
- Mühlenhoff, M., M. Eckhardt and R. Gerardy-Schahn (1998). "Polysialic acid: three-dimensional structure, biosynthesis and function." Curr Opin Struct Biol **8**(5): 558-64.
- Mühlenhoff, M., A. Manegold, M. Windfuhr, B. Gotza and R. Gerardy-Schahn (2001). "The impact of N-glycosylation on the functions of polysialyltransferases." J Biol Chem **276**(36): 34066-73.
- Mühlenhoff, 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.
- Müller, D., Z. Djebbara-Hannas, P. Jourdain, L. Vutskits, P. Durbec, G. Rougon and J. Z. Kiss (2000). "Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation

- in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4315-20.
- Muroya, M., K. Chang, K. Uchida, M. Bougaki and Y. Yamada (2012). "Analysis of cytotoxicity induced by proinflammatory cytokines in the human alveolar epithelial cell line A549." Biosci Trends **6**(2): 70-80.
- Murray, B. A., S. Hoffman and B. A. Cunningham (1987). "Molecular features of cell-cell adhesion molecules." Prog Brain Res **71**: 35-45.
- Nagano, J., K. Iyonaga, K. Kawamura, A. Yamashita, H. Ichiyasu, T. Okamoto, M. Suga, Y. Sasaki and H. Kohrogi (2006). "Use of tacrolimus, a potent antifibrotic agent, in bleomycin-induced lung fibrosis." Eur Respir J **27**(3): 460-9.
- 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 alpha2,8-polysialyltransferases is essential for polysialylation." Glycoconj J **23**(5-6): 423-36.
- Nathan, C. (2002). "Points of control in inflammation." Nature **420**(6917): 846-52.
- Nathan, C. (2006). "Neutrophils and immunity: challenges and opportunities." Nat Rev Immunol **6**(3): 173-82.
- Nguyen, C., M. G. Mattei, J. F. Mattei, M. J. Santoni, C. Goridis and B. R. Jordan (1986). "Localization of the human NCAM gene to band q23 of chromosome 11: the third gene coding for a cell interaction molecule mapped to the distal portion of the long arm of chromosome 11." J Cell Biol **102**(3): 711-5.
- Niethammer, P., M. Delling, V. Sytnyk, A. Dityatev, K. Fukami and M. Schachner (2002). "Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritegenesis." J Cell Biol **157**(3): 521-32.
- Nybroe, O., D. Linnemann and E. Bock (1989). "Heterogeneity of soluble neural cell adhesion molecule." J Neurochem **53**(5): 1372-8.
- O'Neill, L. A. (1995). "Interleukin-1 signal transduction." Int J Clin Lab Res **25**(4): 169-77.
- O'Neill, L. A. (1995). "Towards an understanding of the signal transduction pathways for interleukin 1." Biochim Biophys Acta **1266**(1): 31-44.
- 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): 833-40.
- Ong, E., M. Suzuki, F. Belot, J. C. Yeh, I. Franceschini, K. Angata, O. Hindsgaul and M. Fukuda (2002). "Biosynthesis of HNK-1 glycans on O-linked oligosaccharides attached to the neural cell adhesion molecule (NCAM): the requirement for core 2 beta 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase and the muscle-specific domain in NCAM." J Biol Chem **277**(20): 18182-90.
- Paratcha, G., F. Ledda and C. F. Ibanez (2003). "The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands." Cell **113**(7): 867-79.
- Parker, D. and A. Prince (2011). "Innate immunity in the respiratory epithelium." Am J Respir Cell Mol Biol **45**(2): 189-201.
- 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): 3551-67.
- Polo-Parada, L., C. M. Bose and L. T. Landmesser (2001). "Alterations in transmission, vesicle dynamics, and transmitter release machinery at NCAM-deficient neuromuscular junctions." Neuron **32**(5): 815-28.
- Poltorak, M., I. Khoja, J. J. Hemperly, J. R. Williams, R. el-Mallakh and W. J. Freed (1995). "Disturbances in cell recognition molecules (N-CAM and L1 antigen) in the CSF of patients with schizophrenia." Exp Neurol **131**(2): 266-72.

- Rathinam, V. A., S. K. Vanaja and K. A. Fitzgerald (2012). "Regulation of inflammasome signaling." Nat Immunol **13**(4): 333-2.
- Rey-Gallardo, A., C. Delgado-Martin, R. Gerardy-Schahn, J. L. Rodriguez-Fernandez and M. A. Vega (2011). "Polysialic acid is required for neuropilin-2a/b-mediated control of CCL21-driven chemotaxis of mature dendritic cells and for their migration in vivo." Glycobiology **21**(5): 655-62.
- Rey-Gallardo, A., C. Escribano, C. Delgado-Martin, J. L. Rodriguez-Fernandez, R. Gerardy-Schahn, U. Rutishauser, A. L. Corbi and M. A. Vega (2010). "Polysialylated neuropilin-2 enhances human dendritic cell migration through the basic C-terminal region of CCL21." Glycobiology **20**(9): 1139-46.
- Romanovsky, A. A., A. A. Steiner and K. Matsumura (2006). "Cells that trigger fever." Cell Cycle **5**(19): 2195-7.
- Roth, J., C. Zuber, P. Wagner, I. Blaha, D. Bitter-Suermann and P. U. Heitz (1988). "Presence of the long chain form of polysialic acid of the neural cell adhesion molecule in Wilms' tumor. Identification of a cell adhesion molecule as an oncodevelopmental antigen and implications for tumor histogenesis." Am J Pathol **133**(2): 227-40.
- Rusznak, C., P. R. Mills, J. L. Devalia, R. J. Sapsford, R. J. Davies and S. Lozewicz (2000). "Effect of cigarette smoke on the permeability and IL-1beta and sICAM-1 release from cultured human bronchial epithelial cells of never-smokers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Cell Mol Biol **23**(4): 530-6.
- 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): 53-7.
- Rutishauser, U., J. P. Thiery, R. Brackenbury, B. A. Sela and G. M. Edelman (1976). "Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(2): 577-81.
- Sadoul, K., A. Meyer, M. G. Low and M. Schachner (1986). "Release of the 120 kDa component of the mouse neural cell adhesion molecule N-CAM from cell surfaces by phosphatidylinositol-specific phospholipase C." Neurosci Lett **72**(3): 341-6.
- 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.
- Saito, F., S. Tasaka, K. Inoue, K. Miyamoto, Y. Nakano, Y. Ogawa, W. Yamada, Y. Shiraishi, N. Hasegawa, S. Fujishima, H. Takano and A. Ishizaka (2008). "Role of interleukin-6 in bleomycin-induced lung inflammatory changes in mice." Am J Respir Cell Mol Biol **38**(5): 566-71.
- 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): 15422-31.
- Schauer, R. (2004). "Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man." Zoology (Jena) **107**(1): 49-64.
- Schol, D. J., W. J. Mooi, A. A. van der Gugten, S. S. Wagenaar and J. Hilgers (1988). "Monoclonal antibody 123C3, identifying small cell carcinoma phenotype in lung

- tumours, recognizes mainly, but not exclusively, endocrine and neuron-supporting normal tissues." Int J Cancer Suppl **2**: 34-40.
- Schwarzer, D., K. Stummeyer, T. Haselhorst, F. Freiberger, 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): 9465-74.
- Secher, T. (2010). "Soluble NCAM." Adv Exp Med Biol **663**: 227-42.
- Seki, T. (2004). "Polysialic acid-expressing cells in adult neurogenesis." Trends in Glycoscience and glycotchnology **16**(91): 319-330.
- Selman, M., G. Carrillo, J. Salas, R. P. Padilla, R. Perez-Chavira, R. Sansores and R. Chapela (1998). "Colchicine, D-penicillamine, and prednisone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a controlled clinical trial." Chest **114**(2): 507-12.
- Selman, M., T. E. King and A. Pardo (2001). "Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy." Ann Intern Med **134**(2): 136-51.
- Selman, M. and A. Pardo (2002). "Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder." Respir Res **3**: 3.
- Silberstein, G. B. and C. W. Daniel (1982). "Glycosaminoglycans in the basal lamina and extracellular matrix of the developing mouse mammary duct." Dev Biol **90**(1): 215-22.
- Sims, J. E., M. A. Gayle, J. L. Slack, M. R. Alderson, T. A. Bird, J. G. Giri, F. Colotta, F. Re, A. Mantovani, K. Shanebeck and et al. (1993). "Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(13): 6155-9.
- Sims, J. E., C. J. March, D. Cosman, M. B. Widmer, H. R. MacDonald, C. J. McMahan, C. E. Grubin, J. M. Wignall, J. L. Jackson, S. M. Call and et al. (1988). "cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily." Science **241**(4865): 585-9.
- Sorkin, B. C., S. Hoffman, G. M. Edelman and B. A. Cunningham (1984). "Sulfation and phosphorylation of the neural cell adhesion molecule, N-CAM." Science **225**(4669): 1476-8.
- 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): 90-6.
- Sytnyk, V., I. Leshchyn'ska, M. Delling, G. Dityateva, A. Dityatev and M. Schachner (2002). "Neural cell adhesion molecule promotes accumulation of TGN organelles at sites of neuron-to-neuron contacts." J Cell Biol **159**(4): 649-61.
- Takamatsu, K., B. Auerbach, R. Gerardy-Schahn, M. Eckhardt, G. Jaques and N. Madry (1994). "Characterization of tumor-associated neural cell adhesion molecule in human serum." Cancer Res **54**(10): 2598-603.
- Thomaidou, D., D. Coquillat, S. Meintanis, M. Noda, G. Rougon and R. Matsas (2001). "Soluble forms of NCAM and F3 neuronal cell adhesion molecules promote Schwann cell migration: identification of protein tyrosine phosphatases zeta/beta as the putative F3 receptors on Schwann cells." J Neurochem **78**(4): 767-78.
- 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): 47975-84.
- van Eeden, S. F., A. Yeung, K. Quinlan and J. C. Hogg (2005). "Systemic response to ambient particulate matter: relevance to chronic obstructive pulmonary disease." Proc Am Thorac Soc **2**(1): 61-7.

- Van Wetering, S., S. P. Mannesse-Lazeroms, M. A. Van Sterkenburg, M. R. Daha, J. H. Dijkman and P. S. Hiemstra (1997). "Effect of defensins on interleukin-8 synthesis in airway epithelial cells." Am J Physiol **272**(5 Pt 1): L888-96.
- Villanueva, E., S. Yalavarthi, C. C. Berthier, J. B. Hodgins, R. Khandpur, A. M. Lin, C. J. Rubin, W. Zhao, S. H. Olsen, M. Klinker, D. Shealy, M. F. Denny, J. Plumas, L. Chaperot, M. Kretzler, A. T. Bruce and M. J. Kaplan (2011). "Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus." J Immunol **187**(1): 538-52.
- 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.
- Vutskits, L., Z. Djebbara-Hannas, H. Zhang, J. P. Paccaud, P. Durbec, G. Rougon, D. Muller and J. Z. Kiss (2001). "PSA-NCAM modulates BDNF-dependent survival and differentiation of cortical neurons." Eur J Neurosci **13**(7): 1391-402.
- Walmod, P. S., K. Kolkova, V. Berezin and E. Bock (2004). "Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction." Neurochem Res **29**(11): 2015-35.
- Walsh, F. S., R. B. Parekh, S. E. Moore, G. Dickson, C. H. Barton, H. J. Gower, R. A. Dwek and T. W. Rademacher (1989). "Tissue specific O-linked glycosylation of the neural cell adhesion molecule (N-CAM)." Development **105**(4): 803-11.
- Wang, Y. and H. Neumann (2010). "Alleviation of neurotoxicity by microglial human Siglec-11." J Neurosci **30**(9): 3482-8.
- 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): 42971-7.
- Williams, E. J., F. S. Walsh and P. Doherty (1994). "Tyrosine kinase inhibitors can differentially inhibit integrin-dependent and CAM-stimulated neurite outgrowth." J Cell Biol **124**(6): 1029-37.
- Wilson, H. V. (1907). "On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges." Journal of Experimental Zoology **5**(2): 245-258.
- 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): 207-18.
- Wygrecka, M., P. Markart, C. Ruppert, K. Petri, K. T. Preissner, W. Seeger and A. Guenther (2007). "Cellular origin of pro-coagulant and (anti)-fibrinolytic factors in bleomycin-injured lungs." Eur Respir J **29**(6): 1105-14.
- 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): 13875-80.
- Zhong, X. Y., H. Laivuori, J. C. Livingston, O. Ylikorkala, B. M. Sibai, W. Holzgreve and S. Hahn (2001). "Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia." Am J Obstet Gynecol **184**(3): 414-9.
- 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): 9965-71.



## 11 Kongressbeiträge

### Vorträge

Ulm, C.; Müller, S.; Korfei, M.; Rinné, S.; Geyer, H.; Gerardy-Schahn, R.;  
Mühlenhoff, M.; Günther, A.; Geyer, R. and Galuska, SP.

*“Increased polysialylation in lung tissue of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)”* 21<sup>st</sup> Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie, the Groupe Lillois de Glycobiologie, and the Belgian Working Group for Glycosciences.

07. - 09.11.2010 in Ghent, Belgien

Ulm, C.; Müller, S.; Korfei, M.; Rinné, S.; Geyer, H.; Gerardy-Schahn, R.;  
Mühlenhoff, M.; Günther, A.; Geyer, R. and Galuska, SP.

*“Increased polysialylation in lung tissue of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)”*

Biochemie Symposium für Nachwuchswissenschaftler (Doktorandentag)

02.07.2010, Biochemisches Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen

### Posterpräsentationen

Ulm, C.; Mahavadi, P.; Müller, S.; Rinné, S.; Geyer, H.; Gerardy-Schahn, R.;  
Mühlenhoff, M.; Günther, A.; Geyer, R. and Galuska, SP.

*“Increased polysialylation in lung tissue of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)”* 22<sup>nd</sup> Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie, the Groupe Lillois de Glycobiologie, and the Belgian Working Group for Glycosciences

27. - 29.11.2011 in Lille, Frankreich

Auszeichnung: Posterpreis

Ulm, C.; Mahavadi, P.; Müller, S.; Rinné, S.; Geyer, H.; Gerardy-Schahn, R.;  
Mühlenhoff, M.; Günther, A.; Geyer, R. and Galuska, SP.

*“Increased polysialylation in lung tissue of patients with idiopathic pulmonary  
fibrosis (IPF)”*

European Respiratory Society, Amsterdam 2011, Annual Congress

24. - 28.09.2011 in Amsterdam, Niederlande

Ulm, C.; Müller, S.; Korfei, M.; Rinné, S.; Geyer, H.; Gerardy-Schahn, R.;  
Mühlenhoff, M.; Günther, A.; Geyer, R. and Galuska, SP.

*“Increased polysialylation in lung tissue of patients with idiopathic pulmonary  
fibrosis (IPF)”*

11<sup>th</sup> European Training Course on Carbohydrates. European Science Foundation  
and Carbohydrate Competence Centre

17. - 20.05.2010 in Wageningen, Niederlande

### **Teilnahmen**

Naturwissenschaftliches Symposium der UGMLC (University of Giessen and  
Marburg Lung Center) *“Remodeling, Repair and Regeneration in Lung Diseases”*

Juni 2012; Marburg, Deutschland

Internationales ECCPS (Excellence Cluster Cardiopulmonary System) Symposium

Juni 2011, Bad Nauheim, Deutschland

Naturwissenschaftliches Symposium der UGMLC (University of Giessen and  
Marburg Lung Center) *“Micromanaging the lung”*

Mai 2011, Braunfels, Deutschland

*ECCPS Retreat*

Mai 2010, Bad Nauheim, Deutschland

## 12 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig 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 Plagiatssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

### 13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meines Promotionsvorhabens tatkräftig unterstützt und begleitet haben.

Diese Arbeit wurde mit Hilfe finanzieller Mittel des Doktorandinnenprogramms im Rahmen des Gleichstellungskonzepts der Justus-Liebig-Universität Gießen gefördert.

Mein größter Dank gebührt meinem Doktorvater Prof. Rudolf Geyer, der mir die Möglichkeit gegeben hat mein Promotionsvorhaben zu verwirklichen. Die positive Atmosphäre, die Du in Deiner Gruppe verbreitet hast, hat mich geprägt und wird mir immer in Erinnerung bleiben. Du hast mich unablässig unterstützt und Dich bei Bedarf schützend vor mich gestellt. Ich hoffe, dass ich möglichst viele dieser Führungsqualitäten in meinem Arbeitsalltag ein- und umsetzen kann. Ich danke Dir für die Zeit, die ich in der AG Geyer verbringen durfte!

Ohne Sebastian wäre es nie zur Umsetzung dieses Promotionsvorhabens gekommen. Du hast Dich für mein Stipendium eingesetzt, mich gefördert und gefordert. Dabei waren mir unsere fruchtbaren Diskussionen besonders wichtig und hilfreich. So konnte ich all meine Ideen in die Tat umsetzen, auch wenn sich die ein oder andere als weniger gut herausgestellte (Seneszenz!) ☺. Du hast mir immer das Gefühl gegeben für mich da zu sein und dafür danke ich Dir!

Hille danke ich herzlich für ihre anhaltende Hilfe und Unterstützung. Du hast Dich stets für mich eingesetzt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Abgesehen davon findest Du in mir auf ewig den größten Fan Deines Mirabellenkuchens!

Prof. Günter Lochnit danke ich für viele Tipps und Ratschläge. Du hast nicht selten zur Problemlösung beigetragen. Ich danke Dir für Deine hilfsbereite Art.

Mein Dank an Sandra und Dennis ist auf einer Skala von 1-10 ausgedrückt (wobei 1 und 10 nicht vergeben werden), auf jeden Fall eine 12. Denn schon nach kurzer Zeit, wurden aus Arbeitskollegen echte Freunde. Wir haben Höhen und Tiefen, ob beruflich oder privat, miteinander geteilt und uns gegenseitig unterstützt. Das werde ich Euch nie vergessen!

Den lieben Kellerkindern Werner, Sigggi und Peter danke ich von Herzen für Ihre unendliche Hilfsbereitschaft. Fast jedes kleine oder große Problem konnte ich dank Euren Ratschlägen und Ideen lösen. Auch unsere Pausengespräche im Frühstücksräumchen werden mir sehr fehlen!

Meinen Lieblings-Medizindoktoranden Sören, Peter, Nils und Manka danke ich für die unvergesslich schöne Zeit. Ihr habt meinen Laboralltag stets positiv beeinflusst – so musste ich mir nicht selten den Bauch halten vor Lachen!

Ich danke der Arbeitsgruppe von Prof. Andreas Günter, für die Bereitstellung der Proben und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere Poornima, Clemens und Silke haben mir immer hilfsbereit zur Seite gestanden. Vielen Dank!

Bei der AG Prof. Middendorff, möchte ich mich für die Zusammenarbeit sowie für die Erstellung der aussagekräftigen PCR-Analysen bedanken.

Unseren Kooperationspartnern der AG Prof. Gerardy-Schahn der Medizinischen Hochschule Hannover danke ich für die gute Zusammenarbeit, für die guten Tipps und die Bereitstellung von Antikörpern, Enzymen etc., die für meine Experimente unabdingbar waren. Vielen herzlichen Dank!

Ich danke Christina, Kai und Jule für ihre offene und hilfsbereite Art, die mir den Einstieg in die Arbeitsgruppe sehr leicht gemacht hat.

Olli, Jan, Zhera, Miriam und Linda danke ich für die gute Zusammenarbeit und das sehr positive kollegiale Verhältnis. Ich freue mich, dass ihr mich ein Stückchen begleitet habt.

Allen meinen lieben Freunden Amü, Andrea, Anne, Eva, Jule M., Jule W., Jule Z., Katja, Katty, Lissa, Mira, Sirke, Tina und Tine danke ich herzlich für Eure stets offenen Ohren und Euer Verständnis, vor allem in der letzten Zeit!

Peter danke ich von ganzem Herzen für die unablässige Hilfe und Unterstützung während des Verfassens dieses Schlauschisskrepfels 😊. Du hast niemals die Geduld verloren, auch wenn ich eine Abbildung zum 100sten Male geändert haben wollte. Ich bin auch stolz, dass Du Dich mittlerweile so gut auskennst und sogar schon Western Blots im Fernseher erkennst!

Nicht zuletzt danke ich aus tiefstem Herzen meiner Familie. Ohne Euer Vertrauen, Eure Liebe und grenzenlose Unterstützung wäre ich niemals so weit gekommen. Ihr habt schon mein ganzes Leben an mich geglaubt und mich in meinen Zielen bestärkt. In Euch finde ich meinen stärksten Halt. Die vorliegende Dissertation ist Euch gewidmet!



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFBENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5964-4



9 17 8 3 8 3 5 19 5 9 6 4 4