

Aus dem Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. Guido Posern)

**Etablierung und Charakterisierung einer transgenen Maus für die humane
Erbkrankheit Sialurie.**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)
für das Fachgebiet Medizinische Physiologie und Pathophysiologie

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dipl. Biochem. Denise Kreuzmann

geboren am 10.11.1983 in Wippra

Betreuer: Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte

1. Gutachter: Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte
2. Gutachter: Prof. Dr. Roland Schauer
3. Gutachter: Prof. Dr. Werner Reutter

Eröffnung des Promotionsverfahrens am 07.07.2015
öffentliche Verteidigung am 01.10.2015

Referat

Sialurie ist eine seltene autosomal dominant vererbte Stoffwechselerkrankung, hervorgerufen durch eine Punktmutation im Gen des Schlüsselenzyms der Sialinsäurebiosynthese. Aufgrund der daraus resultierenden defekten *feedback*-Inhibierung der Sialinsäuresynthese, kommt es zu einer massiven Überproduktion von freien Sialinsäuren im Zytoplasma. Sialurie-Patienten scheiden extrem hohe Mengen an *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) aus und zeigen zudem unterschiedlich stark ausgeprägte Verzögerungen der körperlichen und mentalen Entwicklung. Unter physiologischen Bedingungen findet man Sialinsäuren vorwiegend in gebundener Form, als terminale Komponente an Glykokonjugaten. Aufgrund der endständigen Position und ihrer enormen Strukturvielfalt zeigen Sialinsäuren eine Vielzahl von biologischen Funktionen, angefangen bei Interaktionsprozessen bis hin zur Beeinflussung der Funktion von Glykokonjugaten. Eine streng regulierte Sialinsäurekonzentration ist für die Sialylierung in der Zelle von großer Bedeutung. Um im Detail untersuchen zu können, welchen Einfluss eine zu hohe intrazelluläre Sialinsäurekonzentration auf den Organismus hat, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine transgene Maus generiert, welche die Sialurie-mutierte UDP-*N*-Acetylglukosamin-2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamin-Kinase (GNE) exprimiert. Mittels einer auf Fluoreszenz basierenden HPLC Methode konnte die Neu5Ac Konzentration im Urin der Mäuse bestimmt werden. Sialurie-Mäuse scheiden im Vergleich zu gesunden Mäusen bis zu 400 Mal mehr Neu5Ac aus. Im Gehirn Sialurie-kranker Mäuse wurde mittels Periodat/Resorcinol Methode eine Erhöhung der zellulären Sialinsäurekonzentration um 50 % ermittelt. Die intrazelluläre Akkumulation von Sialinsäuren führt bei Sialurie-Mäusen zum einen zur vermehrten Polysialylierung des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM). Die Analyse mittels Immunoblot ergab hier eine Verdopplung der Polysialinsäuremenge im Gehirngewebe der Sialurie-Mäuse. Zum anderen wurde mittels FACS Analysen eine erhöhte Oberflächensialylierung auf Sialurie-Leukozyten festgestellt. Polysialinsäure beeinflusst die NCAM abhängige Zelladhäsion und ist damit von enormer Bedeutung für die Gehirnentwicklung. Dabei unterliegt die Polysialylierung einer strengen entwicklungsabhängigen Regulation. Veränderungen des Sialinsäuregehalts können schwerwiegende Folgen haben. Die in dieser Arbeit etablierte transgene Maus stellt ein geeignetes *in vivo* Model dar, um den Sialinsäurehaushalt im Organismus näher zu untersuchen.

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis.....	I
	Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1	Einleitung	1
1.1	Glykosylierung.....	1
1.2	Sialinsäuren.....	1
1.2.1	Bedeutung der Sialinsäuren im Organismus	4
1.2.2	Sialinsäurebiosynthese	6
1.2.3	Das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese	7
1.2.4	Pathologie der GNE	8
1.2.5	Sialurie	8
1.3	Polysialinsäure	10
1.3.1	Bedeutung der Polysialinsäure im Organismus	13
1.4	Manipulation der Sialylierung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	15
2	Zielstellung	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Versuchstiere.....	18
3.2	Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien	18
3.3	Antikörper, Lektine und Enzyme.....	18
3.4	Plasmide und Oligonukleotide.....	19
3.5	Gebrauchsfertige Reagenzien und Puffer	20
3.6	Kommerziell erhältliche Kits	21
3.7	Molekulargewichtsmarker	21
3.8	Tierexperimentelle Arbeiten	22
3.8.1	Versuchstierhaltung	22
3.8.2	Erzeugung transgener Mäuse mittels Mikroinjektion	22
3.8.3	Genotypisierung.....	22
3.8.4	Blutentnahme	24
3.8.5	Gewinnung von Mausurin.....	24
3.8.6	Mauspräparation	24
3.8.7	Aufarbeitung von Gewebe und Blut für die Sialinsäureanalytik	24
3.8.8	Fütterung von FVB/N Mäusen mit <i>N</i> -Acetylmannosamin	26
3.9	Molekularbiologische Methoden	26
3.9.1	Extraktion von RNA aus Gewebe und Blut	26
3.9.2	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	26

3.9.3	DNase Verdau.....	27
3.9.4	Reverse Transkription (cDNA Synthese)	27
3.9.5	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	27
3.9.6	Agarosegelelektrophorese.....	28
3.9.7	Quantitative <i>realtime</i> PCR (qRT-PCR)	29
3.10	Proteinbiochemische Methoden.....	30
3.10.1	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	30
3.10.2	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	30
3.10.3	Western Blot	31
3.10.4	Immunfärbung von Western Blots.....	32
3.11	Sialinsäureanalytische Methoden.....	32
3.11.1	Sialinsäureisolierung aus Mausurin mittels Anionenaustauschchromatographie	32
3.11.2	Fluoreszenzmarkierung von Sialinsäuren	33
3.11.3	Nachweis und Quantifizierung von Sialinsäuren mittels <i>high performance liquid chromatography</i> (HPLC).....	34
3.11.4	Nachweis und Quantifizierung von Sialinsäuren mittels Periodat-Resorcinol Assay	34
3.11.5	Durchflusszytometrische Analyse Lektin-markierter Leukozyten	35
4	Ergebnisse.....	37
4.1	Etablierung der transgenen Mauslinie FVBN-GNE-R263L.....	37
4.1.1	Sialurie-Konstrukt.....	37
4.1.2	Mikroinjektion	37
4.1.3	Genotypisierung.....	39
4.1.4	Expression des Transgens in der Founder-Generation.....	40
4.1.5	Quantifizierung der Neu5Ac-Menge im Urin der Founder Mäuse	42
4.1.6	Anzucht der transgenen Mauslinien.....	43
4.2	Charakterisierung der transgenen Sialurie Maus	46
4.2.1	Expressionsanalyse	46
4.2.2	Urinanalyse	46
4.2.3	Quantifizierung der Sialinsäurekonzentration im Gewebe und im Blutplasma	48
4.2.4	Analyse der Oberflächensialylierung von Leukozyten mittels Durchflusszytometrie.....	49
4.2.5	Quantifizierung der Polysialinsäuremenge im Gehirn.....	51
4.3	Fütterung von FVB/N Mäusen mit <i>N</i> -Acetylmannosamin (ManNAc).....	52
5	Diskussion	55
5.1	Etablierung der transgenen Mauslinie FVBN-GNE-R263L.....	55
5.2	Auswirkungen einer veränderten Sialinsäurekonzentration im Organismus	58
6	Zusammenfassung	62

7	Literaturverzeichnis	63
8	Thesen	74
	Tabellarischer Lebenslauf	
	Selbständigkeitserklärung	
	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
Asn	Asparagin
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
bp	Basenpaare
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDG	<i>congenital disorders of glycosylation</i>
cDNA	komplementäre DNA
CHO-Zellen	<i>chinese hamster ovary cells</i>
CMP	Cytidinmonophosphat
CMV	<i>human cytomegalovirus</i>
DMB	1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzol-dihydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOC	Natriumdesoxycholat
DP	<i>degree of polymerization</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Gal	Galaktose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalaktosamin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglukosamin
GNE	UDP- <i>N</i> -Acetylglukosamin-2-Epimerase/ <i>N</i> -Acetylmannosamin-Kinase
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
Ig	Immunglobulin
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
mAK	monoklonaler Antikörper
Man	Mannose
ManNAc	<i>N</i> -Acetylmannosamin
ManNAc6P	<i>N</i> -Acetylmannosamin-6-phosphat
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney epithelial cells</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>

NCAM	Neurales Zelladäsionsmolekül
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5Ac9P	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure-9-Phosphat
Neu5Gc	<i>N</i> -Glycolylneuraminsäure
PIC	Proteaseinhibitorcocktail
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
p.n.	postnatal
PolySia	Polysialinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RP HPLC	<i>reversed phase</i> HPLC
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
Siglec	<i>sialic acid binding immunoglobulin-like lectin</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA Puffer
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
UDP	Uridindiphosphat
Zeo	Zeocin

1 Einleitung

1.1 Glykosylierung

Nahezu alle eukaryotischen Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche eine dichte und komplexe Anordnung von Zuckermolekülen, die Glykane. Ebenso sind Glykane präsent in der extrazellulären Matrix und man findet sie auf im Zytoplasma sezernierten Molekülen (Varki *et al.*, 2009; Varki, 2011). Die Glykosylierung ist ein generelles Merkmal jeder Zelle und wird in der Gesamtheit als Glykom bezeichnet. (Varki, 2011). Glykane in Verbindung mit Makromolekülen bezeichnet man als Glykokonjugate. Man unterscheidet die Glykoproteine und Glykolipide. Bei den Glykoproteinen unterscheidet man die *O*-Glykane, bei denen die Oligosaccharide über *O*-glykosidische Bindungen mit Serin oder Threonin Seitenketten des Trägerproteins verbunden sind und die *N*-Glykane, bei denen eine Core-Struktur, aus zwei *N*-Acetylglukosaminen und drei Mannose-Einheiten (GlcNAc₂Man₃), über einen GlcNAc Rest an eine Asparagin Seitenkette der Konsensussequenz Asn-Xxx-Ser/Thr *N*-glykosidisch gebunden ist. Bei den Glykolipiden ist der Kohlenhydratanteil glykosidisch mit einem Glycerol (Glyceroglykolipid) oder mit der Aminobase Sphingosin (Glykosphingolipid) verknüpft. Enthält der Kohlenhydratanteil eine oder mehrere Sialinsäuren spricht man von Gangliosiden. Die Glykosylierung von Proteinen und Lipiden ist die am häufigsten vorkommende posttranslationale Modifikation in Eukaryoten und die bei weitem strukturell vielfältigste (Hart und Copeland, 2010). Aufgrund ihrer Position bilden Glykane die Verbindung der Zelle oder des Trägermoleküls mit der Umgebung und vermitteln eine Vielzahl von Zell-Zell, Zell-Matrix und Zell-Molekül Interaktionen. Auch die Interaktion zwischen unterschiedlichen Organismen wird durch Glykane beeinflusst (Varki *et al.*, 2009). Das Glykosylierungsmuster eines Proteins reguliert dessen Eigenschaften und Funktionen. Eine Veränderung dieses Musters kann eine dramatische Beeinträchtigung der Proteinfunktion zur Folge haben, hervorgerufen durch eine resultierende fehlerhafte Faltung bis hin zum Funktionsverlust. Glykolyierungsdefekte führen zu schweren Komplikationen und werden CDG (*congenital disorders of glycosylation*) genannt (Wolfe und Krasnewich, 2013). Die funktionale Spezifität eines Glykans ist meist durch das Monosaccharid am äußersten Ende der Kette dominiert. Die Mehrheit der Glykokonjugate sind durch Sialinsäuren terminiert und bilden in ihrer Gesamtheit das Sialom (Cohen & Varki, 2010).

1.2 Sialinsäuren

Sialinsäuren sind eine große Familie von Monosacchariden mit einem Grundgerüst aus neun Kohlenstoffatomen. Charakteristisch für Sialinsäuren ist die Aminogruppe am C5-Atom und die Carboxygruppe am C2-Atom, wodurch die Sialinsäuren unter physiologischen Bedingungen negativ geladen sind und als organische Säure einen pKs-Wert von 2,2 aufweisen. Die

Aminogruppe ist für gewöhnlich acetyliert, wodurch man die *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) erhält. Diese ist nicht nur häufigster Vertreter, sondern auch der biosynthetische Vorläufer für alle der 50 bis heute bekannten natürlich vorkommenden Sialinsäuren. Die enorme Vielfalt der Sialinsäuren kommt durch verschiedene Substituenten der Aminogruppe und durch Anzahl und Substitution der Hydroxygruppen zustande. Als *O*-Substituenten wurden Acetyl-, Lactoyl-, Methyl-, Sulfonyl- und Phosphorylgruppen, als *N*-Substituenten Acetyl- oder Glycolylgruppen identifiziert (Varki, 1992).

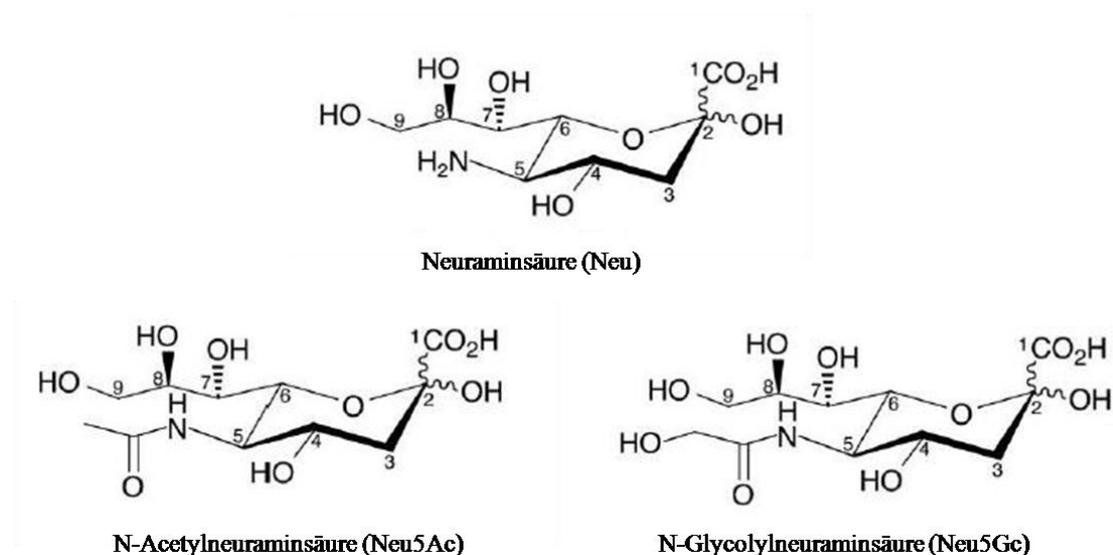


Abbildung 1: Struktur von Sialinsäuren. Sialinsäuren sind Derivate der Neuraminsäure (Neu). Neu5Ac und Neu5Gc sind die beiden häufigsten Vertreter, bei beiden liegen alle Hydroxygruppen (C4, C7, C8, C9) nicht modifiziert vor. Die Aminogruppe am C5 ist acetyliert (Neu5Ac) bzw. glycolyliert (Neu5Gc). Die Vielfalt der Sialinsäuren entsteht durch *O*-Substitution der Hydroxygruppen durch Acetyl-, Lactoyl-, Methyl-, Sulfonyl- und Phosphorylgruppen. (modifiziert nach (Cohen & Varki, 2010))

Die größte Vielfalt findet man in der Linie der Deuterostomia, welche die Vertebraten und höhere Invertebraten umfasst, und bei einigen Bakterienarten, welche Sialinsäuren zum Schutz vor dem Immunsystem auf ihrer äußeren Hülle tragen (Angata und Varki, 2002). verschiedene Studien zeigen, dass auch innerhalb der Protostomia Sialinsäuren vorkommen. So wurde Neu5Ac in den Larven von *Drosophila melanogaster* nachgewiesen (Roth *et al.*, 1992). Auch in einigen Pilzen wie *Candida albicans* kommen Sialinsäuren in geringen Mengen vor (Soares *et al.*, 2000). Bislang gibt es keine eindeutigen Beweise für das Vorkommen von Sialinsäuren in Pflanzen (Angata und Varki, 2002). Bei den Deuterostomia kommen alle bisher bekannten *O*-Modifikationen vor, wohingegen bei höheren Vertebraten nur *O*-acetylierte und *O*-lactoylierte Sialinsäuren auftreten. Die Vielfalt der Sialinsäuren ist innerhalb der Arten stark variabel. Während in der Speicheldrüse des Rindes 14 verschiedene Sialinsäuren identifiziert wurden (Reuter *et al.*, 1983), enthält humanes Gewebe nur drei verschiedene Sialinsäuren, Neu5Ac, 9-

O-acetylierte Neu5Ac und 9-*O*-lactosylierte Neu5Ac. Neben der *N*-Acetylneuraminsäure ist die im Tierreich am häufigsten auftretende Sialinsäure die *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc). In humanem Gewebe fehlt jedoch die Neu5Gc, da die CMP-Neu5Ac-Hydroxylase, welche die Hydroxylierung von Neu5Ac katalysiert, aufgrund einer Mutation defekt ist (Irie *et al.*, 1998). Sialinsäuren findet man in der Regel terminal gebunden als Monomer an *N*-Glykane, *O*-Glykane (Glykoproteine) und Glykolipide (Ganglioside) auf der Zelloberfläche oder auch auf im Zytoplasma sezernierten Glykokonjugaten. Freie Sialinsäuren im Zytoplasma kommen äußerst selten vor (Sillanaukee *et al.*, 1999). Sehr häufig findet man auf Glykolipiden des Gehirns (Ganglioside) Sialinsäuredimere (DP: 2) und -oligomere (DP: 3-7). Einige ausgewählte Glykoproteine tragen Sialinsäuren als Polymer (DP>8) auf ihrer Oberfläche, wobei die Sialinsäuren untereinander, wie auch bei Di- und Oligomeren, in α -2,8-Stellung verknüpft sind (Sato und Kitajima, 2013). Sialinsäuren sind mit ihrem C2-Atom an das nicht reduzierende Ende der Oligosaccharidketten gebunden, hierbei kann die Bindung an Galaktose (Gal) in α -2,3- und α -2,6-Stellung erfolgen. Sialinsäuren gebunden an *N*-Acetylgalaktosamin (GalNAc) findet man nur in α -2,6-Stellung. Des Weiteren können Sialinsäuren auch an *N*-Acetylglucosaminreste (GlcNAc) gebunden sein. Jede weitere Verknüpfung von Sialinsäuren untereinander erfolgt in α -2,8-Stellung (Cohen & Varki, 2010).

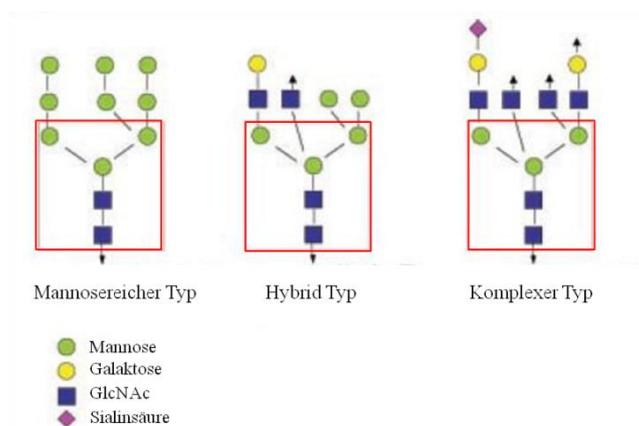


Abbildung 2: Struktur der N-Glykane. Dargestellt sind die drei Klassen der N-Glykane, mannosereicher Typ, Hybridtyp und komplexer Typ. Rot umrandet ist die gemeinsame Core-Struktur. Die schwarzen Pfeile bezeichnen potentielle Verknüpfungsstellen für weitere Zuckerreste. (modifiziert nach Bork *et al.*, 2009)

Innerhalb der N-Glykane unterscheidet man zwischen Mannosereich-, komplex- und Hybridtyp (Schachter, 2000), deren Core-Struktur besteht aus zwei GlcNAc-Einheiten und drei Mannose-Einheiten. An diese Struktur schließen sich Oligosaccharidketten an, welche Antennen genannt werden und sich in ihrer Anzahl unterscheiden können. Folgen weitere Mannose-Einheiten spricht man vom mannosereichen Typ. Handelt es sich um andere Zucker spricht man vom komplexen Typ. Sind beide Formen gemischt handelt es sich um den Hybridtyp. Sialinsäuren

findet man nur beim komplexen Typ. Die Struktur von *O*-Glykanen ist sehr viel heterogener, so dass es bis heute keine einheitliche Nomenklatur gibt. Die Sialinsäuren sind wie bei den *N*-Glykanen endständig in α -2,3 oder α -2,6-Stellung verknüpft.

1.2.1 Bedeutung der Sialinsäuren im Organismus

Aufgrund ihrer Diversität tragen Sialinsäuren enorm zur Strukturvielfalt von Glykoproteinen bei und beeinflussen maßgeblich deren Funktionen. Ein prominentes Beispiel hierfür ist die Sialylierung des Immunglobulin G (IgG), welches in verschiedenen Glykoformen mit unterschiedlichem Sialylierungsgrad vorkommt. Es konnte gezeigt werden, dass der Sialylierungsgrad darüber entscheidet, ob ein IgG pro- oder antiinflammatorische Wirkung hat (Kaneko *et al.*, 2006).

Sialinsäuren können aufgrund ihrer terminalen Position und durch ihre räumliche Ausdehnung, hervorgerufen durch die negative Ladung, direkt auf ihre Umgebung einwirken und sind daher prädestiniert für eine Vielzahl von Zellinteraktionsprozessen. Sialinsäuren nehmen hierbei eine duale Rolle ein, zum einen können sie als biologische Masken dienen, indem sie Erkennungsdeterminanten abschirmen und zum anderen können Sialinsäuren selber als Erkennungsdeterminanten für verschiedene Moleküle und auch für Pathogene dienen (Schauer, 2009). Bekanntestes Beispiel für die Maskierungsfunktion ist die Erhöhung der Halblebenszeit von Serumglykoproteinen durch Sialinsäuren. Nach Entfernung der terminalen Sialinsäuren wird die darunter befindliche Galaktose erkannt und das Protein wird aus dem Serum abtransportiert. Ebenso ergeht es Erythrozyten, Lymphozyten und Thrombozyten nach der Desialylierung (Ashwell und Morell, 1974; Varki *et al.*, 2009). Sehr häufig dient die Sialylierung dazu bestimmte Rezeptoren stillzulegen. Der Tyrosin Kinase Rezeptor zum Beispiel wird erst aktiv nachdem die α -2,3-verknüpfte Sialinsäure entfernt wurde und der darunter liegende Galaktose Rest erkannt werden kann (Woronowicz *et al.*, 2007). Die Maskierungsfunktion ist aber auch im Immunsystem von Bedeutung, da Sialinsäuren zur Abschirmung antigener Determinanten genutzt werden und so keine Erkennung durch Komponenten des Immunsystems erfolgen kann. Embryonalzellen schützen sich vor dem mütterlichen Immunsystem indem sie ihre Antigenität durch Sialinsäuren abschirmen (Schauer, 1988). Bestimmte Pathogene können aber auch die Schutzfunktion der Sialinsäuren gegen uns einsetzen. Bekanntestes Beispiel ist *Trypanosoma cruzii*, der Erreger der Chagas Krankheit. Nachdem der Erreger an Sialinsäuren der Wirtszelle gebunden hat, überträgt er diese mittels einer Transsialidase auf seine eigene Oberfläche (Schenkman *et al.*, 1991). Auch Tumorzellen benutzen eine Tarnkappe aus Sialinsäuren um den Angriff durch das Immunsystem zu entgehen (Dennis und Laferté, 1985).

Bei Interaktionsprozessen wie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion sind Sialinsäuren bzw. spezifische Sialylstrukturen als Liganden für Lektine (Zucker bindende Proteine) von zentraler

Bedeutung. Zu den Sialinsäure-spezifischen Lektinen gehören die Selektine und die Siglecs (*sialic acid binding immunoglobulin-like lectin*). Selektine findet man bevorzugt auf Endothelzellen, Leukozyten und Thrombozyten, bezeichnet als E-, L- und P-Selektine (Lehmann *et al.*, 2006). Diese Selektine erkennen Tetrasaccharide vom Typ Sialyl-Lewis^x (Neu5Ac- α -2,3-Gal- β -1,4[Fuc- α -1,3-]GalNAc- β -1,R) oder Sialyl-Lewis^a (Neu5Ac- α -2,3-Gal- β -1,4[Fuc- α -1,4-]GalNAc- β -1,R) (Phillips *et al.*, 1990; Berg *et al.*, 1991). Selektine vermitteln das sogenannte *rolling*, wobei die Leukozyten aus dem Blutstrom abgebremst werden und ins Gewebe migrieren können (Lasky, 1995). Die feste Adhäsion der Leukozyten an das Gefäßendothel und das Einwandern (*homing*) in das entzündete Gewebe wird anschließend durch Integrine vermittelt. Auch bei diesem Prozess spielen die Sialinsäuren eine wichtige Rolle, denn je geringer der Sialylierungsgrad der Bindungspartner, desto stärker ist ihre Adhäsion (Takeda, 1987). Die Siglecs werden aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten in zwei Kategorien unterteilt. Siglec-1 (Sialoadhäsion), Siglec-2 (CD22), Siglec-4 (Myelin-assoziiertes Glykoprotein; MAG) und Siglec-15 gehören zur ersten Kategorie und sind innerhalb der Säugetiere konserviert. Zur zweiten Kategorie gehören die CD33 verwandten Siglecs (Crocker *et al.*, 2007). Mit Ausnahme von MAG, welches im Nervensystem auf Schwann Zellen und Oligodendrozyten zu finden ist, werden Siglecs überwiegend auf Zellen des hämatopoetischen- und des Immunsystems exprimiert und sind somit maßgeblich an dessen Regulationsmechanismen beteiligt. Das Sialoadhäsion ist ausschließlich auf Makrophagen zu finden und reguliert dessen Interaktion mit anderen Immunzellen durch spezifische Bindung an α -2,3-verknüpfte Sialinsäuren (Crocker *et al.*, 1997). CD22 dagegen erkennt bevorzugt α -2,6-verknüpfte Sialinsäuren und ist an der Regulation von B-Zell Interaktionen und deren Homöostase beteiligt (Tedder *et al.*, 1997). CD33 verwandte Siglecs sind ubiquitär verbreitet auf reifen Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Neutrophile, Eosinophile und Monozyten und haben weitreichende Funktionen, wie die Regulation der Proliferation (Vitale *et al.*, 1999), Apoptoseinduktion (Nutku *et al.*, 2003) und die Induktion der Zytokinsekretion (Avril *et al.*, 2004). Sialinsäuren sind aber nicht nur für die Regulation des Immunsystems verantwortlich, sondern auch dafür, dass dieses erst in Aktion treten muss. Viele Pathogene sind in der Lage Wirtszellen zu infizieren, indem sie an deren Oberflächen Sialinsäuren binden. Bekanntestes Beispiel ist der Influenza Virus, der mittels seines Oberflächen Lektins Hämagglutinin, sialylierte Strukturen auf der Wirtszelle erkennt (Walop *et al.*, 1960). Neben Viren können so auch Bakterien, Parasiten und Toxine in die Wirtszellen gelangen. Darüber hinaus häufen sich die Berichte, dass Sialinsäuren auch an Fertilisationsprozessen beteiligt sind, sowohl beim Kontakt der Samenzelle mit der Eizelle (Mengerink und Vacquier, 2001) als auch bei Interaktionen von Samenzellen mit der Oberfläche des weiblichen Reproduktionstraktes, bevor die Eizelle erreicht wird (DeSouza *et al.*, 1998). Es gibt kaum ein zelluläres Ereignis an dem Sialinsäuren nicht beteiligt sind, daher kann eine Störung ihrer Homöostase im Organismus

zu ernsten biologischen und medizinischen Konsequenzen führen, über die bisher noch verhältnismäßig wenig bekannt ist (Schauer, 2004; Varki *et al.*, 2009).

1.2.2 Sialinsäurebiosynthese

Die Biosynthese von Neu5Ac findet hauptsächlich im Zytoplasma statt. Zunächst erfolgt die *de novo*-Synthese von UDP-*N*-Acetylglukosamin (UDP-GlcNAc) aus Fruktose-6-Phosphat, welches aus der Glykolyse abgezweigt wird. Darauf folgt die irreversible Epimerisierung von UDP-GlcNAc zu *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) und anschließend dessen Phosphorylierung zu *N*-Acetylmannosamin-6-phosphat (ManNAc6P). Diese beiden Schritte werden durch das bifunktionelle Enzym UDP-*N*-Acetylglukosamin-2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamin-Kinase (GNE) katalysiert (Hinderlich *et al.*, 1997; Stäsche *et al.*, 1997).

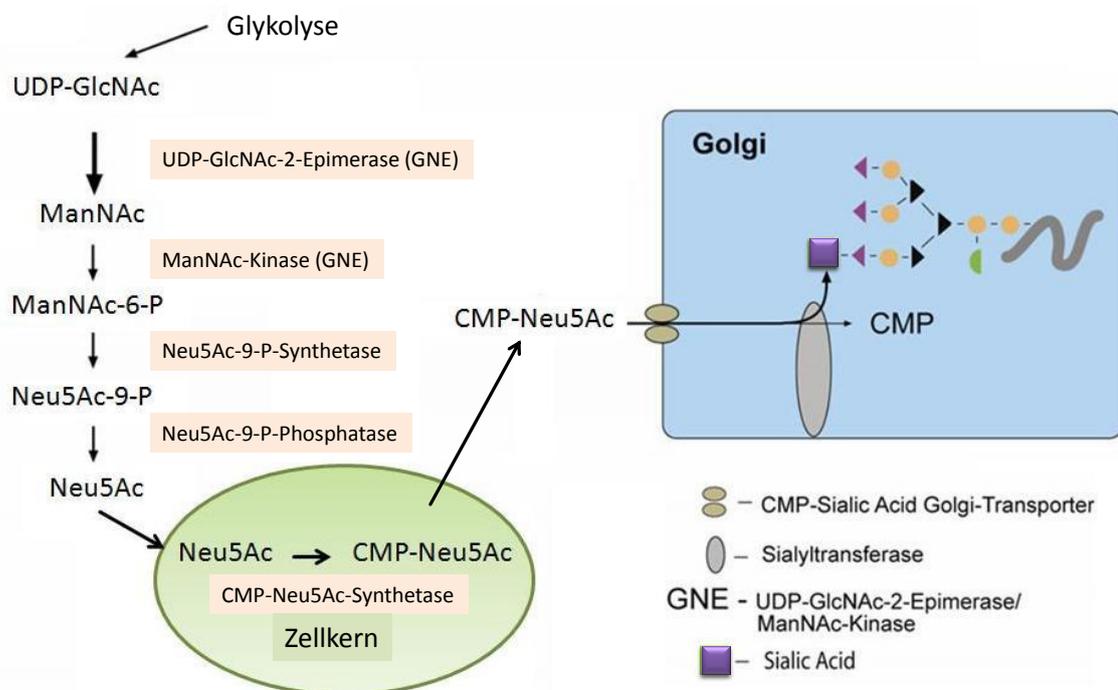


Abbildung 3: Sialinsäurebiosynthese. Dargestellt ist die Biosynthese der *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) in Säugetierzellen ausgehend von der Glykolyse im Zytoplasma bis zur Verknüpfung mit Glykokonjugaten im Golgi-Apparat (modifiziert nach Bork *et al.*, 2007)

N-Acetylhexosamine, die über die Nahrung aufgenommen werden, oder aus dem intrazellulären Abbau von Oligosacchariden stammen, können durch die entsprechenden Kinasen in den Aminozuckerstoffwechsel zurückgeführt werden. So kann ManNAc durch die ManNAc-Kinase, unabhängig von der GNE, phosphoryliert werden (Warren und Felsenfeld, 1961). Durch eine Aldolkondensation mit Phosphoenolpyruvat wird ManNAc6P in *N*-Acetylneuraminsäure-9-Phosphat (Neu5Ac9P) überführt und anschließend dephosphoryliert zu Neu5Ac. Die

Überführung von Neu5Ac in die aktivierte Form CMP-Neu5Ac erfolgt im Zellkern, katalysiert durch die CMP-Neu5Ac-Synthetase unter Abspaltung von Pyrophosphat (Kean, 1991). Die aktivierte Sialinsäure wird anschließend wieder ins Zytoplasma freigesetzt und mittels des CMP-Neu5Ac Transporters in den Golgi-Apparat transportiert, wo sie mit Hilfe spezifischer Sialyltransferasen, unter Abspaltung von CMP, auf Glykokonjugate übertragen wird (Eckhardt *et al.*, 1996; Harduin-Lepers *et al.*, 2005). Erst danach erfolgt die Substitution der Hydroxygruppen durch entsprechende Transferasen, wodurch die enorme strukturelle Vielfalt der Sialylierung entsteht (Reuter & Gabius, 1996). Einzige Ausnahme ist die Bildung von Neu5Gc. Hier erfolgt die direkte Hydroxylierung von CMP-Neu5Ac (Shaw & Schauer, 1988; Muchmore *et al.*, 1989). Durch vesikulären Transport werden die sialylierten Glykokonjugate an ihren Bestimmungsort transportiert.

1.2.3 Das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese

Die UDP-*N*-Acetylglukosamin-2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamin-Kinase (GNE) katalysiert die ersten beiden Schritte der Sialinsäurebiosynthese, die Epimerisierung von UDP-GlcNAc zu ManNAc und dessen anschließende Phosphorylierung zu ManNAc6P. Beide Enzymaktivitäten befinden sich auf einem Polypeptid, was die GNE zu einem bifunktionellen Enzym macht (Hinderlich *et al.*, 1997; Stäsche *et al.*, 1997). Das Enzym besteht aus 722 Aminosäuren und ist 72 kDa groß. Die Epimerase-Domäne befindet sich N-Terminal und die Kinase-Domäne C-Terminal. Früher wurden die Epimerase-Aktivität (Cardini und Leloir, 1957) und die Kinase-Aktivität (Ghosh und Roseman, 1961) unabhängig voneinander beschrieben. Charakteristisch für den Schlüsselschritt einer Biosynthese ist eine starke Regulation. Kornfeld *et al.* entdeckten bereits 1964, dass die UDP-GlcNAc-Epimerase einer strengen *feedback*-Inhibierung, durch das Endprodukt CMP-Neu5Ac, unterliegt (Kornfeld *et al.*, 1964). Ab einer CMP-Neu5Ac Konzentration von 60 μM zeigt das Enzym keine Aktivität mehr. Des Weiteren kann die Epimerase-Aktivität der GNE durch Proteinkinase C vermittelte Phosphorylierung erhöht werden (Horstkorte *et al.*, 2000). Hinderlich *et al.* gelang 1997 die Reinigung eines stabilen und homogenen Enzyms aus Rattenleber. Dieses Enzym lag in zwei verschiedenen oligomeren Zuständen vor, als Homohexamer und als Homodimer. Das Hexamer besitzt sowohl die Epimerase-Aktivität, als auch die Kinase-Aktivität, wohingegen das Dimer nur die Kinase-Aktivität zeigt (Hinderlich *et al.*, 1997). Das deutet auf eine Regulation der Epimerase-Aktivität über verschiedene oligomere Zustände des bifunktionellen Enzyms hin. Während die Epimerase-Aktivität einer sehr komplexen Regulation unterliegt, bleibt die Aktivität der Kinase dabei unbeeinflusst, was die regulatorische Schlüsselrolle der UDP-GlcNAc-2-Epimerase hervorhebt. Die Expressionsrate der GNE ist ebenfalls einem Regulationsmechanismus unterworfen. Im Vergleich zu normalem Lebergewebe ist in Hepatomgewebe die Expression der GNE um 90 % verringert, was vermutlich auf den Rückgang der Serum-

glykoproteinsynthese in Hepatomegeweben zurückzuführen ist (Kikuchi *et al.*, 1971; Harms *et al.*, 1973).

1.2.4 Pathologie der GNE

Bisher sind zwei Krankheitsbilder bekannt, die auf Mutationen der GNE zurückzuführen sind. Zum einen die neuromuskuläre Erkrankung GNE-Myopathie und zum anderen die sehr seltene Stoffwechselerkrankung Sialurie. Bis heute sind mehr als 40 Mutationen weltweit ermittelt worden, die zur GNE-Myopathie führen und drei Punktmutationen, die zur Sialurie führen. Im Gegensatz zur GNE-Myopathie, bei der sich die Mutationen über das gesamte Protein erstrecken, beschränken sich die Sialurie-Mutationen auf die Epimerase-Domäne der GNE.

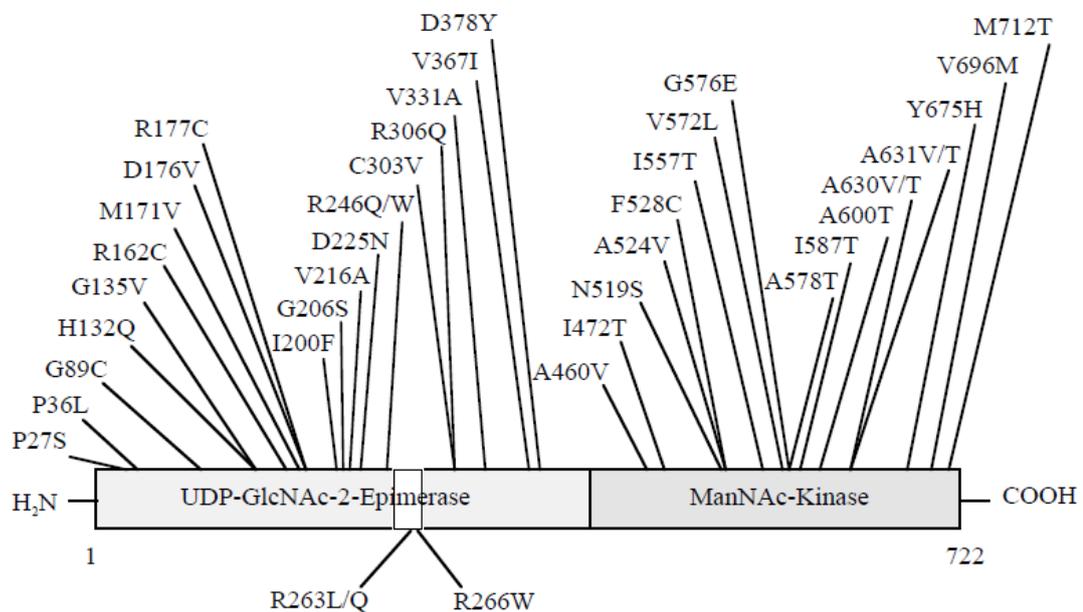


Abbildung 4: Mutationen der GNE. Schematische Darstellung der Myopathie-Mutationen (oben) und der Sialurie-Mutationen (unten) im Gen der GNE. Die Epimerase-Domäne ist hellgrau, die Kinase-Domäne ist dunkelgrau und die postulierte CMP-Neu5Ac Bindungsstelle ist weiß unterlegt.

1.2.5 Sialurie

Sialurie ist eine seltene erbliche Störung der Sialinsäurebiosynthese, die durch eine massive Überproduktion und Akkumulation freier Sialinsäuren im Zytoplasma, sowie durch eine massive Sialinsäureausscheidung im Urin charakterisiert ist (Leroy, 1993a; Enns *et al.*, 2001). Hervorgerufen wird diese Überproduktion durch eine defekte *feedback*-Inhibierung der GNE (Weiss *et al.*, 1989). Bisher wurden drei Mutationen beschrieben, die zum Krankheitsbild der Sialurie führen. Es handelt sich um Punktmutationen, wobei entweder das Arginin an Position 266 gegen Tryptophan (R266W) bzw. Glutamin (R266Q) getauscht ist, oder das Arginin an

Position 263 ist durch Leucin (R263L) ersetzt. Alle drei Mutationen befinden sich im allosterischen Zentrum der GNE (Seppala *et al.*, 1999) und bewirken, dass das Endprodukt der Sialinsäurebiosynthese, CMP-Neu5Ac, nicht mehr an die GNE bindet und dadurch keine Inhibierung erfolgt. Die Folge ist eine unkontrollierte Neu5Ac Produktion. Es erfolgt nicht nur eine Anreicherung freier Sialinsäuren im Zytoplasma, sondern auch eine massive Ausscheidung von freien Sialinsäuren im Urin. Da bei allen bekannten Patienten die genannten Mutationen heterozygot vorliegen, handelt es sich bei der Sialurie um eine dominant vererbte Krankheit (Seppala *et al.*, 1999; Leroy *et al.*, 2001).

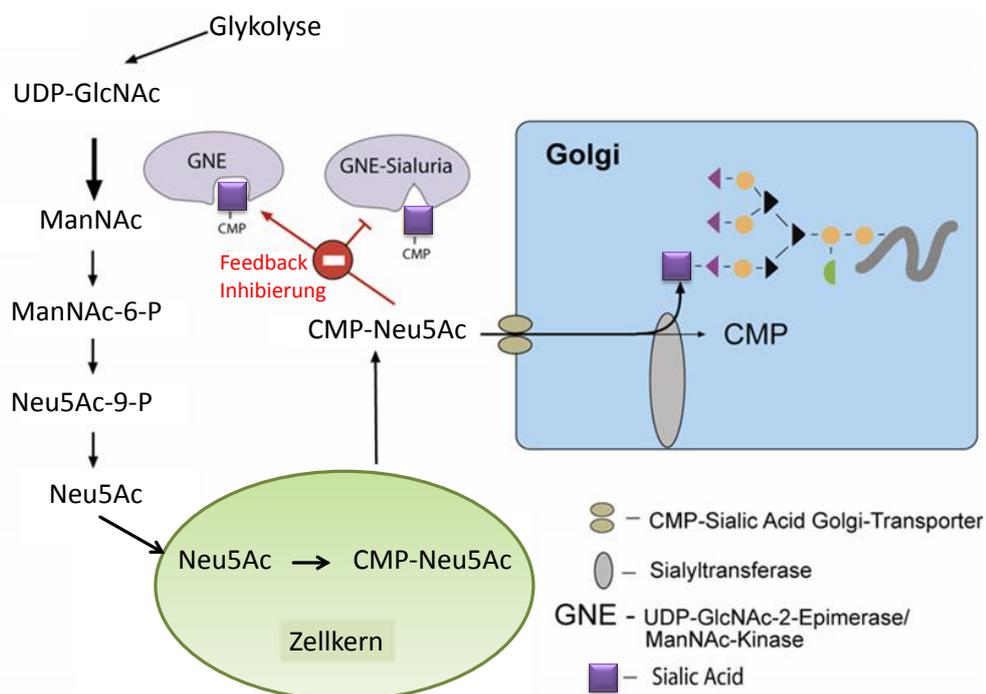


Abbildung 5: GNE feedback-Inhibierung. Dargestellt ist der Verlauf der Sialinsäurebiosynthese in Säugtierzellen mit der *feedback*-Inhibierung der GNE im gesunden Zustand und im Zustand der Sialurie. (modifiziert nach Bork *et al.*, 2007)

Symptomatisch ist die Sialurie sehr vielseitig und daher auch schwer zu diagnostizieren. Mit Ausnahme der hohen Sialinsäurekonzentration im Urin sind die Symptome variabel und treten vorwiegend in der Kindheit auf (Leroy, 1993a). Sialurie-Patienten sind im Kindesalter häufig von einer groben Gesichtsform (*coarse facial feature*) betroffen, was sehr typisch für Stoffwechselkrankheiten ist. Häufig treten auch Lebervergrößerung (Hepatomegalie), verlängerte neugeborenen Gelbsucht und Krampfanfälle auf. Des Weiteren zeigen Sialurie Patienten unterschiedlich stark ausgeprägte Entwicklungsverzögerungen, welche sowohl beim

Skelettwachstum auftreten können, als auch während der neuronalen Entwicklung. Hier sind sehr häufig die kognitiven Fähigkeiten betroffen, was sich unter Anderem in Lernschwierigkeiten äußert. Aufgrund der hohen Sialinsäurekonzentration im Zytoplasma, welche bisher nur in Fibroblasten betroffener Personen nachgewiesen wurde, ist es möglich, dass auch verschiedene Glykokonjugate hypersialyliert sind, worin die Ursache der verschiedenen Symptome liegen könnte (Hinderlich *et al.*, 2013). Wopereis *et al.* konnte feststellen, dass der Anteil an α -2,6-gebundenen Neu5Ac-Resten in *O*-Glykanen der Serumproteine bei Sialurie-Patienten deutlich zunimmt, wohingegen bei *N*-Glykanen die Erhöhung weniger stark ist (Wopereis *et al.*, 2006). Weltweit sind bisher sieben Sialurie Patienten publiziert. Es wird jedoch angenommen, dass aufgrund der milden und schwer erkennbaren Symptomatik die Prävalenz sehr viel höher ist (Leroy, 1993b).

1.3 Polysialinsäure

Polysialinsäure (PolySia) ist ein lineares Homopolymer aus α -2,8-verknüpften Neu5Ac-Molekülen und wurde erstmals 1982 von Finne *et al.* in Vertebraten beschrieben (Finne, 1982). Polysialinsäure Strukturen sind in der Natur weit verbreitet, so kommt es als bakterielles Kapselpolysaccharid in Neuropathogenen wie *Escherichia coli K1* und *Neisseria meningitidis* der Gruppe B vor. Zudem wurde Polysialinsäure auf Glykoproteinen der Eier von Fischen, Seeigeln und Amphibien nachgewiesen. Auf einer Vielzahl menschlicher Tumorarten wird Polysialinsäure reexprimiert. (Troy, 1992). In biologischen Systemen erreichen die Polymere durchschnittlich eine Länge von bis zu 90 Neu5Ac-Resten (Galuska *et al.*, 2008), jedoch war es auch möglich einen Polymerisierungsgrad von bis zu 400 Resten nachzuweisen (Nakata und Troy, 2005).

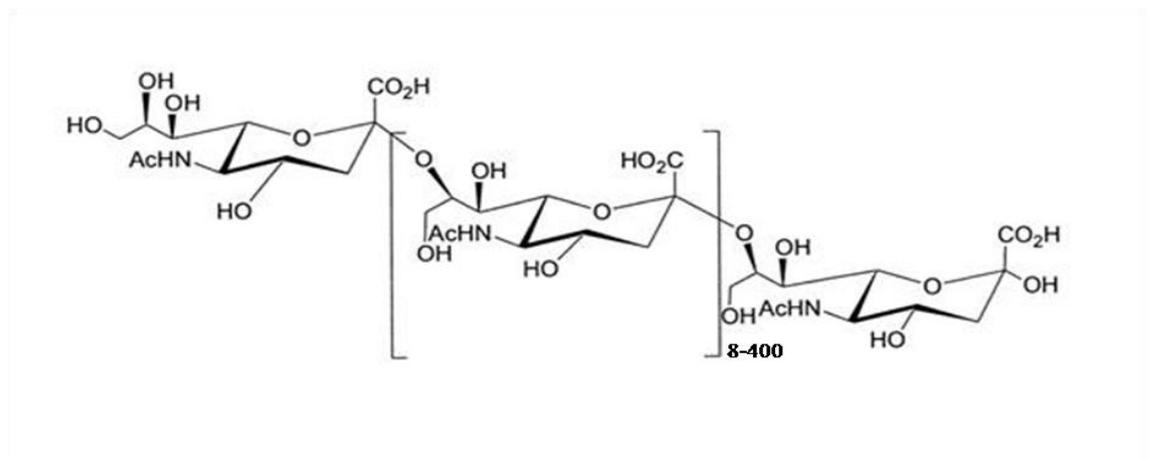


Abbildung 6: Polysialinsäure. Dargestellt ist ein Homopolymer aus α -2,8-verknüpften Neu5Ac-Molekülen. Ab einem Polymerisierungsgrad von acht Neu5Ac-Molekülen spricht man von Polysialinsäure.

Hauptakzeptormolekül für PolySia ist das Neurale Zelladhäsionsmolekül (*neural cell adhesion molecule*, NCAM). NCAM gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und besteht extrazellulär aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen (*Ig-like domain*), sowie zwei Fibronectin-Typ-III Domänen.

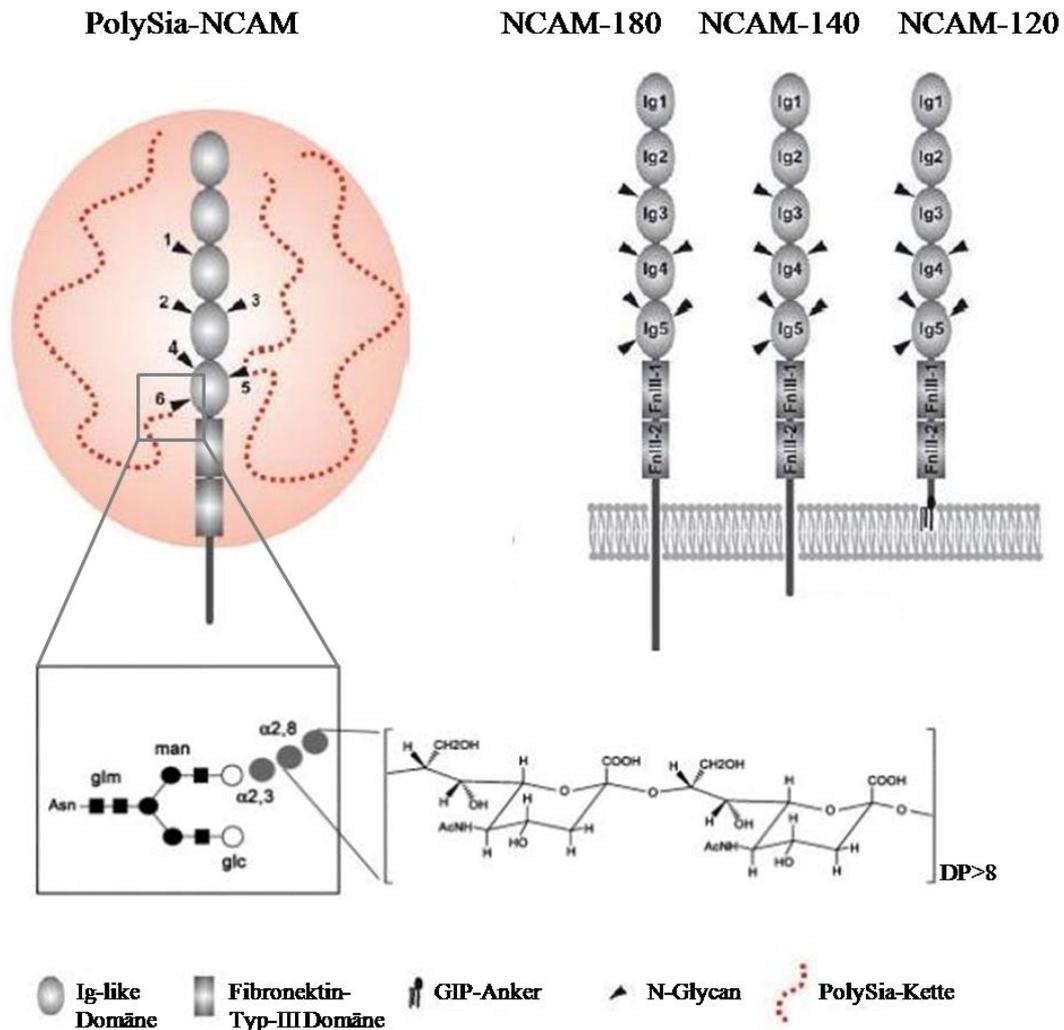


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Struktur von NCAM und polysialyliertem NCAM. NCAM besitzt einen extrazellulären N-terminalen Bereich aus fünf Ig-like Domänen und zwei membrannahen Fibronectin-Typ-III Domänen, eine Transmembran-Domäne und eine intrazelluläre C-terminale Domäne. Zwei der drei N-Glykane in der fünften Ig-like Domäne werden durch α -2,8-gebundene Sialinsäuren (Polysialinsäure) verlängert, welche den hydrodynamischen Radius von NCAM enorm erhöht. Die drei Hauptisomere NCAM-120, -140 und -180 unterscheiden sich durch ihre zyttoplasmatische Domäne. (modifiziert nach Bonfanti, 2006 und Hildebrandt *et al.*, 2010).

Intrazellulär gibt es einige Unterschiede, wodurch man drei Hauptisomere unterscheidet, welche anhand ihrer apparenten Molmassen als NCAM-120, NCAM-140 und NCAM-180 bezeichnet werden. Im Gegensatz zu NCAM-120, sind NCAM-140 und -180

Transmembranproteine, welche sich in der Länge ihrer intrazellulären Domäne unterscheiden. NCAM-120 dagegen ist über einen GIP-Anker mit der Plasmamembran verbunden (He *et al.*, 1987). Jedes NCAM Molekül besitzt sechs potentielle *N*-Glykosylierungsstellen in den extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen (Albach *et al.*, 2004), sowie zwei *O*-Glykosylierungsstellen in den beiden Fibronectin-Typ-III Domänen (Walsh *et al.*, 1989; Ong *et al.*, 2002). Alle *N*-Glykosylierungsstellen sind mit Glykanen des komplexen Typs modifiziert (Albach *et al.*, 2004). Polysialylierte Glykane wurden bisher nur an der fünften (ASN₄₃₁) und sechsten (ASN₄₆₀) *N*-Glykosylierungsstelle gefunden, welche sich in der fünften Immunglobulin-ähnlichen Domäne befinden (Nelson *et al.*, 1995; Liedtke *et al.*, 2001). Polysialylierte NCAM *N*-Glykane weisen ein hohes Maß an Heterogenität auf, so wurden Polysialinsäuren auf di, tri und tetra-antennären Core-Strukturen nachgewiesen, die zusätzlich auch mit Fukose-, Sulfat- und Uronsäureresten modifiziert sein können (Kudo *et al.*, 1996; Liedtke *et al.*, 2001; Geyer *et al.*, 2001; von Der Ohe *et al.*, 2002; Wuhrer *et al.*, 2003). Die Voraussetzung für das Anheften eines α -2,8-verknüpften Sialinsäurepolymers ist das Vorhandensein einer terminalen α -2,3 oder α -2,6-verknüpften Sialinsäure am Core-Glykan (Mühlenhoff *et al.*, 1996). Die Polysialinsäuresynthese verläuft im Golgi-Apparat durch zwei Polysialyltransferasen, ST8SiaII (Yoshida *et al.*, 1995; Scheidegger *et al.*, 1995) und ST8SiaIV (Eckhardt *et al.*, 1995; Nakayama *et al.*, 1995). Im Mausgehirn konnte gezeigt werden, dass die Zahl der PolySia-Ketten pro NCAM-Molekül variieren kann. Die Mehrheit der NCAM-Glykane enthält zwei PolySia-Ketten. Jedoch kommen aufgrund der hohen Komplexität der Core-Glykane auch drei oder vier PolySia-Ketten pro Glykan vor (Galuska *et al.*, 2008). Die Zahl der Ketten wird letzten Endes auch durch die vorhandenen Glykanantennen beeinflusst (Hildebrandt *et al.*, 2010). Die Länge variiert wie eingangs bereits erwähnt zwischen 90 und 400 Resten und deren Verteilung ist während der Gehirnentwicklung sehr unterschiedlich (Inoue und Inoue, 2001).

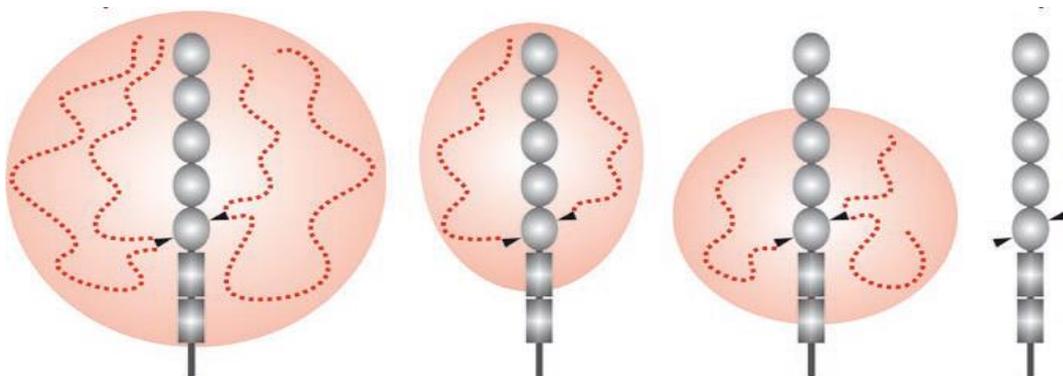


Abbildung 8: Variabilität der NCAM-Polysialylierung. Die Polysialylierung beschränkt sich auf die fünfte Ig-ähnliche Domäne des NCAM-Moleküls. Die Variabilität ergibt sich aus der Anzahl der PolySia-Ketten pro *N*-Glykan und der Länge jeder PolySia-Kette. (Modifiziert nach Hildebrandt *et al.*, 2010)

In den letzten Jahren wurden neben NCAM noch weitere polysialylierte Moleküle identifiziert. Dazu gehören die α -Untereinheit eines spannungsabhängigen Natriumkanals im Rattengehirn (Zuber *et al.*, 1992), das in der humanen Muttermilch vorkommende Membranprotein CD36 aus der Familie der Scavenger-Rezeptoren (Yabe *et al.*, 2003) und Neurophilin-2 auf humanen dendritischen Zellen (Curreli *et al.*, 2007). Darüber hinaus sind die Polysialyltransferasen zur autopolysialylierung befähigt (Mühlenhoff *et al.*, 1996; Close und Colley, 1998). Ein weiteres polysialyliertes Zelladhäsionsmolekül (SynCAM) wurde 2010 durch Galuska *et al.* identifiziert (Galuska *et al.*, 2010). Hauptakzeptor für PolySia bleibt jedoch NCAM, da ein NCAM *knockout* zum Totalverlust der Polysialylierung im Organismus führt (Cremer *et al.*, 1994).

1.3.1 Bedeutung der Polysialinsäure im Organismus

Polysialinsäure dient als Regulator von Zellinteraktionen. Aufgrund der Größe der Polysialinsäure ist die Hydrathülle, hervorgerufen durch die negative Ladung der *N*-Acetylneuraminsäuren, äußerst voluminös. Der hydrodynamische Radius der extrazellulären Domäne des NCAM-Moleküls wird durch die PolySia-Modifikation nahezu verdoppelt, wodurch die adhäsiven Eigenschaften von NCAM reduziert werden (Cunningham *et al.*, 1983; Sadoul *et al.*, 1983). Durch elektrostatische Abstoßung und sterische Effekte resultiert eine Vergrößerung des Intermembranraums (*steric hindrance model*), wodurch nicht nur die *cis* und *trans* Wechselwirkungen benachbarter NCAM-Moleküle beeinflusst werden, sondern auch die Interaktionen anderer Zelladhäsionsmoleküle, wie Cadherine und Integrine, welche nicht unmittelbar polysialyliert sind. Die Folge ist eine generelle Erhöhung der zellulären Beweglichkeit (Yang *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 2005), was die Grundlage für *remodeling* Prozesse der neuronalen Plastizität und für *repair* Prozesse ist (Zhang *et al.*, 2008; Rutishauser, 2008; El Maarouf und Rutishauser, 2008). Die Schlüsselfunktion der Polysialylierung ist es die Interaktionen von NCAM während der Entwicklung zu kontrollieren (Mühlenhoff *et al.*, 2009), was durch die stark entwicklungsabhängige Regulation der Polysialylierung unterstützt wird. Während der Embryonalentwicklung der Maus erscheint NCAM erstmalig an Tag 8 (E 8) (Probstmeier *et al.*, 1994) und kurz darauf, an Tag 9 (E 9), kann zum ersten Mal Polysialinsäure nachgewiesen werden (Probstmeier *et al.*, 1994; Ong *et al.*, 1998). Das Maximum der Polysialylierung ist bereits am Tag 1 postnatal (p.n.) erreicht, gefolgt von einer dramatischen Reduktion bis Tag 21 p.n. um ca. 70 % (Oltmann-Norden *et al.*, 2008). Im adultem Gehirn ist Polysialinsäure nur noch in Arealen mit anhaltender Neurogenese und Plastizität zu finden. Hierzu zählen Bereiche der Hippocampusformation (Becker *et al.*, 1996; Seki & Rutishauser, 1998), neurosekretorische Neuronen des Hypothalamus-Hypophysensystems (Theodosis *et al.*, 1991) und Neuroblasten des Bulbus olfactorius (Eckhardt *et al.*, 2000). Es wird angenommen, dass die Polysialylierung das NCAM maskiert und so sichergestellt ist, dass NCAM Interaktionen zeit- und ortsspezifisch stattfinden (*timing error model*) (Mühlenhoff *et al.*, 2009).

Das frühzeitige Auftreten von nicht-polysialyliertem NCAM führt zu einer gestörten Bildung von Nervenfasern (Hildebrandt *et al.*, 2009). Wie wichtig der richtige Polysialylierungsstatus ist, zeigt auch die Tatsache, dass ein *knockout* beider Polysialyltransferasen, bei normaler NCAM-Expression, postnatal letal ist (Weinhold *et al.*, 2005; Angata *et al.*, 2007). Neben der Funktion als Regulator der Zelladhäsion ist Polysialinsäure aber auch direkt an zellulären Vorgängen beteiligt. Die Interaktion von polysialyliertem NCAM mit dem Wachstumsfaktor BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) sorgt dafür, dass kortikale Neuronen sensitiver gegenüber BDNF werden (Muller *et al.*, 2000), wobei die Interaktion abhängig von der PolySia-Kettenlänge ist (Kanato *et al.*, 2008). Polysialinsäure kann mit Heparansulfat-Proteoglycanen der Zelloberfläche und der extrazellulären Matrix interagieren und so die Bildung und Umformung von Synapsen beeinflussen (Storms und Rutishauser, 1998; Dityatev *et al.*, 2004). Durch die direkte Interaktion von Polysialinsäure mit Siglec-11 auf menschlichen Microglia, die im Gehirn ansässigen Zellen des angeborenen Immunsystems, wird deren Neurotoxizität gemildert (Wang und Neumann, 2010).

NCAM und Polysialinsäure sind essentielle Faktoren für die Entwicklung und Funktion des Nervensystems. Zahlreiche Studien belegen den Einfluss von PolySia auf die Neurogenese, Migrationsprozesse, Ausbildung von Axonen sowie Synaptogenese und synaptische Plastizität (Rougon und Hobert, 2003; Dityatev und Schachner, 2006; Gascon *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 2008). Um die zahlreichen Funktionen von Polysialinsäure genauer untersuchen zu können, wurde 1994 von Cremer *et al.* die NCAM *knockout* Maus (NCAM^{-/-}) generiert. Entgegen der Erwartung war diese Maus lebensfähig und fertil und zeigte nur einen milden Phänotyp. Unter anderem zeigen die Mäuse eine auffallende Verkleinerung des olfaktorischen Bulbus, hervorgerufen durch eine gestörte Migration der olfaktorischen neuronalen Vorläuferzellen entlang des rostralen Migrationsweges von der Subventrikularzone zum Riechkolben. Zudem wurde eine Inhibierung der Langzeitpotenzierung (*long term potentiation*, LTP) in der CA1 Region des Hippocampus bei den PolySia-defizienten Mäusen festgestellt (Cremer *et al.*, 1994). Die LTP ist eine langandauernde Verstärkung der synaptischen Übertragung und bildet die Grundlage für Lern- und Gedächtnisprozesse. Bei den NCAM *knockout* Mäusen ist insbesondere das räumliche Lernen beeinträchtigt (Cremer *et al.*, 1994). Anhand von Studien mit Ratten konnte die Bedeutung der Polysialinsäure für Lern- und Gedächtnisleistungen weiter belegt werden. Nach einer Trainingsperiode im Morris-Wasserlabyrinth (*morris water maze test*), welches Rückschlüsse auf das räumliche Lernen erlaubt, konnte eine erhöhte Polysialylierung im Gehirn von Mäusen festgestellt werden (O'Connell *et al.*, 1997), wohingegen das Entfernen von Polysialinsäure das Lern- und Erinnerungsvermögen vermindert (Becker *et al.*, 1996).

Bei Vertebraten ist die Mehrheit der Axone von einer Myelinscheide umhüllt, wodurch die Erregungsleitung an der Nervenfasern enorm erhöht wird. Polysialinsäure hat einen inhibierenden Einfluss auf die, von Oligodendrozyten vermittelte, Myelinisierung von

Nervenfaser. Um eine effiziente Myelinisierung zu gewährleisten wird die Expression der Polysialinsäure auf Oligodendrozyten während ihrer Differenzierung reduziert. Die dauerhafte Expression von PolySia-NCAM auf Oligodendrozyten in transgenen Mäusen, welche die Polysialyltransferase ST8SiaIV überexprimieren, führte zu einem verringerten Myelingeht im Vorderhirn. Darüber hinaus wiesen diese Mäuse eine verringerte Anzahl an reifen Oligodendrozyten auf und zeigten Abnormalitäten wie degenerierte Axone (Fewou *et al.*, 2007). Da Polysialinsäure einen enormen Einfluss auf die neuronale Plastizität hat, nimmt man an, dass eine Polysialinsäure-Reexpression helfen könnte, die Bildung und Migration von Vorläuferzellen, sowie die Regeneration von beschädigten Axonen voranzutreiben (Rutishauser, 2008). Zhang *et al.* konnten zeigen, dass eine virusinduzierte PolySia-Expression nach einer Rückenmarksverletzung die Regeneration erhöht, die Eingliederung sensorischer Neuronen ins verletzte Rückenmark fördert und die Dendritenbildung von Purkinje Zellen nach einer Verletzung erhöht (Zhang *et al.*, 2007c, 2007a, 2007b).

Neueste Studien belegen, dass Polysialinsäure einen Einfluss auf die männliche Fertilität hat. So wurde im humanen Nebenhodeneithel sowie im Postacrosomenbereich humaner Spermien polysialyliertes NCAM nachgewiesen (Simon *et al.*, 2013), wodurch ein cytoprotektiver Effekt resultiert. Die Polysialylierung schützt die Spermien davor frühzeitig vom Immunsystem im weiblichen Reproduktionstrakt abgebaut zu werden (Simon *et al.*, 2013).

1.4 Manipulation der Sialylierung *in vitro* und *in vivo*

Aufgrund ihrer unzähligen Funktionen im Organismus sind Sialinsäuren essentielle Bausteine für Entwicklungsprozesse schon während der Embryogenese. Ein Verlust jeglicher Sialylierung im Organismus, hervorgerufen durch den *knockout* des Schlüsselenzyms der Sialinsäurebiosynthese, führt schon im embryonalen Stadium homozygoter GNE-defizienter Mäuse (GNE^{-/-}) zum Tod (Schwarzkopf *et al.*, 2002). Heterozygote Mäuse (GNE^{+/-}) zeigen dagegen keinen offensichtlichen Phänotyp. Die membrangebundene Sialylierung in den Organen dieser Mäuse ist aber um 25 % bis 40 % reduziert. Darüber hinaus ist die Expression der Polysialinsäure im Gehirn um ca. 54 % reduziert (Gagiannis *et al.*, 2007b). In GNE-defizienten embryonalen Stammzellen fehlt die Polysialinsäure-Expression sogar vollständig und die Zelloberflächensialylierung ist um 75 % reduziert, wobei dieser Verlust durch die Behandlung der Zellen mit *N*-Acetylmannosamin (ManNAc), dem physiologischen Vorläufer der *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), wieder ausgeglichen werden kann (Schwarzkopf *et al.*, 2002).

Die Epimerase-Aktivität der bifunktionellen GNE wird durch das Endprodukt der Sialinsäurebiosynthese, CMP-Neu5Ac, inhibiert. Die Kinase-Aktivität ist dadurch nicht betroffen, wodurch die Sialinsäuresynthese durch Applikation von ManNAc unterstützt werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von ManNAc, *in vitro* durch

Behandlung von CHO Zellen und *in vivo* durch intraperitoneale Injektion bei Mäusen, die intrazelluläre Sialinsäurekonzentration und die Polysialylierung von NCAM erhöht (Bork *et al.*, 2005; Gagiannis *et al.*, 2007a).

Die Erhöhung der Sialylierung von Glykanen ist von enormer Bedeutung für die Herstellung therapeutischer Glykoproteine. Die Sialylierung hat einen großen Einfluss auf die Funktionalität und Wirkung des therapeutischen Produktes, da die Verweildauer im Serum (Serumproteinhalbwertszeit) beeinflusst wird (Morell *et al.*, 1971; Weiss und Ashwell, 1989), zudem wird die Erkennung durch das Immunsystem verringert (Pilatte *et al.*, 1993) und die physiko-chemischen Eigenschaften des Proteins werden durch Sialylierung beeinflusst (Lawson *et al.*, 1983; Tsuda *et al.*, 1990). Um eine unvollständige und heterogene Sialylierung zu vermeiden, wurden in den letzten Jahren verschiedene Ansätze verfolgt. So konnte die unvollständige Sialylierung von Interferon-gamma (IFN- γ) und Erythropoetin (EPO), zwei bedeutsame Glykoproteine, welche großtechnisch in CHO-Zellkultur hergestellt werden, durch Zugabe von ManNAc minimiert werden (Gu und Wang, 1998; Debeljak und Sytkowski, 2008). Gleichzeitig konzentrierte man sich auf die Möglichkeit die Enzyme der Glykanbiosynthese zu überexprimieren. Verbesserte Sialylierungen konnten durch Überexpression von Glykosyltransferasen, des CMP-Sialinsäure Transporters und durch stabile Expression der humanen α -2,6-Sialyltransferase erreicht werden (Bragonzi *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2008).

Die Transfektion von CHO Zellen mit einer Sialurie-mutierten GNE führte zu einer Erhöhung der intrazellulären Sialinsäurekonzentration und gleichzeitig zu einer vermehrten Expression von Polysialinsäure (Bork *et al.*, 2005). Mit Hilfe dieser Zelllinie konnte auch der Sialylierungsgrad von EPO enorm verbessert werden. Damit sind Sialurie-mutierte Zellkulturen ein vielversprechender Ansatz zur Produktion von homogen sialylierten therapeutischen Glykoproteinen (Bork *et al.*, 2007b).

Kayser *et al.* konnte zeigen, dass Zellen nichtphysiologische Sialinsäure Vorläufer, wie *N*-acylmodifizierte *D*-Mannosamine aufnehmen können und diese dann in die jeweilige *N*-acylmodifizierte Sialinsäure metabolisieren (Kayser *et al.*, 1992, 1993). Abhängig vom Zelltyp können so 10-85 % der physiologischen Sialinsäuren in Glykokonjugaten durch modifizierte Sialinsäuren ersetzt werden (Keppler *et al.*, 2001). Diese Veränderung der Oberflächenstruktur hat einen enormen Einfluss auf die biologische Stabilität von Glykokonjugaten (Horstkorte *et al.*, 2001) Durch Applikation von *N*-Propanoyl- (ManNProp), *N*-Butanoyl- (ManNBut) und *N*-Pentanoyl-*D*-Mannosamin (ManNPent) kann ebenfalls die Expression von Polysialinsäure reduziert werden (Bork *et al.*, 2007a).

2 Zielstellung

Sialinsäuren sind essentiell für eine Vielzahl von zellulären Interaktionsprozessen. Die Mehrheit der in der Zelle vorkommenden Sialinsäuren sind als terminale Komponente an Glykokonjugate gebunden. Sialinsäuren in freier Form sind in der Zelle nur selten anzutreffen, da ihre Synthese durch einen *feedback*-Inhibierungsmechanismus stark reguliert ist. Bei der humanen Erbkrankheit Sialurie ist dieser Mechanismus, aufgrund einer Punktmutation der GNE, defekt. Die Folge ist eine ungehinderte Synthese von Sialinsäuren im Zytoplasma. Um den Einfluss einer erhöhten intrazellulären Sialinsäurekonzentration auf den Organismus besser untersuchen und verstehen zu können, bedarf es eines *in vivo* Modells. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher eine transgene Mauslinie für die humane Erbkrankheit Sialurie etabliert und charakterisiert werden. Hierfür sollte zunächst, mittels der Mikroinjektionstechnik, die GNE mit der Sialurie-Mutation R263L in das Genom von FVB/N Mäusen eingeschleust werden. Durch PCR-Analysen sollten Tiere selektiert werden, die sowohl die mutierte DNA im Genom integriert haben, als auch die Expression der Sialurie-mutierten GNE aufweisen. Diese Tiere sollten für die Zucht der transgenen Mauslinien verwendet werden. Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Charakterisierung der entstandenen Mauslinien erfolgen. Hierfür sollte zunächst die Konzentration von freien Sialinsäuren im Urin, Gewebe und Blut bestimmt werden, da eine massive Sialinsäureüberproduktion das primäre Charakteristikum der Sialurie ist. Des Weiteren sollte untersucht werden, welche Auswirkung eine erhöhte intrazelluläre Sialinsäurekonzentration auf die Oberflächensialylierung von Glykokonjugaten hat. Im Focus steht hier die Betrachtung der Polysialylierung von NCAM, da in vorrangegangenen *in vitro* Studien bereits gezeigt werden konnte, dass die Polysialylierung durch die Sialurie-Mutation zunimmt. Polysialinsäure spielt während der Gehirnentwicklung eine essentielle Rolle, wobei die PolySia-Expression mit zunehmendem Alter stark abnimmt. Es soll daher untersucht werden, inwiefern diese Regulation, bei veränderter intrazellulärer Sialinsäurekonzentration, gestört ist. Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang zu den Entwicklungsverzögerungen bei Sialurie-Patienten. Vorrangegangene *in vivo* und *in vitro* Studien haben gezeigt, dass auch Applikationen von Sialinsäurevorläufern wie ManNAc die intrazelluläre Sialinsäurekonzentration beeinflussen können. Es soll daher untersucht werden ob die Fütterung von Mäusen mit ManNAc durch das Trinkwasser ebenfalls zu einer Erhöhung der intrazellulären Sialinsäurekonzentration führt.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

In dieser Arbeit wurden Mäuse des Inzuchtstamms FVB/N verwendet. Die Wildtyp-Mäuse wurden von Charles River Laboratories bezogen. Die Tiere zur Anzucht der transgenen Linie stammten aus der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin in Berlin.

3.2 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien wurden soweit nicht anders angegeben von Roth, Merck und AppliChem bezogen. Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien sind im Methodenteil angegeben.

3.3 Antikörper, Lektine und Enzyme

Primärantikörper

α -PolySia 735 mAK (Maus IgG2A) erkennt α 2,8 verknüpfte Sialinsäure ab einer Kettenlänge von acht und wurde 1:2000 mit TBS Puffer verdünnt eingesetzt
(AG R. Gerardy-Schahn)

α -NCAM 5B8 mAK erkennt die intrazelluläre Domäne von NCAM-140 und NCAM-180 und wurde 1:10 mit TBS Puffer verdünnt eingesetzt
(selbst hergestellt)

Sekundärantikörper

Ziege- α -Maus IgG, Peroxidase konjugiert erkennt alle Subklassen der Maus IgG, IgA und IgM und wurde 1:10.000 eingesetzt
(Dako)

Lektine

LFA (*Limax Flavus* Agglutinin, FITC konjugiert) Das Lektin bindet spezifisch an Sialinsäurereste in Verbindung mit Glykokonjugaten.
(EY Laboratories, San Mateo, CA)

Enzyme

Proteinase K	Sigma
Superscript II Reverse Transkriptase	Life technologies
Endosialidase	AG R. Gerardy-Schahn
DNaseI	Roche

3.4 Plasmide und Oligonukleotide

Plasmid

Für die Mikroinjektion und als Kontroll-Template für PCR Reaktionen wurde das Plasmid pcDNA3.1.-GNE-R263L genutzt, welches von der AG Horstkorte hergestellt wurde. Der eukaryotische Expressionsvektor pcDNATM3.1/ Zeo (+/-) von Invitrogen enthält in der *Multiple Cloning Site* (MCS) die cDNA einer Sialurie-mutierten GNE (R263L) aus *Rattus norvegicus* unter der Kontrolle des *human cytomegalovirus immediate-early* Promotors (CMV-Promoter). Des Weiteren enthält der Vektor ein Polyadenylierungssignal und ein Zeocin Resistenzgen sowie ein Ampicillin Resistenzgen.

Comments for pcDNA3.1/Zeo (+) 5015 nucleotides

CMV promoter: bases 209-863
 T7 promoter priming site: bases 863-882
 Multiple cloning site: bases 895-1010
 BGH reverse priming site: bases 1022-1039
 BGH polyadenylation signal: bases 1021-1235
 f1 origin: bases 1298-1711
 SV40 promoter and origin: bases 1776-2101
 EM7 promoter: bases 2117-2183
 ZeocinTM resistance gene: bases 2184-2558
 SV40 polyadenylation: bases 2688-2817
 pUC origin: bases 3201-3874 (C)
 bla promoter: bases 4880-4978 (C)
 Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 4019-4879 (C)

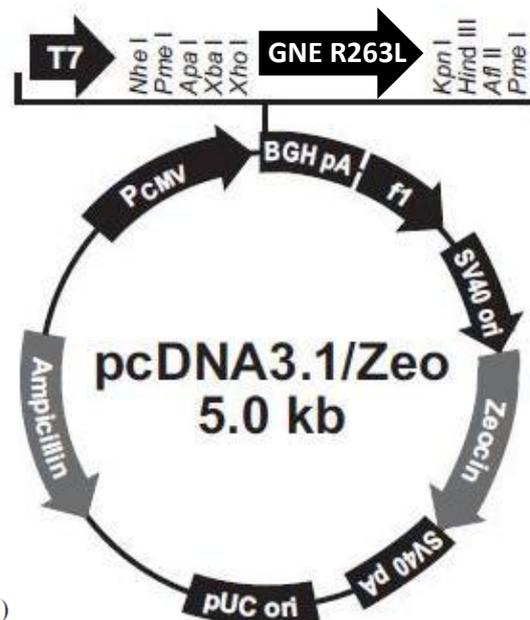


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Plasmids pcDNA3.1.-GNE-R263L

Oligonukleotide

Oligonukleotide dienten als Primer für die PCR und wurden von MWG Biotech bezogen. Die Konzentration der Primer betrug 100 µM.

Genotypisierungsprimer

Typisierungsprimer 1 <i>reverse</i>	5´ GAATGACACCTACTCAGACAATG 3´
Typisierungsprimer 1 <i>forward</i>	5´ GGAGAACTTTGTGACGCTCATC 3´
Typisierungsprimer 2 <i>reverse</i>	5´ AACCAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGC 3´
Typisierungsprimer 2 <i>forward</i>	5´ GGAAATTGGGGTGATGCTCGATGCCCTTC 3´

RT PCR Primer

GNE-S-mRNA-3 <i>reverse</i>	5´ CAGACAATGCGAATGCAATTTCC 3´
GNE-S-mRNA-3 <i>forward</i>	5´ GATACAGGAGTGGAACCTCTGTG 3´
GAPDH <i>reverse</i>	5´ TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3´
GAPDH <i>forward</i>	5´ ACCACAGTCCATGCCATCAC 3´
GNE Exon 452 <i>reverse</i>	5´ CTAGCCACATCCGAATGATG 3´
GNE Exon 452 <i>forward</i>	5´ AAACACATACCGCATGATTGAG 3´

3.5 Gebrauchsfertige Reagenzien und Puffer

Luminata Forte Western HRP Substrate	Merck Millipore
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
Nuklease freies Wasser	Fermentas
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Life Technologies
10 mM dNTP Mix	Life Technologies
0.1 M DTT	Life Technologies
5x first strand buffer	Life Technologies
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific
10-fach DNase Inkubations Puffer	Roche
Rotiphorese® Gel 30	Roth

3.6 Kommerziell erhältliche Kits

Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Gene JET Stabilized and fresh whole blood RNA Kit	Thermo Scientific
µMACS mRNA isolation kit	Miltenyi Biotech
My Taq™ Mix	Bioline
qPCR Green Master	Jena Bioscience

3.7 Molekulargewichtsmarker

Page Ruler™ prestained protein ladder	Thermo Scientific
Gene Ruler™ 1kb DNA ladder	Thermo Scientific
Gene Ruler™ 500 bp DNA ladder	Thermo Scientific

3.8 Tierexperimentelle Arbeiten

3.8.1 Versuchstierhaltung

Alle hier beschriebenen Arbeiten wurden im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung G0176/07 „Herstellung von transgenen Mäusen, die eine Sialurie-Mutation (R263L) tragende UDP-N-Acetylglukosamin-2-Epimerase/N-Acetylmannosamin Kinase (GNE) überexprimieren.“ (transgene GNE R263L Maus) durchgeführt. Für diese Arbeit wurden Mäuse des Stamms FVB/N verwendet. Die für die Mikroinjektion benötigten Tiere stammten aus dem Tierstall der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (Transgene Facility der Charité in Berlin). Die in dieser Arbeit verwendeten Wildtyp- Mäuse des Stamms FVB/N wurden von Charles River Laboratories bezogen.

Sämtliche Tiere wurden im Tierstall des Institutes für Physiologische Chemie in transparenten Kunststoff Käfigen unter keimarmen- und standardisierten klimatischen Bedingungen (Raumtemperatur: 21-22,5°C, rel. Luftfeuchtigkeit: 55-65%) gehalten. Der Tag-Nacht Rhythmus wurde automatisch geregelt und wechselte alle 12 Stunden. Die Umsetzung der Tiere erfolgte wöchentlich und Wasser und Futter erhielten die Tiere *ad libitum*. Das Absetzen der Jungtiere von der Mutter erfolgte im Alter von vier Wochen. Die Tiere wurden nach Geschlecht getrennt und eindeutig durch Ohrlochmarkierung gekennzeichnet. Für verschiedene Versuche während dieser Arbeit wurden die Tiere in zwei Altersgruppen unterteilt. Zum einen die Gruppe „Jung“, welche bis zu drei Monate alte Mäuse umfasst und zum anderen die Gruppe „alt“, welche Mäuse umfasst die älter als drei Monate waren.

3.8.2 Erzeugung transgener Mäuse mittels Mikroinjektion

Die Mikroinjektionstechnik zur Generierung der transgenen Mäuse wurde in Kooperation mit der Transgene Facility der Charité in Berlin durchgeführt. Bei dieser Technik wurde, unter sterilen Bedingungen, 3 ng der zu integrierenden DNA in den männlichen Vorkern einer Zygote (Spenderstamm: FVB/NCrl) im Einzellstadium injiziert. Diese Zygoten reiften dann *in vitro* zu Embryonen heran, welche anschließend in den Uterus von scheinträchtigen Ammentieren implantiert wurden. Die daraus resultierende Nachkommenschaft (F₀- bzw. Founder-Generation) beinhaltet sowohl transgene als auch nicht transgene Tiere. Transgene Tiere wurden mittels PCR-Genotypisierung identifiziert (vgl. 3.8.3). Die transgenen Founder-Tiere wurden zunächst mit FVB/N Wildtypen verpaart, um ausreichend verpaarungsfähige transgene Nachkommen zur Etablierung einer GNE R263L Mauslinie zu erhalten.

3.8.3 Genotypisierung

Um innerhalb der Nachkommenschaft transgene Tiere zu identifizieren wurde der Genotyp mittels PCR bestimmt. Hierfür wurden zunächst von den Tieren Schwanzbiopsien entnommen,

welche zur Gewinnung genomischer DNA dienen. Die Entnahme der Schwanzbiopsien erfolgte im Alter von vier Wochen (nach dem Absetzen der Jungtiere vom Muttertier und deren eindeutiger Kennzeichnung durch Ohrlochmarkierung). Hierbei wurden etwa 0,3 cm vom knorpeligen Schwanzende mit einer Schere abgetrennt und in 500 µl Lysis Puffer überführt. Die Lyse erfolgte über Nacht bei 56°C im Schüttler. Um Zelltrümmer sowie Fell- und Knochenanteile aus dem Lysat zu entfernen wurde eine Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm durchgeführt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol gemischt. Durch mehrmaliges Invertieren des Gefäßes erfolgte die Fällung der genomischen DNA. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm, um die DNA zu pelletieren. Das erhaltene Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in 150 µl dest. Wasser resuspendiert. Die DNA wurde dann bei 65°C für 10 min im Schüttler gelöst.

Lysis Puffer

100 mM Tris/HCL pH 8.5

5 mM EDTA

0,2 % SDS (w/v)

200 mM NaCl

100 µg/ml Proteinase K (frisch zugeben)

Für die anschließende PCR wurde jeweils 1 µl der genomischen DNA eingesetzt. Weiterhin enthielt jeder PCR Ansatz (Gesamtvolumen 25 µl) Taq Polymerase, dNTPs, MgCl₂ (zusammen enthalten im MyTaqTM Mix von Bioline), Primer und dest. Wasser in folgenden Mengen:

- 12,5 µl 2x MyTaqTM Mix
- 1 µl *forward* Primer (10 pmol)
- 1 µl *reverse* Primer (10 pmol)
- 9,5 µl dest. Wasser

Zur Bestimmung des Genotyps wurden zwei verschiedene Primerpaare verwendet (Typisierungsprimer 1 und 2). Die PCR wurde mit einem drei-minütigem Denaturierungsschritt bei 95°C gestartet. Darauf folgten dann 30 Zyklen mit folgenden Temperaturen und Zeiten:

Typisierungsprimer 1

Denaturierung: 30 s 95°C

Annealing: 30 s 57°C

Elongation: 1 min 72°C

Typisierungsprimer 2

Denaturierung: 30 s 95°C

Annealing: 30 s 60°C

Elongation: 2 min 72°C

Die abschließende Primerextension erfolgte jeweils 3 min bei 72°C. Danach wurden die Ansätze auf 4°C abgekühlt. Um im Anschluss die PCR-Amplifikationsprodukte zu identifizieren wurde eine Agarosegelelektrophorese (vgl. 3.9.6) durchgeführt.

3.8.4 Blutentnahme

Für die Extraktion von RNA aus lebenden Mäusen wurde ca. 100 µl bis 200 µl Blut durch Punktion der Schwanzvene entnommen. Zur Erweiterung der Gefäße und zur Erleichterung der Blutabnahme wurde der Schwanz vorher ca. 10 min erwärmt. Diese Art der Blutentnahme wurde bei Mäusen verwendet, welche noch zur Verpaarung benötigt wurden.

3.8.5 Gewinnung von Mausurin

Die Urinproben wurden an verschiedenen Tageszeitpunkten manuell durch Stimulation von den Mäusen entnommen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Diese Art der Gewinnung von Urin war technisch nur bei bereits ausgewachsenen Mäusen möglich. Für die anschließende Reinigung der im Urin enthaltenen Sialinsäuren mittels Anionenaustauschchromatografie (vgl. 3.11.1) waren mindestens 20 µl Urin pro Maus notwendig. Die Urinproben wurden zentrifugiert, um eventuelle Verunreinigungen abzutrennen (13.000 rpm, 5min, 4°C) und bis zur weiteren Analyse bei - 20°C gelagert.

3.8.6 Mauspräparation

Bis zu 14 Tage postnatal (d14 p.n.) wurden Mäuse durch Dekapitation getötet. Danach erfolgte die Tötung der Mäuse durch zerebrale Dislokation. Unmittelbar nach Tötung der Maus wurde das Herz punktiert, um möglichst viel Blut zu gewinnen. Das Blut wurde zügig in ein EDTA-Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Zur Gewinnung von RNA wurde unmittelbar im Anschluss ein Stück (max. 30 mg) der Leber entnommen in ein RNase freies Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur RNA-Extraktion bei - 80°C gelagert. Danach wurde der Schädelknochen geöffnet und das gesamte Gehirn entnommen. Das Gehirn wurde ebenfalls sofort tiefgefroren und bis zur weiteren Analyse bei - 80°C gelagert.

3.8.7 Aufarbeitung von Gewebe und Blut für die Sialinsäureanalytik

Gehirnaufarbeitung

Die Gehirne wurden gewogen und in 4 ml Homogenisationspuffer mit dem gentle MACS Dissociator von Miltenyi Biotech homogenisiert. Um unlösliche Gewebestandteile abzutrennen wurden die Lysate für 10 min bei 2000 x g und 4°C zentrifugiert. Um eine grobe Membranfraktion zu erhalten wurden die Überstände nochmals 45 min bei 30.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der zytosolische Überstand wurde für die Sialinsäurekonzentrationsbestimmung

mittels des Periodat/Resorcinol Assays (vgl. 3.11.4) verwendet. Die erhaltenen Membranpellets wurden in 500 µl Solubilisationspuffer resuspendiert und über Nacht bei 4°C rotiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 4°C um unlösliche Membranbestandteile aus dem Solubilisat zu entfernen. Das Solubilisat enthält Gehirnmembranproteine und wurde für den Nachweis von Polysialinsäure verwendet. Ein 50 µl Aliquot jedes Solubilisates wurde mit 25 ng/µl Endosialidase für 45 min auf Eis inkubiert, um die Polysialinsäure vom NCAM zu entfernen. Ein weiteres Aliquot jedes Solubilisates wurde einer Proteinkonzentrationsbestimmung (vgl. 3.10.1) unterzogen. Die Solubilisate, einschließlich die mit Endosialidase behandelten, wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert und bis zur SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (vgl. 3.10.2) tiefgefroren bei - 20°C.

<u>Homogenisationspuffer</u>	<u>Solubilisationspuffer</u>	<u>5-fach SDS-Probenpuffer</u>
1mM NaHCO ₃	20 µM Tris/HCL	12,5% SDS (w/v)
200 µM CaCl ₂	1mM EDTA	0,3 M Tris-HCl, pH 6,8
200 µM MgCl ₂	1mM EGTA	50% Glycerin (v/v)
1:500 PIC	150 mM NaCl	0,015% Bromphenolblau (w/v)
pH 7.9	5 g DOC	
	pH 8.2	

Blutplasmagewinnung

Zur Gewinnung von Blutplasma wurde das aus der Maus entnommene Blut unmittelbar in ein mit EDTA versetztes Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Dabei werden die Blutzellen pelletiert und so vom Blutplasma getrennt. Das Plasma wurde abpipettiert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Analyse erfolgte die Lagerung der Plasmaproben bei - 80°C.

Isolation von Leukozyten

Zur Isolierung von Leukozyten wurden 200 µl des mit EDTA versetzten Blutes mit 1 ml Erythrozyten Lysepuffer gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch bei 2.000 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet, welches die Leukozyten enthält wurde nochmals mit 500 µl Erythrozyten Lysepuffer resuspendiert. Nach einer fünf-minütigen Inkubation bei RT wurde das Gemisch nochmals zentrifugiert. Das Pellet sollte nun komplett weiß und frei von Erythrozyten sein. War das nicht der Fall erfolgte eine weitere Inkubation mit Erythrozyten Lysepuffer. Das Leukozytenpellet wurde für die anschließende Behandlung mit FITC markiertem LFA Lektin (vgl. 3.11.5) in 100 µl FACS Puffer resuspendiert.

Erythrozyten Lysepuffer

155 mM NH₄Cl

10 mM KHCO₃

100 µM EDTA

pH 7.3

3.8.8 Fütterung von FVB/N Mäusen mit *N*-Acetylmannosamin

Die Applikation des Sialinsäurevorläufers ManNAc (NZP, Auckland) erfolgte mit dem Trinkwasser. Bei allen Versuchsansätzen betrug die Konzentration von ManNAc im Trinkwasser 30 mM. Es wurden zwei verschiedene Versuchsansätze verfolgt. Zum einen erfolgte die ManNAc-Applikation bei FVB/N Weibchen, welche gerade Junge bekommen hatten und diese säugten. An Tag 7 p.n. und Tag 14 p.n. wurden jeweils zwei Junge mittels Dekapitation getötet und wie unter 3.8.6 beschrieben präpariert. Als Kontrolle wurden FVB/N-Junge verwendet, deren Mutter mit unbehandeltem Trinkwasser versorgt wurde. Zum anderen erfolgte die ManNAc-Applikation mittels Trinkwasser bei adulten FVB/N Weibchen über einen Zeitraum von 14 Tagen. Als Kontrollen dienten auch hier FVB/N Weibchen welche über den Zeitraum von 14 Tagen mit unbehandeltem Trinkwasser versorgt wurden. Von jeweils drei Mäusen wurde nach Beendigung der 14-tägigen Behandlungsdauer Urin gesammelt (vgl. 3.8.5). Im Anschluss erfolgte die Tötung der Mäuse mittels zerebraler Dislokation und deren Präparation wie unter 3.8.6 beschrieben.

3.9 Molekularbiologische Methoden

3.9.1 Extraktion von RNA aus Gewebe und Blut

Für die Extraktion von RNA aus Lebergewebe wurde das µMACS mRNA isolation kit von Miltenyi Biotech verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die Extraktion von RNA aus Blut, welches zuvor frisch aus der Schwanzvene entnommen wurde, erfolgte mit Hilfe des Gene JET Stabilized and fresh whole blood RNA Kit nach den Angaben des Herstellers. Der Vorteil dieser Vorgehensweise war, dass die Mäuse für die RNA Extraktion nicht getötet werden mussten und somit noch für Verpaarungen zur Verfügung standen. Die erhaltene RNA wurde bei - 80°C aufbewahrt.

3.9.2 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration der extrahierten RNA wurde mit Hilfe des NanoDrop (PeqLab) bestimmt. Die Messung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Es wurde 1 µl der unverdünnten, extrahierten RNA eingesetzt

3.9.3 DNase Verdau

Um mögliche Verunreinigungen mit genomischer DNA aus den RNA Proben zu entfernen, wurde ein Verdau mit DNaseI durchgeführt. Im Fall der aus Blut extrahierten RNA war ein DNaseI Verdau bereits Bestandteil des verwendeten Kit. Dieser wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Im Fall der aus Lebergewebe extrahierten RNA wurde ein separater Verdau mit DNaseI wie folgt durchgeführt. 40 µl RNA-Extrakt wurden mit 5 µl 10-fach DNase Inkubations Puffer, 1 µl RiboLock RNase Inhibitor und 1 µl DNaseI (10 Units/µl) gemischt. Der Ansatz wurde mit Nuklease freiem Wasser bis auf 50 µl aufgefüllt und 15 min bei 37°C erhitzt. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8.0) gestoppt und durch 10-minütiges Erhitzen auf 75°C wurde die DNaseI inaktiviert.

3.9.4 Reverse Transkription (cDNA Synthese)

Mittels der Reversen Transkriptase Superscript II wurden 300 ng der extrahierten RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Zuerst wurde die RNA mit 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer und 1 µl dNTP Mix vermischt. Der Ansatz wurde mit Nuklease freiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt und 5 min auf 65 °C erhitzt, um die Anlagerung der Primer zu gewährleisten. Danach wurde der Reaktionsansatz auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden folgende Komponenten dem Ansatz zugesetzt:

- 4 µl 5x first strand buffer
- 2 µl 0.1 M DTT
- 1 µl RiboLock RNase Inhibitor

Der Ansatz wurde nun 2 min auf 42°C erhitzt. Nach Zugabe von 1 µl der Superscript II wurde der Ansatz 50 min bei 42°C inkubiert. Zuletzt erfolgte die Inaktivierung des Enzyms für 15 min bei 70°C. Die erhaltene cDNA wurde bei - 20°C gelagert.

3.9.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient dazu spezifische DNA-Fragmente mittels thermostabiler DNA-Polymerasen zu amplifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit diente die PCR dazu den Genotyp der Mäuse zu bestimmen (vgl.3.8.3) und zum anderen wurde die PCR genutzt, um die Expression des Transgens zu untersuchen. Für alle PCR-Anwendungen wurde der MyTaqTM Mix von Bioline verwendet. PCR-Ansätze (Gesamtvolumen: 25 µl) wurden auf Eis pipettiert und setzten sich wie folgt zusammen:

- 12,5 µl 2x MyTaq™ Mix
- 1 µl *forward*Primer (10 pmol)
- 1 µl *reverse* Primer (10 pmol)
- 1 µl DNA Template (genomische DNA/cDNA)
- 9,5 µl dest. Wasser

Das PCR-Programm für die Genotypisierung ist unter Punkt 3.8.3 bereits beschrieben. Das PCR-Programm für die Expressionsanalyse begann mit einer zwei-minütigen Denaturierung bei 95°C. Darauf folgten dann 35 Zyklen mit folgenden Temperaturen und Zeiten:

Denaturierung: 30 s 95°C

Annealing: 30 s 60°C

Elongation: 1 min 72°C

Die abschließende Primerextension erfolgte 3 min bei 72 °C. Danach wurden die Ansätze auf 4°C abgekühlt. Dieses Programm konnte für alle in der Expressionsanalyse verwendeten Primerpaare genutzt werden. Das Resultat der PCR wurde durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft.

3.9.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient dazu DANN-Fragmente entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld aufzutrennen, wobei kleinere Fragmente sich schneller durch die Poren des Gels bewegen als Große Fragmente. Die entsprechende Menge Agarose für 1%ige Gele wurde abgewogen und durch Aufkochen in TAE Puffer gelöst. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 50 ml Gel-Lösung. Dieser Farbstoff interkaliert in die DNA wodurch diese im UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Zur Polymerisierung wurde die Gel-Lösung in einen horizontalen Gelträger gegossen. Die zu untersuchenden PCR-Proben wurden mit 2 µl 10-fach DNA Probenpuffer versetzt und 10 µl davon wurde in die Gel-Taschen pipettiert. Als Größenstandard wurde der Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder verwendet. Als Laufpuffer diente TAE Puffer. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte 45-60 min bei 110-130 V. Zur Auswertung wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht und dokumentiert.

TAE Puffer

40 mM Tris/HCl, pH 8.5

0,1 % Essigsäure (v/v)

2 mM EDTA

10-fach DNA Probenpuffer

50 % Glycerin (v/v)

50 mM EDTA

0,05 % Bromphenolblau (w/v)

0,05 % Xylencyanol (w/v)

3.9.7 Quantitative *realtime* PCR (qRT-PCR)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die qRT-PCR verwendet, um die Integrationshäufigkeit des Transgens (GNE R263L) im Genom der Mäuse abschätzen zu können. Da es diese Methode ermöglicht die Anfangsmenge der Template DNA einer PCR-Reaktion zu quantifizieren. Für die Durchführung der qRT-PCR wurde das qPCR green Master Kit von Jena Bioscience verwendet. Als Template diente die aus den Schwanzbiopsien gewonnene genomische DNA. Bei der Wahl der Primer wurde darauf geachtet, dass diese exakt im Bereich eines Exons an die genomische DNA der GNE binden. Dieses Vorgehen gewährleistet die Verwendung von Wildtyp-DNA als Kalibrator, da hier, im Gegensatz zur integrierten GNE R263L, noch die Introns vorhanden sind. Die Wildtyp-DNA dient als Kalibrator, da hier exakt zwei Kopien der GNE vorliegen. Zur Amplifikation eines GNE-Exon-Fragments wurde das Primerpaar GNE-Exon-452-*forward/reverse* verwendet. Zur Amplifikation des internen Standards dienten GAPDH Primer. Für alle Proben und Primerpaare wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Ein PCR-Ansatz (Gesamtvolumen: 25 µl) setzte sich wie folgt zusammen:

- 12,5 µl 2x qPCR Green Master Mix
- 1 µl forward Primer (10 pmol)
- 1 µl reverse Primer (10 pmol)
- 1 µl DNA Template (1:10 Verdünnung)
- 9,5 µl PCR grade water

Die PCR wurde im icycler iQ5 multicolor realtime PCR detection system von BioRad durchgeführt. Das PCR-Programm startete mit einem drei-minütigem Denaturierungsschritt bei 95°C. Darauf folgten dann 45 Zyklen mit folgenden Temperaturen und Zeiten:

Denaturierung: 20 s 95°C

Annealing: 30 s 59°C

Elongation: 1 min 72°C

Die Auswertung erfolgte mittels der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode. Hierfür wurde mit Hilfe der iQ5 optical system software von BioRad der Ct-Wert (*threshold cycle*) für jeden PCR-Ansatz bestimmt. Der Ct-Wert bezeichnet den PCR Zyklus, bei dem sich das Fluoreszenzsignal, welches innerhalb der exponentiellen PCR-Phase proportional zur Produktmenge ansteigt, erstmals vom Hintergrundsignal signifikant abhebt. Je höher die Startkopienanzahl der zu amplifizierenden DNA ist, desto früher wird ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz verzeichnet. Für alle zu quantifizierenden Proben wurde der ΔCt -Wert berechnet, indem eine Normalisierung der ermittelten Ct-Werte mit Hilfe der endogenen GAPDH-Kontrolle durchgeführt wurde ($\Delta Ct = Ct_{\text{(Zielgen)}} - Ct_{\text{(GAPDH-Kontrolle)}}$). Im nächsten Schritt wurden nun die Ct-Werte der zu quantifizierenden Proben auf den ΔCt -Wert des Kalibrators (Wildtyp-DNA) normalisiert ($\Delta\Delta Ct = Ct_{\text{(Probe)}} - \Delta Ct_{\text{(Kalibrator)}}$). Setzt man nun die ermittelten $\Delta\Delta Ct$ in die Gleichung $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ein, erhält man Absolutwerte, welche die n-fache Expression der GNE-Zielsequenz in den Proben relativ zum Kalibrator ausdrücken. Vom Kalibrator (Wildtyp-DNA) ist bekannt, dass genau zwei Kopien der GNE vorliegen. Die n-fache Expression drückt hier also die n-fache Kopienanzahl des GNE R263L Transgens im Genom der untersuchten Mäuse aus.

3.10 Proteinbiochemische Methoden

3.10.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration der solubilisierten Membranfraktion aus Mausgehirn (vgl. 3.8.7) erfolgte mittels der Bicinchoninsäure (BCA) Methode. Hierfür wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei 96-well Platten von Corning verwendet wurden. Um die Proteinkonzentration möglichst genau zu bestimmen wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Solubilisate mussten 1:20 verdünnt werden. Zur Messung der Extinktion bei 520 nm wurde der microplate reader Multiskan Ex von (Thermo scientific) verwendet.

3.10.2 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die eindimensionale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese wurde durchgeführt, um die im Gehirnmembransolubilisat enthaltenen Proteine entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Die Trennung erfolgte in Polyacrylamidgelen (0,8 mm dick zwischen zwei Glasplatten) bestehend aus einem 8%igen Trenngel und einem darüber liegenden 4%igen Sammelgel, welches der Proteinkonzentration zu Beginn der Elektrophorese dient. Die Elektrophorese erfolgte unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen in einer Gelkammer von VWR, welche zu einem Viertel mit 1-fach Laufpuffer gefüllt wurde. Die Proben wurden mit reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C gekocht (vgl. 3.8.7). Die zu trennende Menge Gesamtprotein wurde anschließend in die Geltaschen pipettiert. Als Proteingrößenstandard

diente der Page Ruler™ prestained protein ladder von Thermo scientific, hiervon wurden 5 µl in eine der äußeren Geltaschen pipettiert. Zur Konzentration der Proben im Sammelgel wurde eine Spannung von 40-50 V angelegt. Zur Trennung der Proteine im Trenngel wurde die Spannung auf 100-120 V erhöht. Anschließend wurden die getrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman Protran®) geblottet.

<u>Gelpuffer 1 (Trenngel)</u>	<u>Gelpuffer 2 (Sammelgel)</u>	<u>10-fach Laufpuffer</u>
1,5 M Tris/HCL pH 8,8	0,5 M Tris/HCL pH 6,8	0,25 M Tris pH 8,8
0,2 % SDS (w/v)	0,2 % SDS (w/v)	1,92 M Glycin
		1 % SDS (w/v)

<u>Trenngel (8%ig)</u>	<u>Sammelgel (4%ig)</u>
4 ml Rotiphorese® Gel 30	0,4 ml Rotiphorese® Gel 30
3,8 ml Gelpuffer 1	0,75 ml Gelpuffer 2
7,2 ml dest Wasser	1,85 ml dest. Wasser
120 µl 10% APS	12 µl 10% APS
12 µl TEMED	3 µl TEMED

3.10.3 Western Blot

Für den elektrophoretischen Transfer von Proteinen aus einem Acrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran wurde das Tank-Blot-Verfahren angewendet. Der Blot erfolgte in Kunststoffkammern von VWR. Zunächst wurden die Nitrocellulosemembran und das Whatmanpaper auf Größe des Acrylamidgels zugeschnitten (7cmx9cm). Unter ständiger Benetzung mit Transferpuffer wurde der Blotstapel zusammengebaut, in einer Blottingkassette fixiert und in eine mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer gehangen.

Während des Blotvorgangs wurde die Apparatur mit vorgekühlten Akkus gekühlt, um Überhitzung zu vermeiden. Der Blotvorgang erfolgte bei 300 mA für 1,5 Stunden unter ständigem Rühren. Um den Erfolg des Proteintransfers auf die Membran zu überprüfen wurden die Proteinbanden mit Ponceau-Lösung reversibel angefärbt. Die Entfärbung erfolgte unter Schütteln mit dest. Wasser.

Transferpuffer

150 mM Glycin
20 mM Tris/HCl pH 8,3
10% Ethanol 96%(v/v)

Ponceau-Lösung

2% Ponceau-Rot (w/v)
30% TCA (w/v)
30% Sulfosalicylsäure (w/v)
vor Gebrauch 1:10 mit dest.Wasser verdünnen

3.10.4 Immunfärbung von Western Blots

Die auf die Nitrocellulosemembran übertragenen Proteine bzw. auch Glykoproteine können anschließend mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran bei Raumtemperatur 30 min in 5% Magerrmilch/0,2% Tween-20/TBS-Lösung geschwenkt. Der erste Antikörper, welcher spezifisch an das nachzuweisende Protein bzw. an den Zucker bindet, wurde mit TBS Puffer verdünnt und über Nacht bei 4°C und Schwenken auf der Membran belassen. Danach wurde die Membran dreimal mit TBS-T Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit einer 1:10.000 Verdünnung des entsprechenden sekundären Antikörpers in TBS Puffer. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T Puffer und einmaligem Waschen mit TBS Puffer konnte die Membran, aufgrund der Kopplung des sekundär Antikörpers mit HRP (*horseradish peroxidase*), mit dem enhanced chemiluminescens luminol system entwickelt werden wodurch das gewünschte Protein bzw. der Zucker sichtbar gemacht wurde.

10-fach TBS Puffer

0,5 M Tris/HCL pH 7,5
1,5 mM NaCl

TBS-T Puffer

1-fach TBS Puffer
0,1% Tween-20 (v/v)

3.11 Sialinsäureanalytische Methoden

3.11.1 Sialinsäureisolierung aus Mausurin mittels Anionenaustauschchromatographie

Für die Isolierung von Sialinsäuren aus einem komplexen Stoffgemisch eignet sich besonders die Anionenaustauschchromatographie, da Sialinsäuren aufgrund der Carboxylgruppe am C2-Atom negativ geladen sind. In dieser Arbeit wurden gebrauchsfertige Anionenaustauschersäulen (AG1-X8Resin, 200-400 mesh, formiat form) von Bio Rad verwendet. Zuerst wurde die Säule nach den Angaben des Herstellers vorbereitet. Anschließend wurden 20 µl Urin zusammen mit 5 ml dest. Wasser auf die Säule pipettiert. Dabei binden die im Urin befindlichen Sialinsäuren an das Säulenmaterial und verdrängen das Formiat-Ion. Der erhaltene Durchlauf wurde

verworfen. Zur Elution der Sialinsäuren von der Säule wurde 5 ml 1 M Ameisensäure auf die Säule gegeben. Die Elutionsfraktion (Volumen 5 ml) wurde in einem 15 ml Flacon gesammelt und über Nacht lyophilisiert. Die so getrockneten Proben wurden in 1 ml dest. Wasser gelöst, in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und nochmals über Nacht getrocknet. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmarkierung der in der Probe enthaltenen Sialinsäuren mittels 1,2-Diamino 4,5-Methylenedioxybenzol (DMB).

3.11.2 Fluoreszenzmarkierung von Sialinsäuren

Mit Hilfe von 1,2-Diamino 4,5-Methylenedioxybenzol (DMB) können Sialinsäuren und andere α -Ketosäuren zu fluoreszierenden Derivaten modifiziert werden (vgl. Abbildung 10), welche dann mittels HPLC getrennt und detektiert werden können.

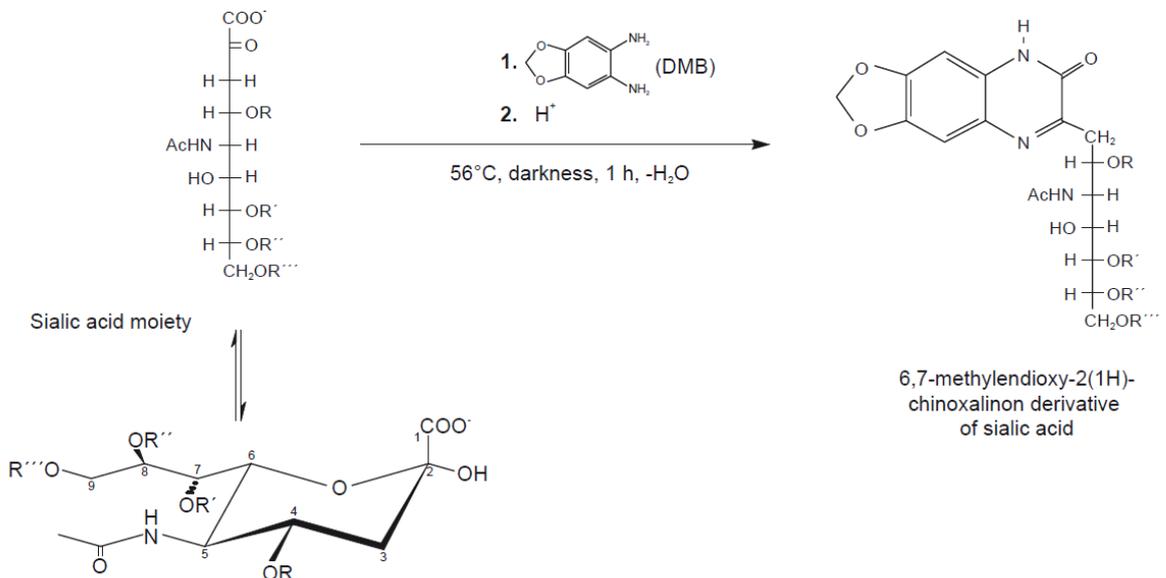


Abbildung 10: Fluoreszenzmarkierung von α -Ketosäuren mit DMB.

Die Sialinsäure-haltigen, lyophilisierten Proben (vgl. 3.11.1) wurden mit 10 μ l 2 M Essigsäure und 50 μ l DMB-Reagenz gemischt. Die Derivatisierung erfolgte lichtgeschützt für eine Stunde bei 56°C. Die derivatisierten Proben wurden anschließend sofort mittels HPLC analysiert. Die Proben können aber auch lichtgeschützt bei -20 °C aufbewahrt werden

DMB-Reagenz

15,62 mg 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzol-dihydrochlorid (6,9 mM)

523 μ l β -Mercaptoethanol (0,67 mM)

48 μ l 39% Natriumhydrogensulfit-Lösung

ad 10 ml mit dest. Wasser, aliquotieren und bei -20°C lagern

3.11.3 Nachweis und Quantifizierung von Sialinsäuren mittels *high performance liquid chromatography* (HPLC)

Die HPLC ist eine Trennmethode bei der ein zu analysierendes komplexes Stoffgemisch zusammen mit einem Lösungsmittel als mobile Phase mit hohem Druck durch eine Säule gepumpt wird, welche Füllmaterial als stationäre Phase enthält. Die im Gemisch enthaltenen Substanzen agieren unterschiedlich stark mit der stationären Phase und verbleiben daher unterschiedlich lang auf der Säule, wodurch man die Substanzen anhand ihrer Retentionszeiten unterscheiden kann. Zum Nachweis von Sialinsäuren wurde die *reversed phase* HPLC (RP-HPLC) verwendet. Die RP-HPLC beruht auf einem Umkehrphasensystem, bei dem die stationäre Phase unpolar und die mobile Phase polar ist.

In dieser Arbeit wurde das Ultimate 3000 Analytical HPLC System von Thermo Scientific verwendet. Die mit DMB derivatisierten Proben wurden zentrifugiert, um einen partikelfreien Überstand zu erhalten. Die Überstände wurden 1:20 verdünnt, wovon jeweils 10 µl für die HPLC-Analyse auf eine Gemini-NX 3µ C18 Säule (Partikelgröße 3 µm, Porengröße 110 Å, 4,6 mm Innendurchmesser x 150 mm Länge, Phenomenex) aufgetragen wurde. Die Trennung erfolgte isokratisch mit einem Lösungsmittelgemisch aus Methanol, Acetonitril und Wasser im Verhältnis 6:8:86 (v/v/v) bei einer konstanten Flussrate von 0,8 ml/min. Die Analysezeit betrug 25 min. Die fluoreszierenden Derivate wurden mittels eines Fluoreszenz Detektors bei einer Anregungswellenlänge von 373 nm und einer Emissionswellenlänge von 448 nm nachgewiesen. Mit Hilfe der Steuer- und Auswertesoftware Chromeleon 6.8 (Thermo Scientific) kann das Trennergebnis als Chromatogramm dargestellt werden, wobei man für jede von der Säule eluierte Substanz einen Peak mit bestimmter Fläche und Fluoreszenzintensität bei einer charakteristischen Retentionszeit erhält. Für die analysierten Urinproben wurden mehrere Peaks bei unterschiedlichen Retentionszeiten erhalten. Um den Peak für Neu5Ac zu identifizieren diente die HPLC-Messung eines Neu5Ac-Standards. Um die Neu5Ac-Konzentration in den Urinproben bestimmen zu können, wurde eine Neu5Ac-Standardreihe (0,01-10 ng/10µl) mittels HPLC analysiert. Zur Berechnung wurden die Flächen der erhaltenen Peaks herangezogen.

3.11.4 Nachweis und Quantifizierung von Sialinsäuren mittels Periodat-Resorcinol Assay

Zur Bestimmung der Sialinsäure Konzentration im Gehirnzcytoplasma und im Blutplasma von Mäusen wurde der Periodat-Resorcinol Assay von Jourdian *et al.* 1971 verwendet. Es handelt sich bei dieser Methode um einen colorimetrischen Assay, wobei in der Probe enthaltene Sialinsäuren zunächst mit Periodsäure oxidiert werden und anschließend durch Inkubation mit dem Resorcinol-Reagenz ein blaues Chromogen bilden.

Für den Assay wurden Gehirn und Blut wie unter 3.8.7 beschrieben aufgearbeitet. Das Gehirnzcytoplasma konnte unverdünnt verwendet werden. Das Blutplasma dagegen musste für

den Assay 1:10 verdünnt werden. Für den Oxidationsschritt wurde 250 µl Probe mit 5 µl 0,4 M Periodsäure versetzt und gründlich gemischt. Um die Gesamtsialinsäurekonzentration der Probe zu bestimmen wurde das Gemisch mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Bei dieser Temperatur bleiben sowohl freie Sialinsäuren als auch glykosidisch gebundene Sialinsäuren im Gemisch erhalten. Anschließend wurden die Proben mit 500 µl Resorcinol-Reagenz versetzt, gründlich gemischt und exakt 15 min bei 100°C inkubiert. Nach einer kurzen Abkühlung bei RT wurden die Proben zur Stabilisierung des Chromogens mit 500 µl tert.-Butyl-Alkohol versetzt und wieder gründlich gemischt. Die Absorption der Proben wurde bei 630 nm gemessen. Um die Sialinsäurekonzentration berechnen zu können, wurde gleichzeitig eine Sialinsäure Standardreihe (0-250 µM) gemessen.

Resorcinol Reagenz

10 % 6%iges Resorcinol (v/v)

10 % 2,5 mM Kupfersulfat (v/v)

44 % konz. HCL (v/v)

36 % Wasser

3.11.5 Durchflusszytometrische Analyse Lektin-markierter Leukozyten

Die Durchflusszytometrie wurde verwendet, um die Oberflächensialylierung auf Leukozyten, welche aus dem Blut von Wildtyp- und Sialurie-Mäusen isoliert wurden, zu untersuchen. Zur Markierung der Sialinsäuren auf den Leukozyten wurde ein FITC-Lektin aus der Gartenschnecke *Limax flavus* verwendet (LFA), welches gebundene Neu5Ac Reste erkennt.

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren bei dem es möglich ist unterschiedliche Parameter einzelner Zellen in Suspension zu untersuchen. Dazu gehören Größe, Granularität und verschiedene Fluoreszenzen. In einer Messkammer werden die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt und an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Das in dieser Arbeit verwendete Gerät BD AccuriTM C6 der Firma BD Biosciences besitzt einen blauen Laser mit der Anregungswellenlänge 488 nm und einen roten Laser mit der Anregungswellenlänge 640 nm. Die analysierten Zellen verursachen aufgrund ihrer Morphologie eine charakteristische Streuung des Laserlichts, wobei das Vorwärtsstreulicht (FFC) ein Maß für die Zellgröße ist und das Seitwärtsstreulicht (SSC) Rückschlüsse auf die Granularität der Zelle zulässt. Dadurch kann man im Dot-Blot (FFC vs. SSC) Leukozytenpopulationen eindeutig identifizieren (vgl. Abbildung 11 A). Durch die Behandlung der Zellen mit FITC-markiertem Lektin sollten die Zellen grünes Fluoreszenzlicht emittieren, welches im FL-1 Kanal (Wellenlängenbereich: 514-530 nm) des Gerätes detektiert wird. Die Fluoreszenzintensität der analysierten Zellen kann

dann ebenfalls in einem Dot-Blot (FL-1 vs. FFC) dargestellt werden (vgl. Abbildung 11 B und C).

Für die Analyse wurden die isolierten Leukozyten mit FACS Puffer gewaschen und 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 100 µl FACS Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit 5 µg des FITC-markierten Lektins LFA für 45 min bei RT (Lichtgeschützt). Alle nun folgenden Arbeitsschritte wurden lichtgeschützt durchgeführt. Es folgten noch zwei Waschschrte mit FACS Puffer. Zur Analyse am Durchflusszytometer wurde das Pellet in 500 µl FACS Puffer gründlich resuspendiert. Um sicherzustellen, dass eine Einzelzellsuspension vorliegt wurde die Zellsuspension kurz vor der Analyse noch mal resuspendiert. Pro Probe wurden 10.000 Zellen im Durchflusszytometer erfasst und mittels der angeschlossenen Datenverarbeitungssoftware BD Accuri C6 anhand ihrer Morphologie als Leukozyten identifiziert und hinsichtlich ihrer Grünfluoreszenz analysiert. Als Kontrolle wurden nicht markierte Zellen mit analysiert, da jede Zelle eine gewisse Eigenfluoreszenz emittiert, welche als Hintergrundfluoreszenz festgelegt wird.

FACS Puffer

1x PBS
2% FCS (v/v)

PBS Puffer

137 mM NaCl
3 mM KCl
8,5 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄

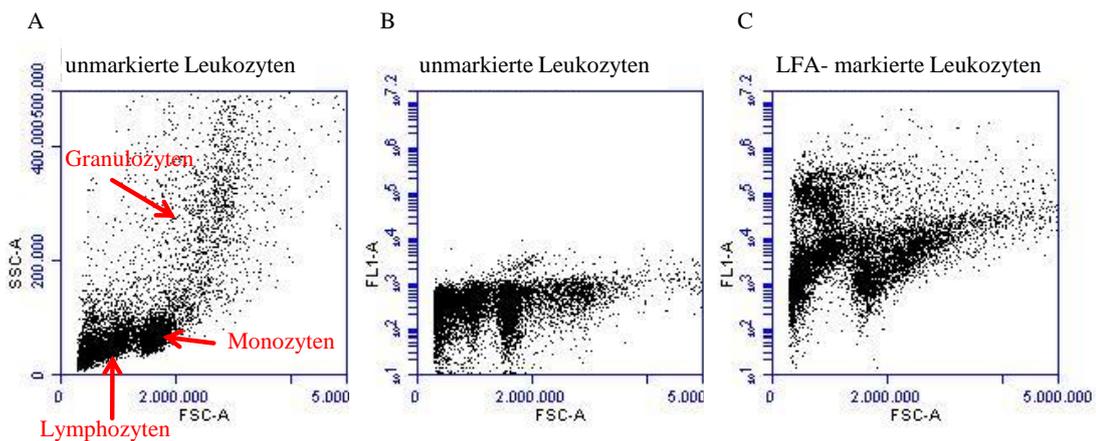


Abbildung 11: Beispielabbildungen der durchflusszytometrischen Leukozytenanalyse.

A) Leukozytenpopulationen im Dot-Blot (FFC vs. SSC) B) Grünfluoreszenzintensität der unmarkierten Leukozyten im Dot-Blot (FFC vs. FL-1) C) Grünfluoreszenzintensität der LFA-markierten Leukozyten im Dot-Blot (FFC vs. FL-1)

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der transgenen Mauslinie FVBN-GNE-R263L

4.1.1 Sialurie-Konstrukt

Zur Etablierung transgener Sialurie-Mäuse wurde im Rahmen dieser Arbeit das Konstrukt pcDNA3.1.-GNE-R263L genutzt, welches von der AG Horstkorte hergestellt wurde und bereits *in vitro* auf Funktionalität getestet wurde (Bork *et al.*, 2005, 2007b). Durch ortsgerichtete Mutagenese wurde der Aminosäureaustausch Arginin 263 Leucin (R263L) in die cDNA der GNE aus *Rattus norvegicus* eingeführt. Die Klonierung der mutierten GNE erfolgte im Anschluss mittels der Restriktionsenzyme XhoI/KpnI in die *multiple cloning site* (MCS) des eukaryotischen Expressionsvektors pcDNA3.1/Zeo. Die Expressionskontrolle erfolgt hier durch den CMV-Promotor. Um die Integrationswahrscheinlichkeit zu erhöhen, wurde ein Insert gewählt, welches nur den CMV-Promoter, die mutierte GNE und die Polyadenylierungsstelle enthält. Hierfür wurde mittels PCR ein 3683 bp großes Fragment amplifiziert (vgl. Abbildung 12), welches anschließend gereinigt und sequenziert wurde. Das Fragment enthielt neben der gewünschten Mutation R263L keine weiteren Mutationen und konnte so zur Etablierung der transgenen Maus verwendet werden.

4.1.2 Mikroinjektion

Um die mutierte GNE stabil ins Genom von Mäusen zu integrieren, wurde die Technik der Mikroinjektion genutzt (vgl. Abbildung 12). Diese Methode ist die Standardmethode des additiven Gentransfers bei Wirbeltieren und wurde in Kooperation mit der *Transgene Facility* der Charité in Berlin durchgeführt. Das 3683 bp große Insert (vgl. 4.1.1) wurde in den männlichen Vorkern von insgesamt 556 Zygoten injiziert. Davon reiften 455 Zygoten *in vitro* zu Embryonen heran. Die Embryonen wurden in den reproduktiven Trakt scheinträchtiger Ammentiere implantiert. Es wurden 76 Founder-Tiere geboren (F0-Generation), von denen sechs Founder-Tiere (fünf weibliche und ein männliches) das Transgen im Genom integriert hatten.

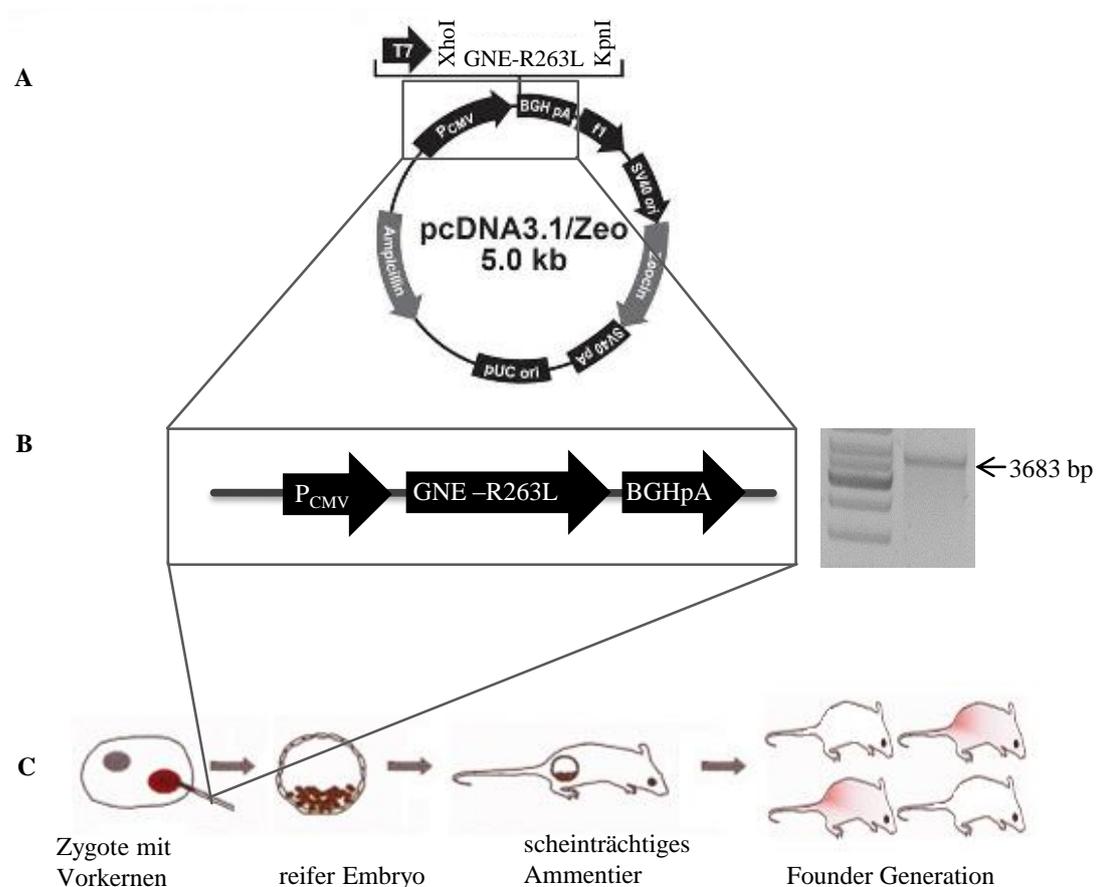


Abbildung 12: Herstellung einer transgenen Maus. A) die cDNA der GNE-R263L wurde mittels der Enzyme XhoI und KpnI in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo kloniert und steht unter der Transkriptionskontrolle des CMV-Promoters. B) Das Transgen ist 3683 bp groß und umfasst den CMV-Promoter (P_{CMV}), die mutierte GNE (GNE-R263L) und ein Polyadenylierungssignal (BGHpA), wobei sich zwischen diesen Sequenzen auch Vektorsequenzen unterschiedlicher Größe befinden. C) Hier sind schematisch die wesentlichen Schritte der Mikroinjektion dargestellt. Das Transgen wird in den männlichen Vorkern einer Zygote injiziert, welche dann *in vitro* zum Embryo heranreift. Der Embryo wird in den Uterus eines scheinträchtigen Ammentieres implantiert, welches die F0-Generatation (Founder) zur Welt bringt. Die Founder-Generation enthält transgene- (rote Schattierung) und nicht transgene Tiere.

4.1.3 Genotypisierung

Die Genotypisierung der Founder-Generation und auch der nachfolgenden Generationen erfolgte mittels der PCR-Technik. Die genomische DNA für dieses Verfahren wurde aus den Schwanzspitzen der zu testenden Mäuse gewonnen. Um sicherzustellen, dass nur Mäuse als transgen angesehen werden, die das gesamte Konstrukt im Genom integriert haben, wurden für die PCR zwei verschiedene Primerpaare verwendet (vgl. Abbildung 13 A). Primerpaar 1 erzeugt ein 1750 bp großes Fragment, welches den CMV-Promoter und den 5'-Bereich der GNE umfasst. Das zweite Primerpaar erzeugt ein 740 bp großes Fragment, welches den 3'-Bereich der GNE und das Polyadenylierungssignal umfasst. Da jeweils ein Primer in einer Vektorsequenz hybridisiert, kann davon ausgegangen werden, dass keine endogene GNE amplifiziert wird. Zum anderen enthält das Transgen keine Introns, wodurch ebenfalls die Unterscheidung zur endogenen GNE möglich ist. Die Founder-Generation umfasste 76 Tiere, welche fortlaufend nummeriert wurden. Mittels der PCR wurde festgestellt, dass die Tiere 35, 42, 53, 55, 69 und 72 das Transgen im Genom enthielten. Diese Mäuse zeigen im Agarosegel die zwei erwarteten Fragmente von 740 bp und 1750 bp (vgl. Abbildung 13B). Mit Ausnahme von Tier 53 waren alle transgenen Founder-Mäuse weiblich. Bei der Mikroinjektion kann das Transgen mehrmals und an verschiedenen Orten ins Genom des Empfängers integrieren. Um die Integrationshäufigkeit abschätzen zu können, wurde eine *realtime* PCR mit der genomischen DNA der Founder Tiere durchgeführt. Als Referenz diente das GAPDH-Gen und als Kalibrator diente die DNA einer Wildtyp-Maus, da diese nur zwei Kopien der GNE enthält. Aus Abbildung 13 C wird deutlich, dass bei Maus 53 das Transgen weitaus häufiger ins Genom integriert ist, als bei den anderen Founder-Tieren. Im Vergleich zum Wildtyp, welcher nur die endogene GNE besitzt, ist bei der transgenen Maus 53 ca. 27-fach mehr GNE Sequenz im Genom vorhanden, wohingegen Maus 69 nur die 3-fache Menge aufweist. Die anderen Founder 35, 42, 55 und 72 zeigen, im Vergleich zum Wildtyp, GNE Mengen von 7- bis 10-fach. Unter den Founder-Mäusen befindet sich demnach keine Maus, welche nur eine Kopie der mutierten GNE-R263L im Genom integriert hat (vgl. Tabelle 1). Die Anzahl der Transgenkopien wurde nach einer etablierten Methode von Ballester *et al.* berechnet (Ballester *et al.*, 2004)

Tabelle 1 Anzahl der Kopien des Transgens im Genom der Founder Mäuse

Founder Maus	35	42	53	55	69	72
Anzahl der Transgen Kopien	~14	~18	~53	~12	~4	~12

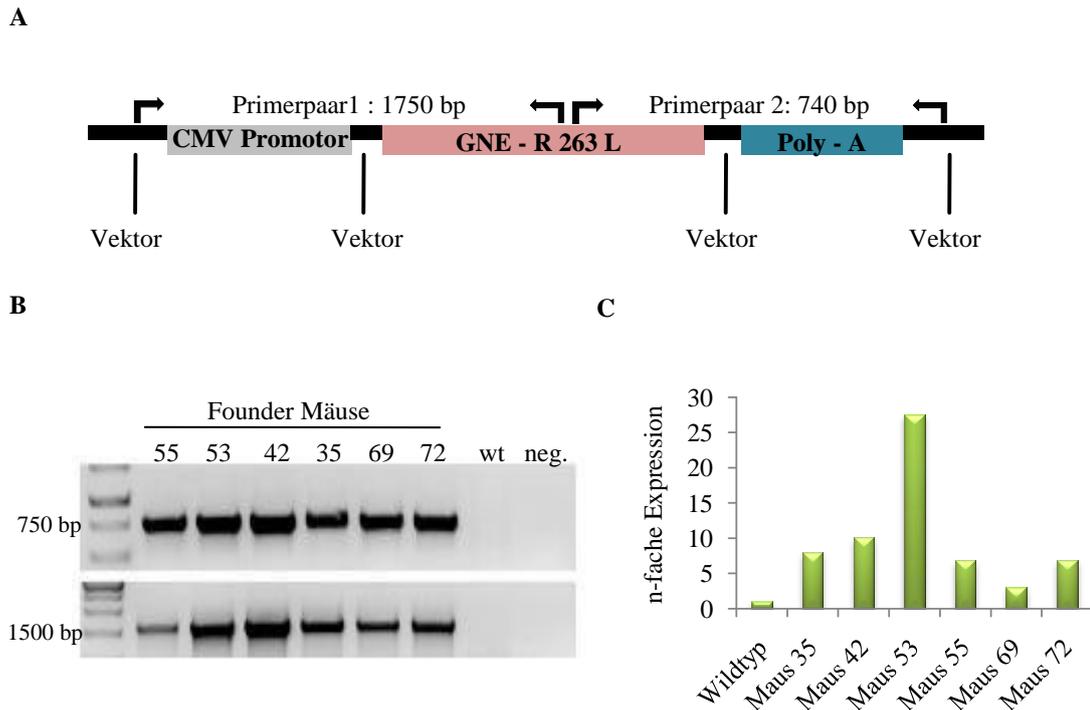


Abbildung 13: Genotypisierung mittels PCR. A) Um das gesamte Transgen im Genom der Tiere zu identifizieren, wurden zwei Primerpaare verwendet. Primerpaar 1 umfasst ein 1750 bp großes Fragment und deckt den 5'-Bereich des Transgens ab. Primerpaar 2 umfasst ein 740 bp großes Fragment und deckt den 3'-Bereich des Transgens ab. B) Innerhalb der F0-Generations konnten sechs transgene Founder-Tiere identifiziert werden. Das 1%ige Agarosegel zeigt die zwei spezifischen PCR-Fragmente für diese sechs Founder-Mäuse. Nicht-transgene Mäuse (Wildtyp, wt) zeigen die spezifischen PCR-Fragmente nicht. neg.: Negativ-Kontrolle (PCR Wasser-Kontrolle). C) Hier ist das Ergebnis einer *realtime* PCR dargestellt, um die Integrationshäufigkeit im Genom der Founder-Mäuse abschätzen zu können. Es wurden Primer verwendet, welche nur in einem Exon-Bereich der GNE-Sequenz hybridisieren, um die endogene GNE und die mutierte GNE zu amplifizieren. Zur Auswertung der PCR wurde die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode angewendet.

4.1.4 Expression des Transgens in der Founder-Generation

Um sicherzustellen, dass die transgenen Founder-Tiere auch die gewünschte mutierte GNE exprimieren, wurde von allen Foundern (ausgenommen Maus 53) RNA isoliert. Maus 53 ist frühzeitig verstorben, so dass hier für die RNA-Isolierung ein Nachkomme aus der F1-Generation herangezogen werden musste. Um Kontaminationen durch genomische DNA zu vermeiden, wurde direkt nach der RNA-Aufreinigung ein DNaseI-Verdau durchgeführt. Von der erhaltenen RNA wurden jeweils 300 ng mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Um zu verhindern, dass auch die endogene GNE amplifiziert wird, wurden die Primer für die anschließende PCR so gewählt, dass der *forward*-Primer in der GNE-Sequenz bindet und der *reverse*-Primer in der Vektorsequenz, vor dem Polyadenylierungssignal, hybridisiert. Dieser

Sequenzabschnitt ist in der RNA, welche die endogene GNE codiert nicht vorhanden (vgl. Abbildung 14 A). In Abbildung 14 B ist das Ergebnis der RT PCR Analyse für die Founder-Mäuse und dem Maus 53 Nachkommen (N53) dargestellt.

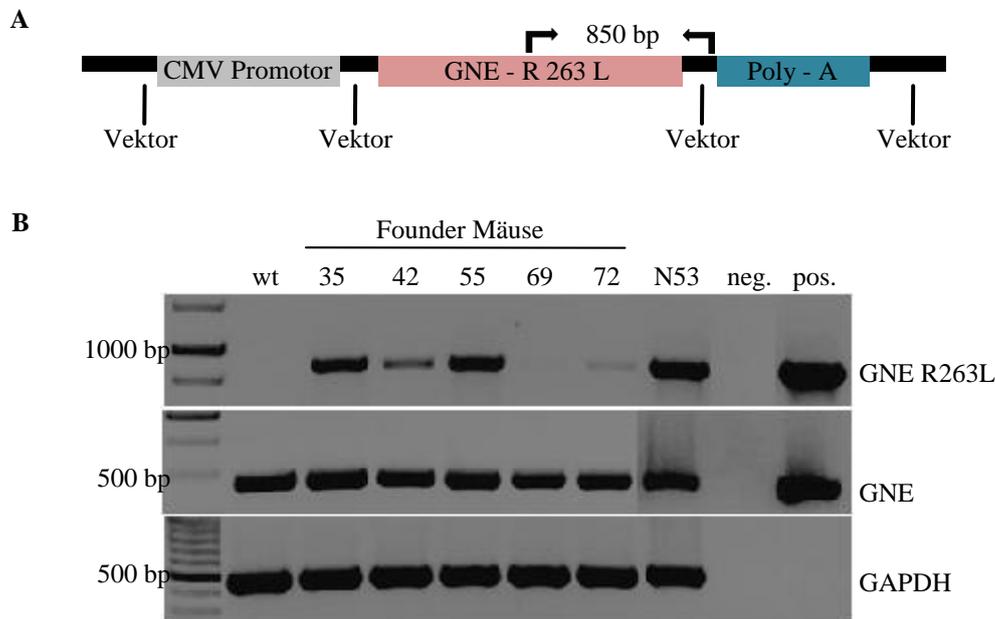


Abbildung 14: Expression des Transgens auf RNA Ebene. A) Damit nur die mutierte GNE amplifiziert wird, wurde ein *reverse*-Primer verwendet, der die Vektorsequenz vor dem Polyadenylierungssignal erkennt. Das amplifizierte Fragment hat eine Größe von 850 bp. C) Hier ist das Ergebnis der RT PCR für die transgenen Founder-Mäuse auf einem 1%igem Agarosegel gezeigt. N53 bezeichnet das Ergebnis für einen Nachkommen der Founder-Maus 53. Die Negativ-Kontrolle (neg.) stellt die Wasser-Kontrolle der PCR dar und als Positiv-Kontrolle (pos.) diente das Plasmid pcDNA3.1.-GNE-R263L. Als Kontrollen wurden GAPDH und die endogene Wildtyp-GNE amplifiziert.

Im Falle einer erfolgreichen Transkription der mutierten GNE im transgenen Organismus erhält man ein PCR Fragment von 850 bp. Als Kontrolle wurde zum einen eine GAPDH-PCR durchgeführt und zum anderen wurde eine weitere PCR durchgeführt, um zusätzlich zur mutierten GNE auch die endogene GNE zu amplifizieren. Hier wurden Primer verwendet, die in einem Exon Sequenzabschnitt des GNE-Gens hybridisieren, wodurch die endogene und die mutierte GNE amplifiziert werden. Aus Abbildung 14 B wird deutlich, dass der Wildtyp, die Founder-Tiere und der Maus 53 Nachkomme (N53) GNE exprimieren. Die GNE mit der R263L Mutation exprimieren jedoch nur Maus 35, 42, 55 und der Maus 53 Nachkomme (N53). Auch Maus 72 zeigt eine schwache Bande bei 850 bp, was auf eine sehr geringe Expression der mutierten GNE hinweist. Maus 69 zeigt keine Expression der mutierten GNE.

4.1.5 Quantifizierung der Neu5Ac-Menge im Urin der Founder Mäuse

Das primäre Merkmal der humanen Sialurie ist eine massiv erhöhte Ausscheidung von Neu5Ac im Urin. Daher wurde von allen Founder-Mäusen Urin gesammelt und die darin enthaltene Sialinsäure mittels Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt und mittels DMB derivatisiert. Die daraus resultierenden fluoreszierenden Sialinsäurederivate sind mittels HPLC aufgetrennt worden und durch Fluoreszenz detektiert worden. Die Chromatogramme der einzelnen HPLC-Messungen sind in Abbildung 16 dargestellt. Anhand eines Standards wurde der Peak für Neu5Ac bei einer Retentionszeit von 10 min identifiziert. Anhand der Höhe und Fläche des jeweiligen Neu5Ac-Peaks ist zu erkennen, dass die Founder Mäuse 35, 42, 72 und 53 eine größere Menge Neu5Ac ausscheiden als der Wildtyp. Wobei Maus 53 den mit Abstand größten Neu5Ac Peak aufweist. Hier war eine 1:500 Verdünnung der Probe notwendig, um einen quantifizierbaren Neu5Ac-Peak zu erhalten. Die Neu5Ac-Peaks der Founder-Mäuse 55 und 69 sind vergleichbar mit dem des Wildtyps.

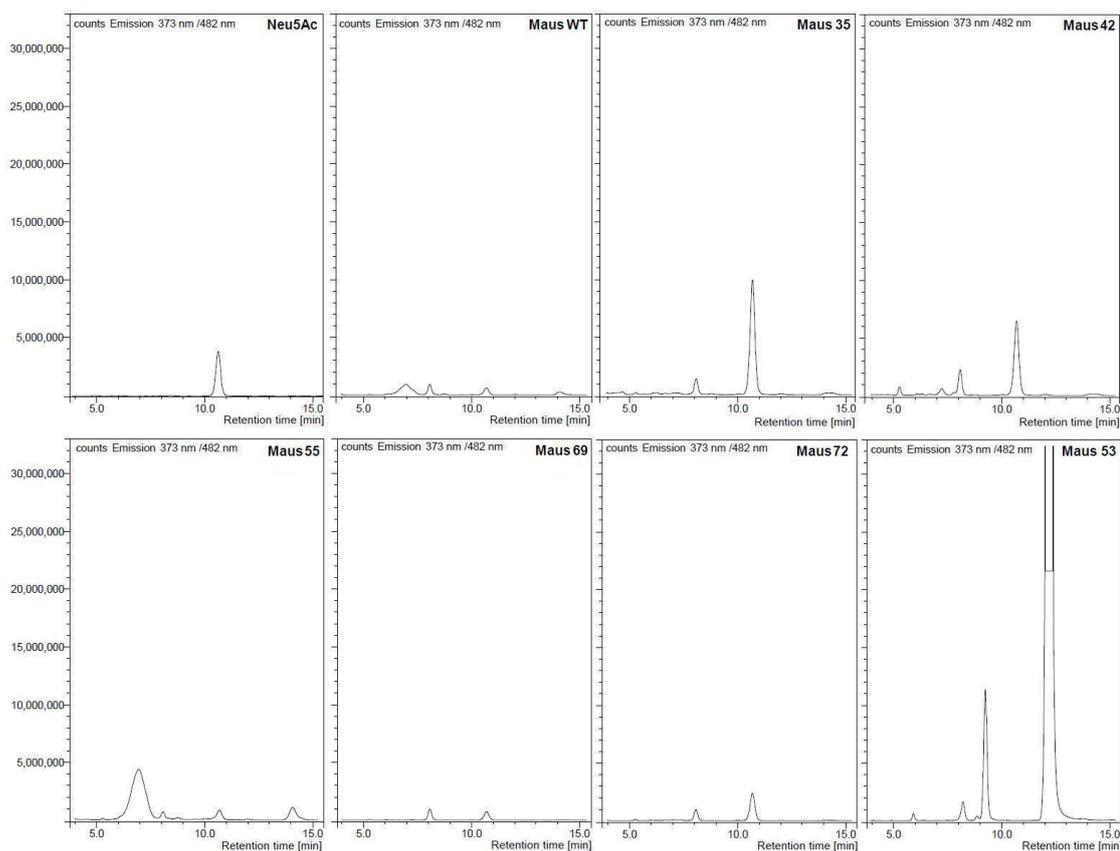


Abbildung 15: HPLC-Analyse der gereinigten Urinproben der transgenen Founder-Mäuse.

Dargestellt sind die Chromatogramme der Founder-Mäuse, des Wildtyps und eines Neu5Ac-Standards. Der Neu5Ac-Peak befindet sich bei einer Retentionszeit (x-Achse) von etwa 10 min. Die y-Achse zeigt die Fluoreszenzintensität. Aufgrund eines Säulenwechsels ist der Neu5Ac-Peak bei Maus 53 leicht nach rechts verschoben.

Um die ausgeschiedene Neu5Ac-Menge im Urin der Founder quantifizieren zu können, wurde mittels HPLC eine Neu5Ac-Standardreihe (0,01-10 ng) gemessen. Das Diagramm in Abbildung 16 zeigt das Ergebnis der Quantifizierung. Der Wildtyp scheidet eine Neu5Ac-Menge von 0,18 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ Urin aus. Die Quantifizierung ergab für Maus 35 eine 13-fache Erhöhung (2,59 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) und für Maus 42 eine 8,5-fache Erhöhung (1,68 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) der Neu5Ac-Ausscheidung. Für Maus 53 dagegen wurde eine 400-fache Erhöhung (89,06 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) der ausgeschiedenen Neu5Ac-Menge, verglichen mit dem Wildtyp, ermittelt. Bei Maus 35, 42 und 53 kann also davon ausgegangen werden, dass die ins Genom integrierte defekte GNE exprimiert wird (vgl. 4.1.3 und 4.1.4) und zudem funktionsfähig ist. Aufgrund der massiven Überproduktion von Neu5Ac durch die mutierte GNE wird die endogene GNE in ihrer Funktion gehemmt (*feedback*-Inhibierung). Die Neu5Ac-Ausscheidung der Founder-Mäuse 55 und 69 ist vergleichbar mit der des Wildtyps. Sie liegt für Maus 55 bei 0,25 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ und für Maus 69 bei 0,21 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$. Das Ergebnis war im Fall der Maus 69 zu erwarten, da keine Expression der mutierten GNE festzustellen war. Das Ergebnis für Maus 55 ist überraschend, da hier die Expression der mutierten GNE nicht zum gewünschten Sialurie-Effekt führt. Die Neu5Ac-Ausscheidung bei Maus 72 (0,62 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) ist dreifach höher als die des Wildtyps, liegt damit aber deutlich unter den Werten von Maus 35, 42 und 53. Dieser Effekt korreliert mit der geringen Expression der mutierten GNE bei Maus 72.

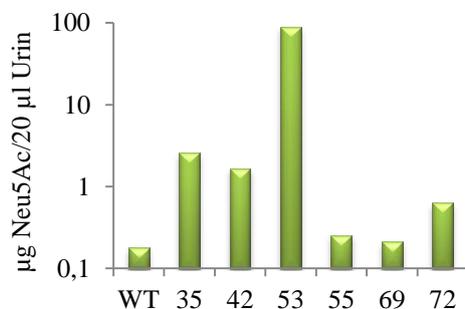


Abbildung 16: Neu5Ac Gehalt im Urin der transgenen Founder-Mäuse.

Das Diagramm zeigt die Quantifizierung der Neu5Ac Menge im Urin der Founder-Mäuse und des Wildtyps. Die berechnete Neu5Ac-Menge ist bezogen auf 20 μl Urin, welcher mittels Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt wurde.

4.1.6 Anzucht der transgenen Mauslinien

Das Verpaarungsschema zur Anzucht einer stabilen FVBN-GNE-R263L Mauslinie (Sialurie-Mauslinie) ist in Abbildung 17 dargestellt. Zur Sicherung der transgenen Stämme und um Tiere zur Verpaarung zu erzeugen, wurden die Founder-Tiere zunächst mit nicht-transgenen FVB/N Tieren (Wildtypen) verpaart. Founder-Mäuse bezeichnet man als hemizygot transgen, wenn die

Integration des Transgens im Einzellstadium erfolgt ist und so alle Zellen das Transgen an der gleichen Stelle in ihrem Genom enthalten. Ist das Transgen in den Keimzellen des Founder-Tieres vorhanden, treten in der F1-Generation, nach Verpaarung mit Wildtyp-Tieren, hemizygot transgene Nachkommen auf. Die Vererbung erfolgt in der Regel nach Mendel. Zur Etablierung einer transgenen Linie mit stabilem Genlokus und Transgenexpression, erfolgt im nächsten Schritt die Verpaarung von F1-Wurfgeschwistern. Der Anteil an transgenen Nachkommen in der F2-Generation sollte sich auf 75% erhöhen.

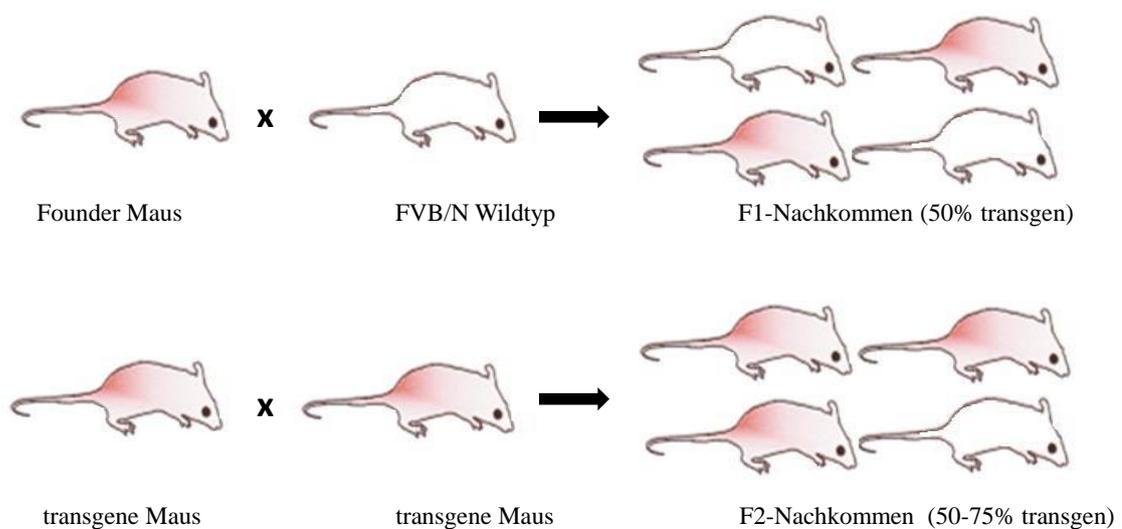


Abbildung 17: Verpaarungsschema zur Etablierung der FVBN-GNE-R263L Mauslinie. Die transgenen Founder-Mäuse wurden mit Wildtypen desselben genetischen Hintergrundes (FVB/N) verpaart. Nach den Mendelschen Regeln erhält man in der F1-Generation 50 % transgene Nachkommen. Im nächsten Schritt erfolgt die Verpaarung von transgenen Wurfgeschwistern der F1-Generation, wobei man in der F2-Generation nun 50% bis 75% transgene Nachkommen erwarten kann.

Bei allen sechs Founder-Verpaarungen konnten unter den Nachkommen (F1-Generation) transgen-positive Mäuse identifiziert werden. Auch bei den Nachkommen wurde zur Feststellung des Genotyps die PCR-Technik angewendet. Die Vererbung sollte in der Regel nach Mendel erfolgen, so dass 50 % der Nachkommenschaft das Transgen im Genom tragen. Jedoch konnten bei einigen Foundern enorme Abweichungen festgestellt werden (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2 Anteil transgener Mäuse in der F1-Generation (F1) aller Founder-Linien und der F1-bis F4-Generation der Founder-Linie 53

Transgen positive Mäuse/getestete Mäuse (%)						
Generation	Linie 35	Linie 42	Linie 53	Linie 55	Linie 69	Linie 72
F1	6/10 (60)	12/27 (45)	23/30 (76)	5/15 (33)	4/6 (66)	8/11 (72)
F2			28/41 (68)			
F3			17/23 (74)			
F4			9/11 (82)			

Für die Verpaarungen der Wurfgeschwister zur Etablierung der Sialurie-Mauslinie konnten die Tiere der Linie 69 und 72 ausgeschlossen werden, da hier festgestellt wurde, dass die mutierte GNE zwar im Genom integriert ist (vgl. 4.1.3), jedoch nicht exprimiert wird bzw. die Expression des Transgens zu gering ist (vgl. 4.1.4). Zudem unterscheidet sich die Neu5Ac-Ausscheidung der beiden Founder nicht wesentlich von der des Wildtyps (vgl.4.1.5). Die Nachkommen der Founder-Maus 55 wurden ebenfalls nicht weiter verpaart, da hier zwar die mutierte GNE exprimiert wird, jedoch wurde im Urin dieser Maus keine erhöhte Neu5Ac-Konzentration festgestellt, womit das primäre Sialurie-Merkmal nicht erfüllt ist. Zur Verpaarung eigneten sich nur die Tiere der Linie 35, 42 und 53, da hier die Expression der mutierten GNE und eine erhöhte Neu5Ac-Ausscheidung nachgewiesen werden konnte. Aufgrund von Infertilität der transgenen männlichen Zuchttiere konnten die Linie 35 und Linie 42 nicht etabliert werden. Die Nachkommen der Founder-Maus 53 konnten erfolgreich verpaart werden. Die Vererbung erfolgte hier nach Mendel ohne größere Abweichungen (vgl. Tabelle 1). Die daraus hervorgegangenen transgenen Nachkommen wurden für die weiteren Charakterisierungsexperimente im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

4.2 Charakterisierung der transgenen Sialurie Maus

4.2.1 Expressionsanalyse

Ebenso wie bei den Founder-Mäusen wurde bei den Nachkommen der Maus 53 die Expression des Transgens GNE-R263L auf RNA Ebene analysiert. Hierfür wurde zunächst RNA aus Blut gewonnen, welches den Mäusen zuvor aus der Schwanzvene entnommen wurde. Wie in Abschnitt 4.1.4 bereits beschrieben erfolgte im Anschluss die Synthese der cDNA und die Amplifikation eines 850 bp großen Abschnitts der mutierten GNE (GNE-R263L). Abbildung 18 zeigt die qualitative Bestimmung der Transgen-Expression der Nachkommen von Founder 53 aus der F2-Generation. Durch Verwendung eines *reverse*-Primers, der in einer Vektorsequenz hybridisiert, wird nur das Transkript der mutierten GNE amplifiziert, daher sieht man im Agarosegel bei Wildtypen (wt) und negativ-transgen getesteten Mäusen (Maus 89) kein PCR Fragment. 80 % der transgenen Nachkommen innerhalb der Linie 53 exprimieren die mutierte GNE. Zudem wurden Tiere identifiziert, welche transgen sind, das Transgen jedoch nicht exprimieren. Das ist bei Maus 91 und 92 der Fall, da hier nicht das 850 bp große Fragment der mutierten GNE amplifiziert werden konnte. Als Kontrollen wurden sowohl ein 500 bp großes GAPDH Fragment, als auch ein 450 bp großes Fragment der endogenen GNE amplifiziert.

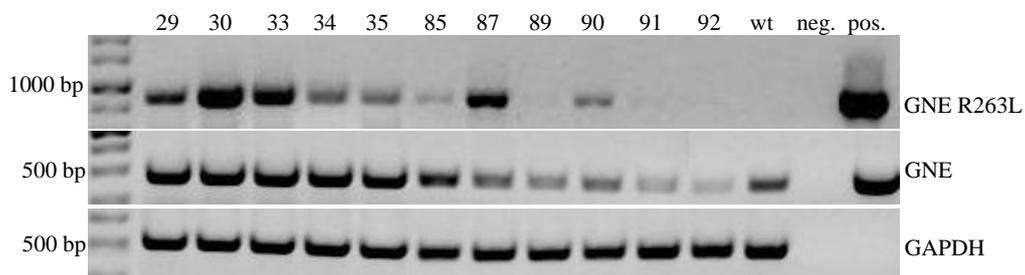


Abbildung 18: RT PCR Analyse der Sialurie-Mauslinie. Das 1%ige Agarosegel zeigt die Ergebnisse der Amplifikation des 850 bp großen Fragments der mutierten GNE (GNE-R263L), das 450 bp große Fragment der endogenen GNE und das 500 bp große Fragment der GAPDH-Kontrolle. Getestet wurden Nachkommen der Founder-Maus 53 aus der F2-Generation. Mit Ausnahme von Maus 89 wurden alle getesteten Tiere als transgen-positiv typisiert. Kontrollen: Wildtyp (wt), PCR Wasser Kontrolle (neg.), Plasmid pcDNA3.1.-GNE-R263L (pos.)

4.2.2 Urinanalyse

Wie bereits unter Punkt 4.1.5 beschrieben wurden auch Urinproben der transgenen Nachkommen von Maus 53 auf ihren Neu5Ac Gehalt untersucht. In Abbildung 19 sind repräsentative Chromatogramme dargestellt. Unter den Nachkommen sind Tiere, deren Neu5Ac-Ausscheidung, im Vergleich zum Wildtyp, deutlich erhöht ist, wobei die sich stark

unterscheidenden Neu5Ac-Peaks auf Schwankungen der Neu5Ac-Menge im Urin hindeuten (vgl. Maus 85 und Maus 90). Demgegenüber konnten auch Mäuse ermittelt werden, deren Neu5Ac-Ausscheidung vergleichbar mit der des Wildtyps ist (vgl. Maus 87 und Maus 91).

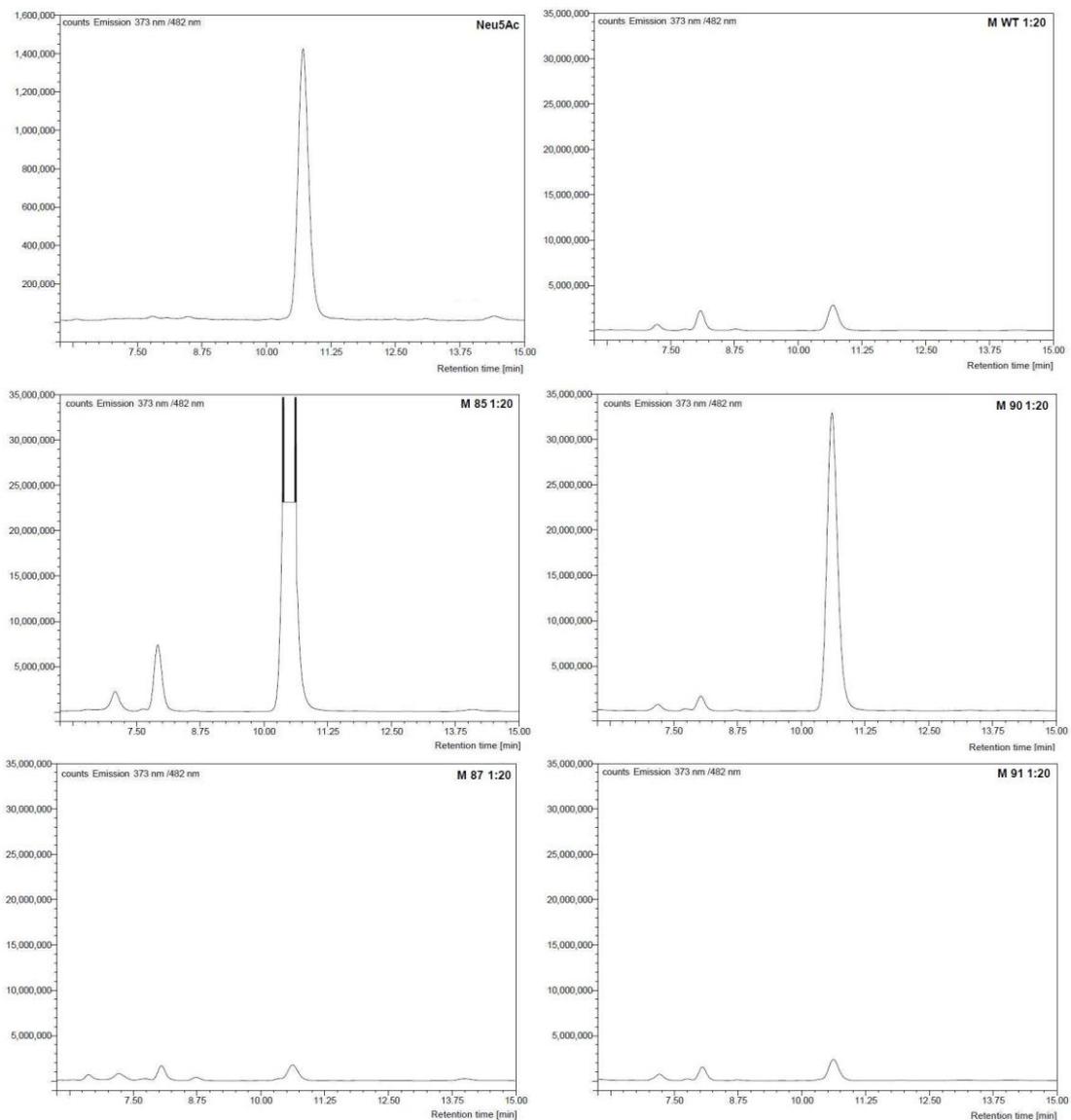


Abbildung 19: HPLC-Analyse der gereinigten Urinproben von Maus 53 Nachkommen

Dargestellt sind die Chromatogramme einiger Maus 53 Nachkommen, des Wildtyps und eines Neu5Ac-Standards. Der Neu5Ac-Peak befindet sich bei einer Retentionszeit (x-Achse) von etwa 10 min. Die y-Achse zeigt die Fluoreszenzintensität.

In Abbildung 20 ist die Quantifizierung der Neu5Ac-Menge im Urin der Maus 53 Nachkommen dargestellt. Wildtypen haben im Durchschnitt pro 20 μ l Urin 2,05 μ g Neu5Ac ausgeschieden. Innerhalb der Nachkommenschaft von Maus 53 konnten Neu5Ac Mengen von 3,76 μ g/20 μ l Urin (Maus 33) bis 23,88 μ g/20 μ l Urin (Maus 85) ermittelt werden. Im Vergleich zum Wildtyp entsprechen diese Werte einer 2- bis 12-fachen Erhöhung der Neu5Ac-Ausscheidung. Unter den transgenen Nachkommen befinden sich allerdings auch Mäuse, welche im Vergleich zum

Wildtyp keine erhöhte Neu5Ac-Ausscheidung zeigen (Maus 87, 91 und 92). Bei Maus 91 und Maus 92 ist das vermutlich auf die fehlende Expression des Transgenes zurückzuführen (vgl.4.2.1). Maus 87 hingegen zeigt Transgeneexpression aber keine Neu5Ac Ausscheidung.

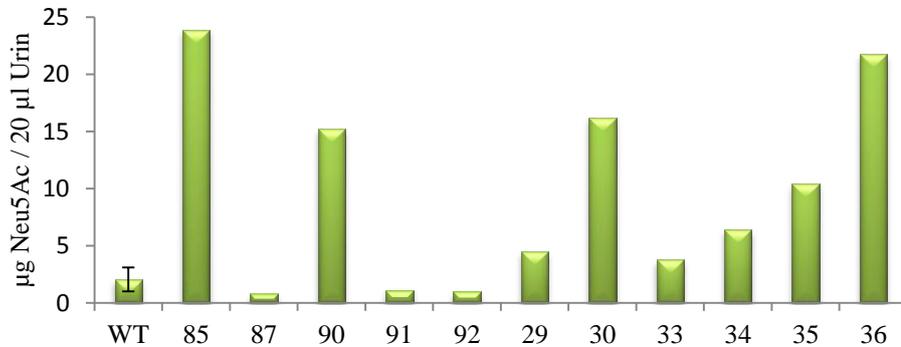


Abbildung 20: Neu5Ac-Gehalt im Urin der Maus 53 Nachkommen.

Das Diagramm zeigt die Quantifizierung der Neu5Ac-Menge im Urin von Maus 53 und des Wildtyps. Die berechnete Neu5Ac-Menge ist bezogen auf 20 µl Urin, welcher mittels Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt wurde.

4.2.3 Quantifizierung der Sialinsäurekonzentration im Gewebe und im Blutplasma

Durch den Defekt der *feedback*-Inhibierung der GNE kommt es zu einer ungebremsten Produktion von Neu5Ac im Zytoplasma. Die überschüssigen Sialinsäuren werden zum Teil über den Urin ausgeschieden, ein großer Teil jedoch akkumuliert in freier Form im Zytoplasma. In Fibroblasten von Sialurie-Patienten konnte eine Erhöhung der Sialinsäure in freier Form um das 70-200 fache festgestellt werden (Seppala *et al.*, 1991). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum einen die Sialinsäurekonzentration im Zytoplasma der Gehirne von transgenen- und Wildtyp-Mäusen untersucht und zum anderen wurde die Sialinsäurekonzentration im Blutplasma dieser Tiere bestimmt. Bei der Gewinnung der zytoplasmatischen Fraktion aus den Gehirnllysaten wurde nochmals zwischen alten und jungen Mäusen unterschieden. Beim Blutplasma konnte diese Unterscheidung nicht vorgenommen werden, da aufgrund des geringen Blutvolumens von sehr jungen Mäusen nicht genug Probe gewonnen werden konnte. Die Bestimmung der Gesamtsialinsäurekonzentration im Gehirnzcytoplasma und im Blutplasma erfolgte mittels der Periodat-Resorcinol Methode von Jourdian *et al.*, 1971. Hierbei werden sowohl freie als auch gebundene Sialinsäuren erfasst. Das Ergebnis ist in Abbildung 21 dargestellt. Bei jungen transgenen Mäusen ist die im Gehirnzcytoplasma ermittelte Gesamtsialinsäurekonzentration, im Vergleich zum Wildtyp, um 45 % erhöht. Bei alten Mäusen ist noch eine signifikante Erhöhung um 13 % festzustellen. Zudem fällt auf, dass im Verlauf der Entwicklung die Sialinsäurekonzentration sowohl bei Wildtypen als auch bei transgenen Mäusen um 30 % bis

50 % abnimmt. Bezüglich der Gehirnmorphologie zeigte sich kein Unterschied zwischen Wildtypen und transgenen Mäusen. Im Blutplasma von Wildtyp- und transgenen Mäusen konnte mittels der Periodat-Resorcinol Methode kein signifikanter Unterschied der Sialinsäurekonzentration festgestellt werden.

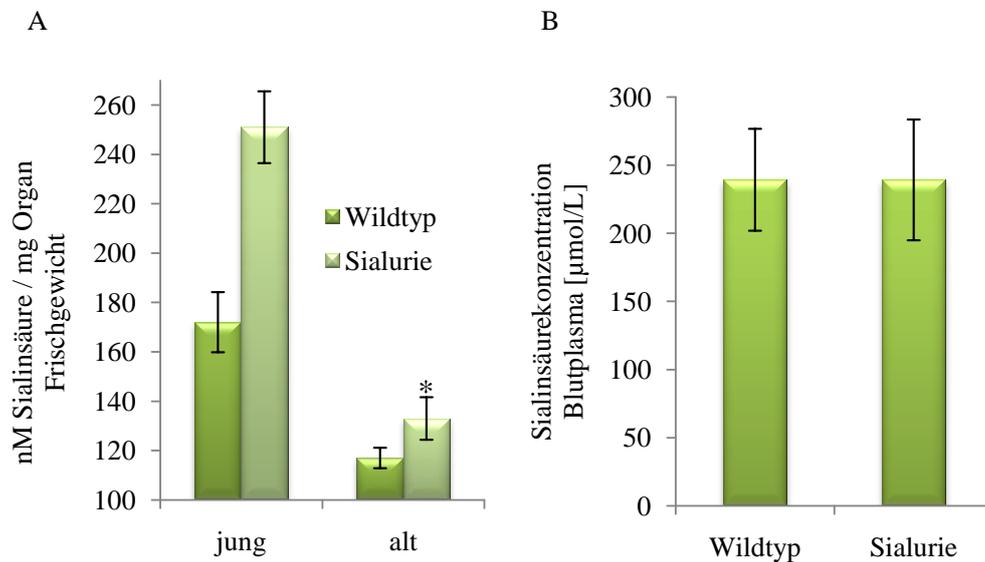


Abbildung 21: Sialinsäurekonzentration im Gehirnzcytoplasma und im Blutplasma

A) Das Diagramm zeigt die Sialinsäurekonzentration in nmol/L bezogen auf 1 mg Organ Frischgewicht für Wildtyp- und Sialurie-Mäuse. Es wurden sowohl junge als auch alte Mäuse untersucht. Der Unterschied zwischen alten Wildtyp- und Sialurie-Mäusen ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% signifikant (*) verschieden. B) Das Diagramm zeigt die Sialinsäurekonzentration im Blutplasma von Wildtyp- und Sialurie-Mäusen in µmol/L. Die Balken beider Diagramme repräsentieren den Mittelwert von mindestens fünf Tieren.

4.2.4 Analyse der Oberflächensialylierung von Leukozyten mittels Durchflusszytometrie

Nahezu alle Zellen tragen auf ihrer Oberfläche sialylierte Glykokonjugate. Frühere Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass der Sialylierungsgrad von Zelloberflächen durch die intrazelluläre Sialinsäurekonzentration reguliert ist. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der Oberflächensialylierung von Leukozyten aus Wildtyp- und Sialurie-Mäusen, mittels der Durchflusszytometrie. Dazu wurde ein Sialinsäure-spezifisches, FITC-markiertes Lektin der Gartenschnecke *Limax flavus* (LFA) verwendet. In Abbildung 22 ist exemplarisch eine solche Analyse dargestellt.

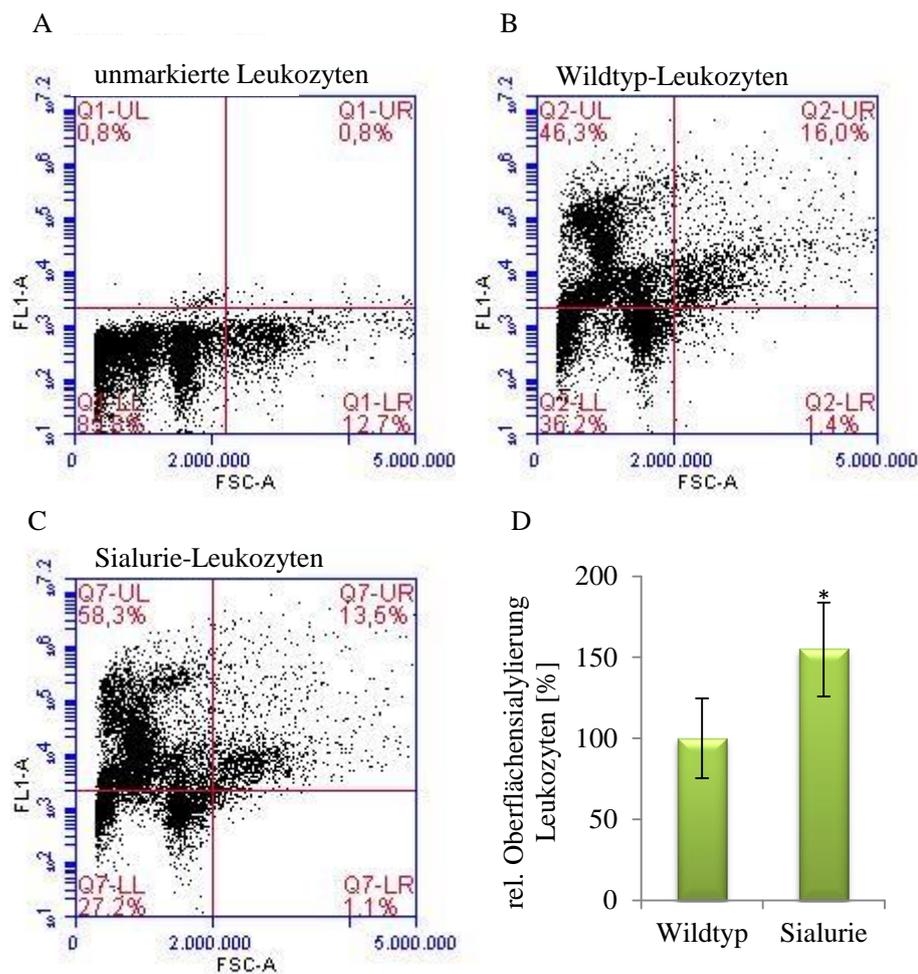


Abbildung 22: Durchflusszytometrische Analyse von Leukozyten A) Darstellung Dot-Blot unmarkierte Leukozyten B) Darstellung Dot-Blot Wildtyp-Leukozyten mit FITC-LFA behandelt. C) Darstellung Dot-Blot Sialurie-Leukozyten mit FITC-LFA behandelt. Es wurden jeweils 10.000 Zellen im Durchflusszytometer analysiert. D) Darstellung der rel. Oberflächensialylierung für Wildtyp- und Sialurie-Leukozyten in %. Der Unterschied zwischen Wildtyp- und Sialurie-Leukozyten ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% signifikant (*) verschieden. Die Balken des Diagramms repräsentieren den Mittelwert von sieben Tieren

In den Dot-Blots ist jeweils die Grünfluoreszenzintensität (FL1) gegen das Vorwärtstreulicht (FSC) der Zellen aufgetragen. Das Vorwärtstreulicht ist ein Maß für die Größe der Zellen. Jede Zelle zeigt ein gewisses Maß an Eigenfluoreszenz (auch Hintergrundfluoreszenz). Es wurden daher unmarkierte Zellen analysiert, um die Grenze zur spezifischen, durch Sialinsäuren hervorgerufenen, Grünfluoreszenz festzulegen (vgl. Abbildung 22 A). Abbildung 22 B zeigt die durchflusszytometrische Messung von Wildtyp-Leukozyten, welche mit dem FITC-markierten Lektin behandelt wurden. 62,3 % der analysierten Zellen zeigen nun höhere

Fluoreszenzintensitäten als die unmarkierten Zellen. Man kann davon ausgehen, dass diese Grünfluoreszenz durch die Bindung des LFA-Lektins an die Oberflächensialinsäuren hervorgerufen wird. Bei den Sialurie-Leukozyten (vgl. Abbildung 22 C) zeigen 71,9 % der analysierten Zellen diese spezifische Fluoreszenz, was auf eine erhöhte Oberflächensialylierung der Sialurie-Leukozyten hinweist. Zur Quantifizierung der Oberflächensialylierung wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der analysierten Zellen herangezogen. Leukozyten der Sialurie-Mäuse weisen eine um 50 % erhöhte Oberflächensialylierung, im Vergleich zu Wildtyp-Leukozyten, auf.

4.2.5 Quantifizierung der Polysialinsäuremenge im Gehirn

Anhand einer heterozygoten GNE *knockout* Maus konnte bereits gezeigt werden, dass eine Verringerung der zellulären Sialinsäurekonzentration eine Reduktion der Polysialylierung von NCAM zur Folge hat (Gagiannis *et al.*, 2007b). Um zu untersuchen, ob die erhöhte zytoplasmatische Sialinsäurekonzentration im Gehirn sialuriekranke Mäuse einen Einfluss auf den Polysialinsäuregehalt hat, wurde das Gehirn von Sialurie- und Wildtyp-Mäusen homogenisiert. Da bekannt ist, dass die Polysialylierung im Alter enorm abnimmt, wurde zudem zwischen jungen und alten Mäusen unterschieden. Die aus den Homogenaten gewonnene Membranfraktion wurde solubilisiert und deren Proteingehalt überprüft. Für eine quantitative Western Blot Analyse wurden identische Proteinmengen in einer SDS-PAGE getrennt. Um die aufgetragene Proteinmenge zu überprüfen, wurden Proben aufgetragen, welche zuvor mit Endoneuraminidase behandelt wurden. Nach dieser Behandlung kann NCAM im Western Blot nachgewiesen werden, da die Polysialinsäure vollständig vom NCAM entfernt wird und so die Erkennung durch einen spezifischen Antikörper möglich ist. Hierfür wurde der monoklonale Antikörper 5B8 verwendet, welcher spezifisch die Isoformen NCAM-140 und -180 erkennt. Für den Nachweis von PolySia wurde der monoklonale Antikörper 735 verwendet. Dieser erkennt α -2,8-verknüpfte Neu5Ac-Reste ab einer Kettenlänge von acht Sialinsäuren. Charakteristisch für polysialyliertes NCAM ist ein breites, schmierartiges Signal bei etwa 250 kDa, welches durch die heterogene Länge der PolySia-Ketten zustande kommt. Für die Polysialylierung im juvenilen Stadium und im adulten Stadium ist jeweils ein repräsentativer Blot in Abbildung 23 dargestellt. Für beide Altersgruppen konnten PolySia-Signale detektiert werden, wobei die Signalintensität bei den Sialurie-Mäusen deutlich stärker ist als bei den Wildtypen. Die Quantifizierung der PolySia-Banden mittels densitometrischer Auswertung ergab im juvenilen Stadium eine Erhöhung der Polysialinsäuremenge um etwa 100% im Vergleich zum Wildtyp. Bei adulten Sialurie Mäusen betrug die Erhöhung noch 37 %.

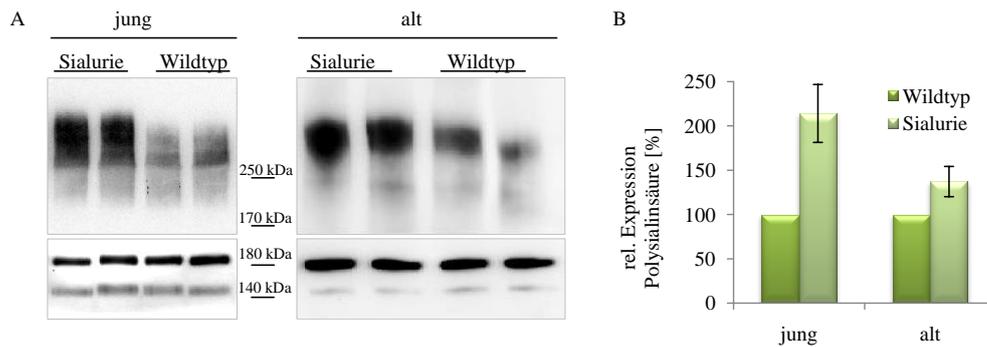


Abbildung 23: Nachweis der Polysialylierung im Gehirn von Sialurie- und Wildtyp-Mäusen. A) Dargestellt sind repräsentative Western Blots zum Nachweis von Polysialinsäure in Gehirnlysaten von Sialurie- und Wildtyp Mäusen, wobei auch zwischen jungen und alten Mäusen unterschieden wurde. Die Membranfraktionen wurden aus Homogenaten ganzer Gehirne gewonnen. Die Solubilisate der Membranfraktionen wurden mittels 8 % SDS-PAGE aufgetrennt, wobei bei jungen Mäusen 10 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen wurde und bei alten Mäusen waren 30 µg Gesamtprotein pro Spur nötig. PolySia wurde mit dem α -PolySia mAK 735 nachgewiesen und NCAM wurde mit dem α -NCAM mAK 5B8 nachgewiesen. Die Entwicklung erfolgte mit Hilfe des sekundären, peroxidase-konjugierten Ziege- α -Maus IgG und Chemilumineszenz Detektion. PolySia ist als schmierartiges Signal bei etwa 250 kDa sichtbar (jeweils oberer Blot) Die NCAM Isoformen sind entsprechend ihres Molekulargewichtes bei 140 kDa und 180 kDa sichtbar (jeweils unterer Blot). B) Die Quantifizierung der Polysialinsäuremenge in Sialurie- und Wildtyp-Mäusen erfolgte mittels densitometrischer Auswertung. Für die PolySia-Banden wurde die Intensität bestimmt, wobei der Wildtyp als Referenz diente und auf 100 % festgelegt wurde. Die Balken repräsentieren den Mittelwert von vier jungen und fünf alten Mäusen.

4.3 Fütterung von FVB/N Mäusen mit *N*-Acetylmannosamin (ManNAc)

ManNAc ist der natürliche Vorläufer der Sialinsäuren. Frühere Untersuchungen zeigten, dass ManNAc von Zellen aufgenommen werden kann und zur Sialylierung der Glykokonjugate beiträgt. Um zu untersuchen, in welchem Ausmaß ManNAc durch eine orale Applikation vom Organismus aufgenommen und für die Sialinsäurebiosynthese verwendet wird, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Verabreichung von 30 mM ManNAc an FVB/N Mäuse mit dem Trinkwasser. Es wurden zum einen adulte Tiere gefüttert und zum anderen wurden säugende Muttertiere getränkt, um die ManNAc Aufnahme der Nachkommen über die Muttermilch näher zu untersuchen. Diese Nachkommen wurden an Tag 7 und Tag 14 (d7 p.n. d14 p.n.) nach der Geburt geopfert. In den nachfolgend beschriebenen Ergebnissen umfassen diese Mäuse die Altersgruppe jung. Die Analyse der Urinproben von ManNAc getränkten Mäusen (ManNAc-Mäuse) und mit Wasser getränkten Mäusen (Kontroll-Mäuse) ergab, dass eine Gabe von 30 mM ManNAc über eine Dauer von zwei Wochen zu einer 10-fachen Erhöhung der Neu5Ac Ausscheidung führt. Die Bestimmung der Gesamtsialinsäurekonzentration mittels Periodat-

Resorcinol Assay im Blutplasma von adulten ManNAc-Mäusen und Kontroll-Mäusen ergab keine signifikanten Unterschiede (vgl. Abbildung 24 A). Des Weiteren wurde die Gesamtsialinsäurekonzentration im Gehirnzitoplasma von ManNAc-Mäusen und Kontroll-Mäusen bestimmt. Bei beiden Altersgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (vgl. Abbildung 24 B). Es fällt jedoch auf, dass die Sialinsäurekonzentration bei den alten Mäusen um 30 % geringer ist als bei den jungen.

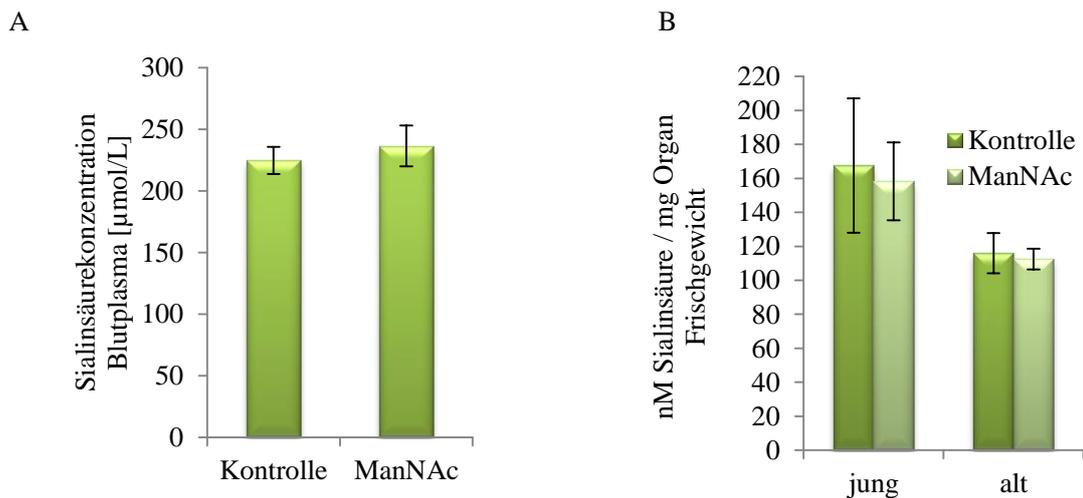


Abbildung 24: Ergebnisse der Sialinsäureanalytik bei ManNAc getränkten Mäusen. A) Das Diagramm zeigt die Sialinsäurekonzentration im Blutplasma von adulten Kontroll- und ManNAc-Mäusen in $\mu\text{mol/L}$. B) Das Diagramm zeigt die Sialinsäurekonzentration in nmol/L bezogen auf 1 mg Organ Frischgewicht für Kontroll- und ManNAc-Mäuse. Es wurden sowohl junge als auch alte Mäuse untersucht.

Aus den Gehirnlysaten von jungen und alten ManNAc-Mäusen sowie den Kontroll-Mäusen wurde ebenfalls die Membranfraktion isoliert und mittels Western Blot auf das Vorhandensein von Polysialinsäure untersucht. In Abbildung 25 A ist ein repräsentativer Blot dargestellt und in Abbildung 25 B die Quantifizierung der Polysialinsäuremenge. Bei den adulten Mäusen wurden jeweils $30 \mu\text{g}$ Gesamtprotein verwendet, da der Polysialinsäure Gehalt mit zunehmendem Alter stark abnimmt. Bei den jungen Mäusen war es ausreichend $10 \mu\text{g}$ Gesamtprotein zu verwenden, um ein quantifizierbares Signal zu detektieren. An Tag 7 p.n. ist der Polysialinsäuregehalt bei ManNAc-Mäusen im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen um 75 % erhöht und an Tag 14 p.n. wurde eine Erhöhung um 100 % ermittelt. Frühere Untersuchungen mit Mäusen, die von der Gruppe um S. Galuska durchgeführt wurden, zeigten, dass die Polysialinsäuremenge im Mausgehirn ab Tag 9 p.n. sehr stark abnimmt. Meine Untersuchungen zeigen eine Abnahme bis Tag 14 p.n. um 50 % bei den Kontroll-Mäusen und 65 % bei den ManNAc-Mäusen. Trotz dieser Abnahme ist der PolySia-Gehalt im Gehirn der ManNAc-Mäuse, wie bereits erwähnt, nahezu doppelt so hoch als bei den Kontroll-Mäusen. Die Aufnahme des ManNAcs erfolgte bei

diesen Mäusen über die Muttermilch. Bei den adulten Mäusen, welche das ManNAc selbst aus dem Trinkwasser aufnehmen konnten, wurde, im Vergleich zu den Kontroll Mäusen, keine Erhöhung des PolySia-Gehalts im Gehirn festgestellt.

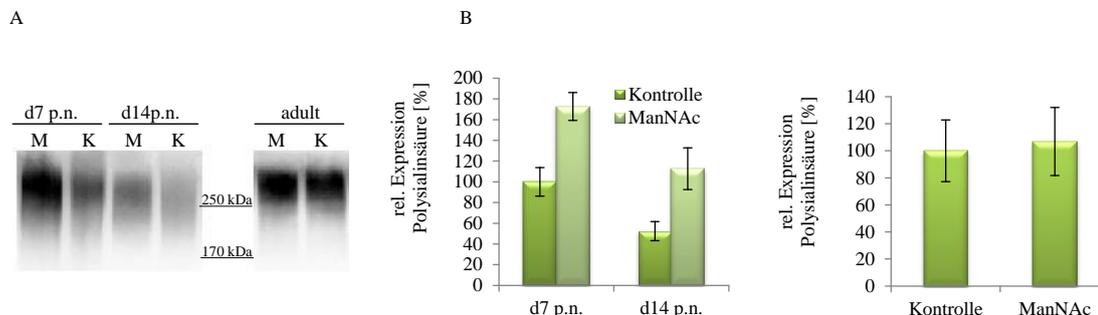


Abbildung 25: Ergebnisse der Polysialinsäureanalytik bei ManNAc getränkten Mäusen. A) Dargestellt sind repräsentative Western Blots zum Nachweis von Polysialinsäure in Gehirnlisaten von ManNAc- (M) und Kontroll-Mäusen (K), wobei auch zwischen jungen (d7 p.n. und d14 p.n.) und alten Mäusen unterschieden wurde. Die Membranfraktionen wurden aus Homogenaten ganzer Gehirne gewonnen. Die Solubilisate der Membranfraktionen wurden mittels 8 % SDS-PAGE aufgetrennt, wobei bei jungen Mäusen 10 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen wurde und bei alten Mäusen waren 30 µg Gesamtprotein pro Spur nötig. Der Blot erfolgte auf eine Nitrocellulose Membran. PolySia wurde mit dem α -PolySia mAK 735 nachgewiesen. Die Entwicklung erfolgte mit Hilfe des sekundären, peroxidase-konjugierten Ziege- α -Maus IgG und Chemilumineszenz Detektion. PolySia ist als schmierartiges Signal bei etwa 250 kDa sichtbar. B) Die Quantifizierung der Polysialinsäuremenge in ManNAc- und Kontroll-Mäusen erfolgte mittels densitometrischer Auswertung. Für die PolySia-Banden wurde die Intensität bestimmt, wobei die Kontroll-Mäuse als Referenz dienten und auf 100 % festgelegt wurden. Da die Intensität des PolySia-Signals bis d14 p.n. schwächer wird, konnte die PolySia-Menge für ManNAc- und Kontroll-Mäuse an d14 p.n., anhand der 100 % Referenz, an d7 p.n. prozentual angepasst werden. Die Balken repräsentieren den Mittelwert von mindestens drei Mäusen.

5 Diskussion

5.1 Etablierung der transgenen Mauslinie FVBN-GNE-R263L

Die GNE ist das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese. Durch den Austausch der Aminosäure Arginin an Position 263 zu Leucin in der Bindungsstelle für CMP-Neu5Ac, dem Endprodukt der Sialinsäurebiosynthese, kommt es zum Verlust der *feedback*-Inhibierung der GNE. Das führt zu einer ungebremsten intrazellulären Sialinsäureproduktion und zum Krankheitsbild der Sialurie (vgl. 1.2.5). In der vorliegenden Arbeit wurde, mittels der DNA-Mikroinjektion, die transgene Mauslinie FVBN-GNE-R263L generiert, welche aufgrund der im Genom integrierten mutierten GNE eine Überproduktion von Sialinsäuren in ihren Zellen aufweist. Das dafür verwendete Konstrukt pcDNA3.1-GNE-R263L wurde in einer früheren *in vitro* Studie an CHO Zellen bereits auf Funktionalität getestet. Die Expression der mutierten GNE steht unter der Kontrolle des CMV-Promoters. Bei diesem Promoter handelt es sich um einen der am häufigsten verwendeten *in vitro* und *in vivo* Promotoren zur Steuerung der Expression von Transgenen in Säugerzellen, aufgrund seiner starken konstitutiven Promotoraktivität. Durch die Transfektion der CHO Zellen mit der Sialurie-mutierten GNE kam es zur Erhöhung der intrazellulären Sialinsäurekonzentration um das Sechsfache verglichen mit nicht transfizierten Zellen. Es stellte sich heraus, dass diese Zellen zudem genutzt werden können um die Sialylierung von therapeutischen Glykoproteinen wie Erythropoetin zu erhöhen, was zu einer deutlich verbesserten Wirkung führt (Bork *et al.*, 2007b).

Der FVB/N Mausstamm ist für die Erstellung einer transgenen Mauslinie der Stamm der Wahl, da er sich durch eine hohe Reproduktionsrate und eine große Wurfgröße auszeichnet. Zudem wird durch die großen prominenten Vorkerne die Mikroinjektion erleichtert. Im Vergleich zu anderen Mausstämmen ist die Überlebensrate der Zygoten nach der Mikroinjektion wesentlich höher (Taketo *et al.*, 1991). Für die Etablierung der FVBN-GNE-R263L Mauslinie wurden 556 Zygoten der Mikroinjektion unterzogen. Diese Prozedur überlebten 455 Zygoten, welche zu Embryonen heranreiften. Es wurden 76 Gründertiere (Founder) geboren, von denen sechs Tiere die mutierte GNE-R263L im Genom integriert haben. Bezogen auf die mikroinjizierten Zygoten liegt die Ausbeute bei einem Prozent. Alle sechs Founder wurden zunächst mit Wildtypen verpaart, um zu überprüfen ob das Transgen an die Folgegenerationen weitergegeben wird. Alle Founder-Verpaarungen ergaben in der F1-Generation transgene Nachkommen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das Transgen in die Keimzellen eingebracht wurde und weitervererbt wird.

Die Mikroinjektion von linearen DNA-Konstrukten in den männlichen Vorkern einer Zygote führt zur Integration des Transgens an einer nicht vorhersehbaren Stelle des Empfänger-genoms. Darüber hinaus kann es zur Integration mehrerer Kopien des Transgenes kommen, wobei deren

Anzahl zwischen einer Kopie und mehreren hundert liegen kann. Zur Etablierung einer transgenen Maus ist es von Vorteil Founder mit nur einer funktionsfähigen Integration des Transgens zu verwenden. Um die Anzahl der integrierten Transgenkopien im Mausgenom zu bestimmen wird in der Regel das Southern Blot Verfahren genutzt. Da dieses Verfahren jedoch kein zufriedenstellendes Ergebnis lieferte (Daten nicht gezeigt), wurde um die Integrationshäufigkeit zu bestimmen die *realtime* PCR angewendet. Die Anzahl der Transgenkopien wurde nach einer etablierten Methode von Ballester *et al.* berechnet (Ballester *et al.*, 2004). Unter den Foundern befindet sich keine Maus bei der das Transgen nur einmal im Genom integriert ist. Die Integrationen variieren von etwa vier bei Founder 69 bis mehr als 50 bei Founder 53.

Bei der Erstellung einer transgenen Mauslinie ist eine stabile Expression des Transgens von enormer Wichtigkeit. Das GNE-R263L-Transkript konnte bei den Foundern 35, 42, 55 und 72 nachgewiesen werden. Bei Founder 69, welcher die wenigsten Transgenkopien im Genom enthält, konnte kein GNE-R263L-Transkript nachgewiesen werden. Founder 53 konnte für eine RNA-Aufreinigung nicht mehr verwendet werden, da dieser vorzeitig verstarb. Es wurde hier auf einen Nachkommen aus der F1-Generation zurückgegriffen. Auch hier konnte das GNE-R263L-Transkript nachgewiesen werden. Die Transgenexpression ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Da bei der Mikroinjektion der Ort der Integration nicht gesteuert werden kann, kommt dem Positionseffekt besondere Bedeutung zu. Die den Integrationsort flankierenden Sequenzen können einen größeren Einfluss auf das Expressionslevel haben als die Zahl der Transgenkopien im Genom (Palmiter *et al.*, 1982). Die Integration in transkriptionsinaktive Bereiche des Genoms oder der Einfluss regulatorischer Elemente am Integrationsort kann die Expression des Transgens reduzieren oder stilllegen (Auerbach, 2004). Ebenso kann die Auswahl des Promoters die Expression des Transgens erheblich beeinflussen. Der hier verwendete CMV-Promoter ist zwar der Promoter der Wahl zur Steuerung der Transgenexpression in Säugerzellen, jedoch ist es möglich das Transgene unter der Kontrolle viraler Promotoren stillgelegt werden können (Knust *et al.*, 1989; Verma & Somia, 1997). Ebenso ist es möglich, dass die Verwendung von cDNA-Konstrukten in transgenen Mäusen zu mangelnder Expression des Transgens führt (Palmiter & Brinster, 1986). Des Weiteren können noch vorhandene Vektorsequenzen im Transgen die Expression beeinflussen (Chada *et al.*, 1985; Townes *et al.*, 1985).

Aber nicht nur naheliegende Sequenzelemente haben einen Einfluss auf die Expressionsaktivität eines Transgens, ebenso sind epigenetische Faktoren, wie DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen, von Bedeutung bei einer erfolgreichen Entwicklung transgener Organismen. In ein etabliertes Genom integrierte Fremdsequenzen unterliegen einer sogenannten *de novo* Methylierung (Jaenisch & Jähner, 1984), welche als zellulärer Verteidigungsmechanismus zum

Schutz vor Fremdsequenzen dient und zur Inaktivierung der Transkription führt (Doerfler, 1991).

Da das primäre Charakteristikum der Sialurie eine massive urinaire Ausscheidung von Neu5Ac ist, wurde dessen Gehalt im Urin der Founder quantifiziert. Hierfür mussten die Sialinsäuren aus dem Urin aufgereinigt werden, da die Periodat-Resorcinol Methode bei Urin, aufgrund unzähliger störender Substanzen, keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferte. Da Sialinsäuren durch die Carboxygruppe am C2-Atom negativ geladen sind, eignet sich als Reinigungsmethode die Anionenaustauschchromatographie. Für die anschließende Messung und Quantifizierung der Neu5Ac-Menge im Urin wurde eine HPLC durchgeführt, basierend auf der Fluoreszenzmarkierung von Sialinsäuren mit DMB. Es stellte sich heraus, dass nur bei den Foundern 35, 42 und 53 die Neu5Ac-Menge im Urin deutlich erhöht ist. Zudem ist überraschend, dass die Neu5Ac-Mengen der drei oben genannten Tiere stark voneinander abweichen. Im Vergleich zum Wildtyp zeigen Maus 35 und 42 eine 13-fache bzw. 8,5-fache Erhöhung der Neu5Ac-Ausscheidung. Davon weicht Maus 53 mit einer 400-fachen Erhöhung deutlich ab. Es ist denkbar, dass diese Unterschiede durch die unterschiedliche Anzahl der Transgenkopien im Genom zustande kommen. Allerdings zeigen auch die bisher untersuchten Sialurie-Patienten eine starke Variabilität in der Erhöhung der Neu5Ac-Exkretion (Leroy *et al.*, 2001). Die Werte schwanken hier zwischen dem 30-bis 500-fachen der normalen Neu5Ac-Ausscheidung (Enns *et al.*, 2001). Das Maus 69 keine erhöhte Neu5Ac Menge im Urin aufweist, war zu erwarten, da keine Transgenexpression nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich zum Wildtyp zeigt Maus 72 nur einen dreifach erhöhten Neu5Ac-Wert, vermutlich aufgrund der sehr geringen Expression. Die geringe Neu5Ac-Menge im Urin von Maus 55 ist sehr überraschend, da aufgrund der vorhandenen Expression des Transgens auch eine massive Neu5Ac Ausscheidung erwartet wurde. Denkbar wäre hier eine fehlerhafte Proteinexpression der mutierten GNE.

Zur Etablierung der Sialurie-Mauslinie wurden, aufgrund der oben erläuterten Ergebnisse nur Maus 35, 42 und 53 verwendet, da sowohl das Transgen exprimiert wird als auch die ausgeschiedene Menge an Neu5Ac deutlich erhöht ist. Alle drei Mäuse lieferten in der F1-Generation transgene Nachkommen. Linie 35 und 42 konnten nicht etabliert werden, da die zur Anzucht ausgewählten Zuchttiere infertil waren. Es ist denkbar, dass diese Infertilität durch den Positionseffekt hervorgerufen wird, da durch die nichtsteuerbare Integration eines Transgens ins Genom auch endogene Gene stillgelegt werden können. Zudem belegen verschiedene Studien die Beteiligung von Sialinsäuren an Fertilisationsprozessen (DeSouza *et al.*, 1998; Mengerink & Vacquier, 2001). Alle Folgegenerationen von Maus 53 lieferten transgene Nachkommen. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Expression des Transgenes innerhalb der Nachkommenschaft von Maus 53 nicht stabil ist. Da nicht bei allen transgenen Nachkommen das GNE-R263L-Transkript nachgewiesen werden konnte (vgl.4.2.1). Darüber hinaus konnten Mäuse identifiziert

werden, die ähnlich wie bei Founder 55 das Transgen exprimieren jedoch keine erhöhte Sialinsäureproduktion aufweisen. Maus 53 hat mehr als 50 Kopien der mutierten GNE im Genom enthalten. Es ist denkbar, dass die Expression der einzelnen Integrationen durch die oben bereits beschriebenen Effekte in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst ist, wodurch bei einigen Nachkommen durch Vererbung funktionsunfähiger Integrationen keine Expression nachweisbar ist oder kein Sialurie-spezifischer Effekt auftritt. Eine Studie von 1982 zur Regulation von Metallothionein-Thymidinkinase fusions Genen in transgenen Mäusen und deren Nachkommen zeigte, dass die Expression eines Transgens nicht zwangsläufig an die Nachkommenschaft weitervererbt wird. Es stellte sich heraus, dass die Transgenexpression innerhalb der Nachkommenschaft eines Founders stark variieren kann und eine Korrelation zwischen der Transgenmethylierung und dem Expressionslevel vorhanden ist. Zudem nahm man an, dass aufgrund von Methylierungen in Tieren mit vielen Transgenkopien im Genom nur eine oder wenige aktiv sind (Palmiter *et al.*, 1982).

Für alle weiteren Charakterisierungsexperimente wurden nur Mäuse verwendet, bei denen die Expression des Transgens und eine erhöhte Sialinsäuremenge im Urin nachgewiesen werden konnte. Im Verlauf dieser Arbeit ist es nicht gelungen durch gezielte Verpaarungen der Maus 53 Nachkommen eine stabile Expression des Transgens bei allen Nachkommen zu erreichen. Aufgrund dessen und da keine phänotypischen Veränderungen und Verhaltensauffälligkeiten zu verzeichnen waren, war es notwendig, neben der Genotypisierung der Nachkommen auch deren Urin auf den Neu5Ac-Gehalt zu überprüfen.

5.2 Auswirkungen einer veränderten Sialinsäurekonzentration im Organismus

Sialinsäuren sind aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften, der enormen Strukturvielfalt und ihrer terminalen Position auf Glykokonjugaten in unzählige zelluläre Prozesse involviert. So ist es nicht überraschend, dass das Fehlen von Sialinsäuren schon in der Embryonalentwicklung letal ist. Ein homozygoter *knockout* der GNE führt in der Embryonalentwicklung der Maus zwischen Tag 8,5 und 9,5 zum Tod (Schwarzkopf *et al.*, 2002). Umgekehrt stellt sich nun aber die Frage, welchen Einfluss eine übermäßige Sialinsäureproduktion auf den Organismus hat. Beim Menschen führt die dominant vererbte Krankheit Sialurie zu einer Überproduktion von Sialinsäuren. In Fibroblasten von Sialurie-Patienten wurde 40 mal mehr freie Sialinsäure gefunden als in gesunden Fibroblasten (Thomas *et al.*, 1985). Weitere gewebespezifische Konzentrationen freier Sialinsäuren bei Sialurie-Patienten sind nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Maus generiert, welche eine Sialurie-mutierte GNE exprimiert und aufgrund dessen übermäßig viele Sialinsäuren produziert. Zum großen Teil werden diese Sialinsäuren mit dem Urin ausgeschieden. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass eine Überproduktion an Sialinsäuren zur intrazellulären Akkumulation führt. Im Zytoplasma des

Gehirns zeigte sich bei Sialurie-Mäusen eine deutliche Erhöhung der Gesamtsialinsäurekonzentration um das 1,5-fache im Vergleich zum Wildtyp. Unsere Gruppe konnte *in vitro* bereits zeigen, dass durch die Transfektion mit einer Sialurie-mutierten GNE die Konzentration an Sialinsäuren in CHO Zellen um das Zwei- bis Sechsfache gesteigert werden kann. Eine Steigerung membrangebundener Sialinsäuren wurde nicht nachgewiesen, jedoch war es möglich in Sialurie mutierten CHO Zellen den Sialylierungsgrad von rekombinantem Erythropoetin zu erhöhen (Bork *et al.*, 2005, 2007b). Der Sialylierungsgrad wirkt sich unmittelbar auf die Funktion und Stabilität von Glykokonjugaten aus und kann bei therapeutischen Glykoproteinen deren Wirkung maßgeblich beeinflussen. Aufgrund der in dieser Arbeit verwendeten Methode zur Bestimmung der Sialinsäurekonzentration im Gewebezcytoplasma kann nur eine Aussage zur Gesamtsialinsäurekonzentration gemacht werden, das heißt es wurden sowohl gebundene als auch freie Sialinsäuren erfasst. Wopereis *et al.* konnte zeigen, dass es in Fibroblasten von Sialurie-Patienten zu keiner Erhöhung der Sialylierung von *N*-Glycanen kommt (Wopereis *et al.*, 2006). Ein Grund hierfür könnte sein, dass die meisten freien Galaktosereste auf Glykokonjugaten bereits mit Sialinsäure besetzt sind. Dies legt nahe, dass die beobachtete erhöhte Sialinsäurekonzentration auf eine Akkumulation freier Sialinsäuren im Zytoplasma zurückzuführen ist. Bei membrangebundenen Sialinsäuren lag die Priorität auf der Untersuchung der Polysialinsäure. Polysialinsäure ist ein lineares Homopolymer aus α -2,8 verknüpften Neu5Ac Molekülen, welche vorwiegend auf NCAM zu finden sind. Polysialinsäureketten können eine Länge von bis zu 400 Resten erreichen (Nakata & Troy, 2005). Unsere Gruppe konnte bereits *in vitro* zeigen, dass die intrazelluläre Sialinsäurekonzentration den Gehalt an Polysialinsäuren beeinflusst (Bork *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte nun *in vivo* gezeigt werden, dass die ungebremste Sialinsäurebiosynthese eine Steigerung des Polysialinsäuregehaltes um 100 % zur Folge hat. Die Polysialylierung von NCAM erreicht am Tag 9 p.n. ihr Maximum und sinkt dann zeitgleich mit der *downregulation* der Polysialyltransferasen auf ein Minimum im adultem Stadium (Oltmann-Norden *et al.*, 2008). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Polysialylierung bei adulten Sialurie -Mäusen zwar abnimmt, jedoch im Vergleich zu adulten Wildtypen um 37 % erhöht bleibt. Die Abnahme der Polysialylierung ist durch die geringer werdende Expression der Polysialyltransferasen mit zunehmendem Alter zu erklären. Jedoch hat die Konzentration des Substrates Neu5Ac einen Einfluss auf die Regulation der Polysialyltransferasen. Zukünftige Arbeiten können Aufschluss darüber geben, ob bei den Sialurie-Mäusen der Polymerisierungsgrad beeinflusst ist oder mehr NCAM Moleküle in der polysialylierten Form vorliegen. Ein vorzeitiges Auftreten von nicht polysialyliertem „nacktem“ NCAM hat fatale Auswirkungen und führt zum vorzeitigen Tod. (Weinhold *et al.*, 2005). Bis heute wurden die neuronalen Auswirkungen fehlender Polysialylierung eingehend untersucht. Über die Auswirkungen einer Überproduktion von Polysialinsäure ist bisher jedoch kaum etwas

bekannt. Da bei Sialurie-Patienten häufig eine Verzögerung der neuronalen Entwicklung zu beobachten ist, kann man vermuten, dass dabei das verzögerte Absinken des Polysialinsäuregehaltes eine Rolle spielt. Zudem hat Polysialinsäure einen inhibierenden Einfluss auf die Bildung von Myelinscheiden an Axonen. Charles *et al.* zeigten, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, dass die *downregulation* von Polysialinsäure einhergeht mit dem Beginn der Myelinisierung (Charles *et al.*, 2000). Eine Studie von Fewou *et al.*, 2007 zeigte, dass Mäuse mit gesteigerter Polysialinsäure Expression geringere Myelinisierung und degenerierte Axone aufweisen. Ebenso könnte das bei Sialurie-Patienten der Fall sein. Bei der demyelinisierenden Erkrankung Multiple Sklerose führt eine Reexpression der Polysialinsäure auf Axonen in Läsionen zu einer gestörten Regeneration der Myelinscheiden und begünstigt somit das Fortschreiten der Krankheit (Charles *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde zudem die Konzentration an Sialinsäuren im Blutplasma bestimmt. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden. Verantwortlich hierfür ist möglicherweise der rasche Abtransport der Sialinsäuren über den Urin. Bei genauerer Betrachtung der Blutbestandteile mittels Durchflusszytometrie konnte in dieser Arbeit eine signifikante Erhöhung der Oberflächen Sialylierung bei Leukozyten der Sialurie-Mäuse im Vergleich zu Leukozyten des Wildtyps festgestellt werden. Die Hypersialylierung auf Zelloberflächen ist eher überraschend da die möglichen Bindungsstellen für Sialinsäure nicht unbegrenzt zur Verfügung stehen. Allerdings konnten Wopereis *et al.*, (2006) bereits zeigen, dass Sialurie zu einer Hypersialylierung bei Serum Proteinen führt. Wobei diese Hypersialylierung vorwiegend bei *O*-Glykanen auftrat.

Neben der deutlich erhöhten Sialinsäurekonzentration im Gehirnzitoplasma konnte auch eine Abnahme der Gesamtsialylierung mit zunehmendem Alter der Mäuse festgestellt werden. Dieses Ergebnis korreliert mit verschiedenen Studien, die eine Veränderung der Sialylierung in verschiedenen Geweben während des Alterns aufzeigen. Während bei Ratten im Lauf der Zeit der Sialinsäuregehalt in Gehirn und Leber abnimmt, steigt er in der glatten Muskulatur des Dickdarms an (Sprenger *et al.*, 2009). Auch bei alternden Mäusen wurde eine Erhöhung der Sialylierung verschiedener Muskelgruppen festgestellt (Hanisch *et al.*, 2013). Nach außen sichtbare Symptome der Sialurie sind vorwiegend auf die Kindheit beschränkt. Da die Untersuchung auf Sialurie bei Neugeborenen nicht zur Routine gehört, geht man davon aus dass die Prävalenz der Krankheit sehr viel höher ist als vermutet. Es gibt daher keine Daten zur Sialinsäurekonzentration in Fibroblasten bei erwachsenen Patienten. In dieser Arbeit zeigt sich erstmals, dass auch im adulten Stadium der Sialurie die zelluläre Konzentration an freien Sialinsäuren erhöht bleibt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine weitere Möglichkeit die intrazelluläre Sialinsäurekonzentration zu erhöhen untersucht. ManNAc ist der natürliche Vorläufer von Neu5Ac und entsteht durch die Epimerisierung von UDP-GlcNAc. Anschließend wird ManNAc

phosphoryliert und zur Neu5Ac weiter metabolisiert. Da nur die Epimerisierung der *feedback*-Inhibierung unterliegt, kann durch die Zuführung von ManNAc dieser Mechanismus umgangen werden. Zusätzlich kann die Phosphorylierung von ManNAc auch durch die GlcNAc-Kinase übernommen werden (Hinderlich *et al.*, 2001). Fritsch *et al.* zeigten bereits 1996, dass hohe ManNAc-Konzentrationen den CMP-Neu5Ac Pool in MDCK Zellen um das 6,5-fache steigern (Fritsch *et al.*, 1996). Die Verabreichung von ManNAc, *in vitro* durch Behandlung von CHO Zellen und *in vivo* durch intraperitoneale Injektion bei Mäusen, führte zur Erhöhung der intrazellulären Sialinsäurekonzentration und zur vermehrten Expression der Polysialinsäure (Bork *et al.*, 2005; Gagiannis *et al.*, 2007a). In dieser Arbeit erfolgte die Zuführung von ManNAc oral mittels des Trinkwassers, wodurch die Handhabung deutlich vereinfacht wird. Allerdings birgt diese Methode den Nachteil einer möglicherweise stark schwankenden Trinkmenge. Bei adulten Mäusen konnte nach zwei Wochen Trinkdauer weder ein signifikanter Anstieg der intrazellulären Sialylierung noch der Polysialylierung festgestellt werden. Denkbar wäre, dass die zusätzlich gebildeten Sialinsäuren sofort über den Urin ausgeschieden werden. Um eine Akkumulation der Sialinsäuren im Gewebe zu erreichen könnte mit einer höheren ManNAc-Konzentration gearbeitet werden, da die Trinkmenge der Mäuse nicht beeinflussbar ist. In Zellkultur führte eine Erhöhung der ManNAc-Konzentration zur kontinuierlichen Erhöhung der Sialinsäurekonzentration. Konzentrationen über 50 mM wirkten in Zellkultur toxisch (Bork *et al.*, 2005). Um die Möglichkeit zu untersuchen, ManNAc über die Muttermilch zu applizieren, wurde einer säugenden Maus ebenfalls ManNAc oral über das Trinkwasser verabreicht. Es bedarf weiterer Experimente, um zu klären ob ManNAc selbst oder von der Mutter im Überschuss produzierte Sialinsäure in die Milch übergeht. Die Jungtiere zeigten an Tag 7 und 14 p.n. einen um bis zu 100 % erhöhten Polysialinsäuregehalt. Es konnte jedoch kein Anstieg der intrazellulären Sialinsäurekonzentration festgestellt werden. Eine Erklärung gibt es hierfür bislang nicht. Möglicherweise besteht auch hier wieder ein Zusammenhang zwischen aufgenommener Menge und Ausscheidung der Sialinsäuren. Zwischen Tag 7 und 14 p.n. sinkt der Polysialinsäuregehalt um bis zu 65 %, sowohl bei den ManNAc-Mäusen, als auch bei den Kontroll-Mäusen. Dieses Ergebnis korreliert mit dem, von Oltmann-Norden *et al.*, 2008, publiziertem Ergebnis, dass der Polysialinsäuregehalt im Maushirn ab Tag 9 p.n. innerhalb einer Woche um 70 % sinkt. Dennoch bleibt der Polysialinsäuregehalt der ManNAc-Mäuse über dem der Kontroll-Mäuse. Durch Zuführung der Sialinsäure über die Muttermilch konnte also ein ähnliches Ergebnis wie über den transgenen Versuchsansatz erzielt werden.

6 Zusammenfassung

Sialurie ist eine sehr seltene erbliche Störung des Stoffwechsels beim Menschen. Hervorgerufen wird der Defekt durch eine Punktmutation im allosterischen Zentrum der GNE, dem Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese. Die GNE wird dadurch nicht mehr durch das Endprodukt der Sialinsäuresynthese, CMP-Neu5Ac, *feedback*-inhibiert, was zu einer ungebremsten Produktion von freien Sialinsäuren im Zytoplasma führt. Patienten zeigen, neben anderen stark variablen Symptomen, eine massiv erhöhte Ausscheidung von Sialinsäuren und unterschiedlich ausgeprägte Entwicklungsverzögerungen. Über die Auswirkungen einer zu hohen Sialinsäurekonzentration im Organismus ist bisher nur sehr wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher, mittels Mikroinjektionstechnik, eine transgene Maus etabliert, welche die GNE mit der Sialurienmutation R263L exprimiert. Es konnte mittels HPLC festgestellt werden, dass Sialurie-Mäuse bis zu 400 mal mehr Neu5Ac mit dem Urin ausscheiden als Wildtyp-Mäuse. Wie auch bei den bisher untersuchten Sialurie-Patienten zeigte sich eine starke Schwankung der ausgeschiedenen Neu5Ac Menge bei den Sialurie-Mäusen. Des Weiteren wurde mittels Periodat-Resorcinol Methode die Sialinsäurekonzentration im Mausgehirn bestimmt. Es zeigte sich, dass sowohl junge als auch alte Mäuse eine deutlich erhöhte Sialinsäurekonzentration im Gehirn aufweisen. Mittels Immunoblotanalysen konnte bestätigt werden, dass die vorwiegend im Gehirn anzutreffende Polysialinsäure, welche einen enormen Einfluss auf die neuronale Entwicklung hat, ebenfalls in deutlich größeren Mengen bei Sialurie-Mäusen als bei Wildtypen vorhanden ist. Mittels Durchflusszytometrie konnte ebenfalls eine erhöhte Oberflächensialylierung auf Leukozyten der Sialurie Mäuse festgestellt werden. Als Alternative zum transgenen Versuchsansatz wurde Wildtyp-Mäusen der physiologische Sialinsäurevorläufer ManNAc über das Trinkwasser und über die Muttermilch verabreicht. Es zeigte sich bei den Mäusen, welche ManNAc über die Muttermilch erhalten haben, eine deutliche Erhöhung der Polysialinsäurekonzentration. Die Applikation von ManNAc über das Trinkwasser hatte keinen Einfluss auf die Sialinsäurekonzentration.

7 Literaturverzeichnis

- Albach C, Damoc E, Denzinger T, Schachner M, Przybylski M & Schmitz B (2004). Identification of N-glycosylation sites of the murine neural cell adhesion molecule NCAM by MALDI-TOF and MALDI-FTICR mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **378**, 1129–1135.
- Angata K, Huckaby V, Ranscht B, Terskikh A, Marth JD & Fukuda M (2007). Polysialic acid-directed migration and differentiation of neural precursors are essential for mouse brain development. *Mol Cell Biol* **27**, 6659–6668.
- Angata T & Varki A (2002). Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev* **102**, 439–469.
- Ashwell G & Morell A (1974). The dual role of sialic acid in the hepatic recognition and catabolism of serum glycoproteins. *Biochem Soc Symp* **117**–124.
- Auerbach AB (2004). Production of functional transgenic mice by DNA pronuclear microinjection. *Acta Biochim Pol* **51**, 9–31.
- Avril T, Floyd H, Lopez F, Vivier E & Crocker PR (2004). The membrane-proximal immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif is critical for the inhibitory signaling mediated by Siglecs-7 and -9, CD33-related Siglecs expressed on human monocytes and NK cells. *J Immunol Baltim Md 1950* **173**, 6841–6849.
- Ballester M, Castelló A, Ibáñez E, Sánchez A & Folch JM (2004). Real-time quantitative PCR-based system for determining transgene copy number in transgenic animals. *BioTechniques* **37**, 610–613.
- Becker C g., Artola A, Gerardy-Schahn R, Becker T, Welzl H & Schachner M (1996). The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci Res* **45**, 143–152.
- Berg EL, Robinson MK, Mansson O, Butcher EC & Magnani JL (1991). A carbohydrate domain common to both sialyl Le(a) and sialyl Le(X) is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *J Biol Chem* **266**, 14869–14872.
- Bonfanti L (2006). PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Prog Neurobiol* **80**, 129–164.
- Bork K, Gagiannis D, Orthmann A, Weidemann W, Kontou M, Reutter W & Horstkorte R (2007a). Experimental approaches to interfere with the polysialylation of the neural cell adhesion molecule in vitro and in vivo. *J Neurochem* **103 Suppl 1**, 65–71.
- Bork K, Horstkorte R & Weidemann W (2009). Increasing the sialylation of therapeutic glycoproteins: The potential of the sialic acid biosynthetic pathway. *J Pharm Sci* **98**, 3499–3508.
- Bork K, Reutter W, Gerardy-Schahn R & Horstkorte R (2005). The intracellular concentration of sialic acid regulates the polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *FEBS Lett* **579**, 5079–5083.
- Bork K, Reutter W, Weidemann W & Horstkorte R (2007b). Enhanced sialylation of EPO by overexpression of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManAc kinase containing a sialuria mutation in CHO cells. *FEBS Lett* **581**, 4195–4198.

- Bragonzi A, Distefano G, Buckberry LD, Acerbis G, Foglieni C, Lamotte D, Campi G, Marc A, Soria MR, Jenkins N & Monaco L (2000). A new Chinese hamster ovary cell line expressing alpha2,6-sialyltransferase used as universal host for the production of human-like sialylated recombinant glycoproteins. *Biochim Biophys Acta* **1474**, 273–282.
- Cardini CE & Leloir LF (1957). Enzymatic Formation of Acetylgalactosamine. *J Biol Chem* **225**, 317–324.
- Chada K, Magram J, Raphael K, Radice G, Lacy E & Costantini F (1985). Specific expression of a foreign beta-globin gene in erythroid cells of transgenic mice. *Nature* **314**, 377–380.
- Charles P, Hernandez MP, Stankoff B, Aigrot MS, Colin C, Rougon G, Zalc B & Lubetzki C (2000). Negative regulation of central nervous system myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7585–7590.
- Charles P, Reynolds R, Seilhean D, Rougon G, Aigrot MS, Niezgodka A, Zalc B & Lubetzki C (2002). Re-expression of PSA-NCAM by demyelinated axons: an inhibitor of remyelination in multiple sclerosis? *Brain* **125**, 1972–1979.
- Close BE & Colley KJ (1998). In vivo autopolysialylation and localization of the polysialyltransferases PST and STX. *J Biol Chem* **273**, 34586–34593.
- Cohen M & Varki A (2010). The Sialome—Far More Than the Sum of Its Parts. *OMICS J Integr Biol* **14**, 455–464.
- Cremer H, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, Brown R, Baldwin S, Kraemer P & Scheff S (1994). Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* **367**, 455–459.
- Crocker PR, Hartnell A, Munday J & Nath D (1997). The potential role of sialoadhesin as a macrophage recognition molecule in health and disease. *Glycoconj J* **14**, 601–609.
- Crocker PR, Paulson JC & Varki A (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* **7**, 255–266.
- Cunningham BA, Hoffman S, Rutishauser U, Hemperly JJ & Edelman GM (1983). Molecular topography of the neural cell adhesion molecule N-CAM: surface orientation and location of sialic acid-rich and binding regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3116–3120.
- Curreli S, Arany Z, Gerardy-Schahn R, Mann D & Stamatou NM (2007). Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions. *J Biol Chem* **282**, 30346–30356.
- Debeljak N & Sytkowski AJ (2008). Erythropoietin: new approaches to improved molecular designs and therapeutic alternatives. *Curr Pharm Des* **14**, 1302–1310.
- Dennis JW & Laferté S (1985). Recognition of asparagine-linked oligosaccharides on murine tumor cells by natural killer cells. *Cancer Res* **45**, 6034–6040.
- Von Der Ohe M, Wheeler SF, Wuhrer M, Harvey DJ, Liedtke S, Mühlenhoff M, Gerardy-Schahn R, Geyer H, Dwek RA, Geyer R, Wing DR & Schachner M (2002). Localization and characterization of polysialic acid-containing N-linked glycans from bovine NCAM. *Glycobiology* **12**, 47–63.
- DeSouza MM, Lagow E & Carson DD (1998). Mucin functions and expression in mammalian reproductive tract tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 1–6.

- Dityatev A, Dityateva G, Sytnyk V, Delling M, Toni N, Nikonenko I, Muller D & Schachner M (2004). Polysialylated neural cell adhesion molecule promotes remodeling and formation of hippocampal synapses. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **24**, 9372–9382.
- Dityatev A & Schachner M (2006). The extracellular matrix and synapses. *Cell Tissue Res* **326**, 647–654.
- Eckhardt M, Bukalo O, Chazal G, Wang L, Goridis C, Schachner M, Gerardy-Schahn R, Cremer H & Dityatev A (2000). Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SiaIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **20**, 5234–5244.
- Eckhardt M, Mühlenhoff M, Bethe A & Gerardy-Schahn R (1996). Expression cloning of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7572–7576.
- Eckhardt M, Mühlenhoff M, Bethe A, Koopman J, Frosch M & Gerardy-Schahn R (1995). Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1. *Nature* **373**, 715–718.
- El Maarouf A & Rutishauser U (2008). WITHDRAWN: Use of PSA-NCAM in Repair of the Central Nervous System. *Neurochem Res*; DOI: 10.1007/s11064-008-9635-7.
- Enns GM, Seppala R, Musci TJ, Weisiger K, Ferrell LD, Wenger DA, Gahl WA & Packman S (2001). Clinical course and biochemistry of sialuria. *J Inherit Metab Dis* **24**, 328–336.
- Fewou SN, Ramakrishnan H, Büsow H, Gieselmann V & Eckhardt M (2007). Down-regulation of Polysialic Acid Is Required for Efficient Myelin Formation. *J Biol Chem* **282**, 16700–16711.
- Finne J (1982). Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain. *J Biol Chem* **257**, 11966–11970.
- Fritsch M, Geilen CC & Reutter W (1996). Determination of cytidine 5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid pool size in cell culture scale using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J Chromatogr A* **727**, 223–230.
- Gagiannis D, Gossrau R, Reutter W, Zimmermann-Kordmann M & Horstkorte R (2007a). Engineering the sialic acid in organs of mice using N-propanoylmannosamine. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* **1770**, 297–306.
- Gagiannis D, Orthmann A, Danßmann I, Schwarzkopf M, Weidemann W & Horstkorte R (2007b). Reduced sialylation status in UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE)-deficient mice. *Glycoconj J* **24**, 125–130.
- Galuska SP, Geyer R, Gerardy-Schahn R, Mühlenhoff M & Geyer H (2008). Enzyme-dependent variations in the polysialylation of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in vivo. *J Biol Chem* **283**, 17–28.
- Galuska SP, Rollenhagen M, Kaup M, Eggers K, Oltmann-Norden I, Schiff M, Hartmann M, Weinhold B, Hildebrandt H, Geyer R, Mühlenhoff M & Geyer H (2010). Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 10250–10255.
- Gascon E, Vutskits L & Kiss JZ (2007). Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. *Brain Res Rev* **56**, 101–118.

- Geyer H, Bahr U, Liedtke S, Schachner M & Geyer R (2001). Core structures of polysialylated glycans present in neural cell adhesion molecule from newborn mouse brain. *Eur J Biochem FEBS* **268**, 6587–6599.
- Ghosh S & Roseman S (1961). Enzymatic phosphorylation of N-acetyl-D-mannosamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **47**, 955–958.
- Gu X & Wang DI (1998). Improvement of interferon-gamma sialylation in Chinese hamster ovary cell culture by feeding of N-acetylmannosamine. *Biotechnol Bioeng* **58**, 642–648.
- Hanisch F, Weidemann W, Großmann M, Joshi PR, Holzhausen H-J, Stoltenburg G, Weis J, Zierz S & Horstkorte R (2013). Sialylation and Muscle Performance: Sialic Acid Is a Marker of Muscle Ageing. *PLoS ONE* **8**, e80520.
- Harduin-Lepers A, Mollicone R, Delannoy P & Oriol R (2005). The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach. *Glycobiology* **15**, 805–817.
- Harms E, Kreisel W, Reutter W & Morris HP (1973). Biosynthesis of N-Acetylneuraminic Acid in Morris Hepatomas. *Eur J Biochem* **32**, 254–262.
- Hart GW & Copeland RJ (2010). Glycomics hits the big time. *Cell* **143**, 672–676.
- He HT, Finne J & Goridis C (1987). Biosynthesis, membrane association, and release of N-CAM-120, a phosphatidylinositol-linked form of the neural cell adhesion molecule. *J Cell Biol* **105**, 2489–2500.
- Hildebrandt H, Mühlenhoff M & Gerardy-Schahn R (2010). Polysialylation of NCAM. *Adv Exp Med Biol* **663**, 95–109.
- Hildebrandt H, Mühlenhoff M, Oltmann-Norden I, Röckle I, Burkhardt H, Weinhold B & Gerardy-Schahn R (2009). Imbalance of neural cell adhesion molecule and polysialyltransferase alleles causes defective brain connectivity. *Brain* **132**, 2831–2838.
- Hinderlich S, Berger M, Keppler OT, Pawlita M & Reutter W (2001). Biosynthesis of N-acetylneuraminic acid in cells lacking UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *Biol Chem* **382**, 291–297.
- Hinderlich S, Stäsche R, Zeitler R & Reutter W (1997). A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *J Biol Chem* **272**, 24313–24318.
- Hinderlich S, Weidemann W, Yardeni T, Horstkorte R & Huizing M (2013). UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc Kinase (GNE): A Master Regulator of Sialic Acid Synthesis. *Top Curr Chem*; DOI: 10.1007/128_2013_464.
- Horstkorte R, Lee HY, Lucka L, Danker K, Mantey L & Reutter W (2001). Biochemical engineering of the side chain of sialic acids increases the biological stability of the highly sialylated cell adhesion molecule CEACAM1. *Biochem Biophys Res Commun* **283**, 31–35.
- Horstkorte R, Nöhring S, Danker K, Effertz K, Reutter W & Lucka L (2000). Protein kinase C phosphorylates and regulates UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *FEBS Lett* **470**, 315–318.
- Inoue S & Inoue Y (2001). Developmental profile of neural cell adhesion molecule glycoforms with a varying degree of polymerization of polysialic acid chains. *J Biol Chem* **276**, 31863–31870.

- Irie A, Koyama S, Kozutsumi Y, Kawasaki T & Suzuki A (1998). The molecular basis for the absence of N-glycolylneuraminic acid in humans. *J Biol Chem* **273**, 15866–15871.
- Jaenisch R & Jähner D (1984). Methylation, expression and chromosomal position of genes in mammals. *Biochim Biophys Acta* **782**, 1–9.
- Jeong YT, Choi O, Lim HR, Son YD, Kim HJ & Kim JH (2008). Enhanced sialylation of recombinant erythropoietin in CHO cells by human glycosyltransferase expression. *J Microbiol Biotechnol* **18**, 1945–1952.
- Johnson CP, Fujimoto I, Rutishauser U & Leckband DE (2005). Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion. *J Biol Chem* **280**, 137–145.
- Jourdian GW, Dean L & Roseman S (1971). The Sialic Acids XI. A PERIODATE-RESORCINOL METHOD FOR THE QUANTITATIVE ESTIMATION OF FREE SIALIC ACIDS AND THEIR GLYCOSIDES. *J Biol Chem* **246**, 430–435.
- Kanato Y, Kitajima K & Sato C (2008). Direct binding of polysialic acid to a brain-derived neurotrophic factor depends on the degree of polymerization. *Glycobiology* **18**, 1044–1053.
- Kaneko Y, Nimmerjahn F & Ravetch JV (2006). Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* **313**, 670–673.
- Kayser H, Ats C, Lehmann J & Reutter W (1993). New amino sugar analogues are incorporated at different rates into glycoproteins of mouse organs. *Experientia* **49**, 885–887.
- Kayser H, Zeitler R, Kannicht C, Grunow D, Nuck R & Reutter W (1992). Biosynthesis of a nonphysiological sialic acid in different rat organs, using N-propanoyl-D-hexosamines as precursors. *J Biol Chem* **267**, 16934–16938.
- Kean EL (1991). Sialic acid activation. *Glycobiology* **1**, 441–447.
- Keppler OT, Horstkorte R, Pawlita M, Schmidt C & Reutter W (2001). Biochemical engineering of the N-acyl side chain of sialic acid: biological implications. *Glycobiology* **11**, 11R – 18R.
- Kikuchi K, Kikuchi H & Tsuiki S (1971). Activities of sialic acid-synthesizing enzymes in rat liver and rat and mouse tumors. *Biochim Biophys Acta* **252**, 357–368.
- Knust B, Brüggemann U & Doerfler W (1989). Reactivation of a methylation-silenced gene in adenovirus-transformed cells by 5-azacytidine or by E1A trans activation. *J Virol* **63**, 3519–3524.
- Kornfeld S, Kornfeld R, Neufeld EF & O'Brien PJ (1964). The feedback control of sugar nucleotide biosynthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **52**, 371–379.
- Kudo M, Kitajima K, Inoue S, Shiokawa K, Morris HR, Dell A & Inoue Y (1996). Characterization of the major core structures of the alpha2-->8-linked polysialic acid-containing glycan chains present in neural cell adhesion molecule in embryonic chick brains. *J Biol Chem* **271**, 32667–32677.
- Lasky LA (1995). Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu Rev Biochem* **64**, 113–139.
- Lawson EQ, Hedlund BE, Ericson ME, Mood DA, Litman GW & Middaugh R (1983). Effect of carbohydrate on protein solubility. *Arch Biochem Biophys* **220**, 572–575.

- Lehmann F, Tiralongo E & Tiralongo J (2006). Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function. *Cell Mol Life Sci CMLS* **63**, 1331–1354.
- Leroy JG (1993a). Sialuria. In *GeneReviewsTM*, ed. Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong C-T & Stephens K. University of Washington, Seattle, Seattle (WA). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1164/> [Accessed October 4, 2013].
- Leroy JG (1993b). Sialuria. In *GeneReviews^(®)*, ed. Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong C-T, Smith RJ & Stephens K. University of Washington, Seattle, Seattle (WA). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1164/> [Accessed June 12, 2014].
- Leroy JG, Seppala R, Huizing M, Dacremont G, Simpel HD, Coster RNV, Orvisky E, Krasnewich DM & Gahl WA (2001). Dominant Inheritance of Sialuria, an Inborn Error of Feedback Inhibition. *Am J Hum Genet* **68**, 1419–1427.
- Liedtke S, Geyer H, Wuhler M, Geyer R, Frank G, Gerardy-Schahn R, Zähringer U & Schachner M (2001). Characterization of N-glycans from mouse brain neural cell adhesion molecule. *Glycobiology* **11**, 373–384.
- Mengerink KJ & Vacquier VD (2001). Glycobiology of sperm-egg interactions in deuterostomes. *Glycobiology* **11**, 37R – 43R.
- Morell AG, Gregoriadis G, Scheinberg IH, Hickman J & Ashwell G (1971). The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J Biol Chem* **246**, 1461–1467.
- Muchmore EA, Milewski M, Varki A & Diaz S (1989). Biosynthesis of N-glycolyneuraminic acid. The primary site of hydroxylation of N-acetylneuraminic acid is the cytosolic sugar nucleotide pool. *J Biol Chem* **264**, 20216–20223.
- Mühlenhoff M, Eckhardt M, Bethe A, Frosch M & Gerardy-Schahn R (1996). Polysialylation of NCAM by a single enzyme. *Curr Biol CB* **6**, 1188–1191.
- Mühlenhoff M, Oltmann-Norden I, Weinhold B, Hildebrandt H & Gerardy-Schahn R (2009). Brain development needs sugar: the role of polysialic acid in controlling NCAM functions. *Biol Chem* **390**, 567–574.
- Muller D, Djebbara-Hannas Z, Jourdain P, Vutskits L, Durbec P, Rougon G & Kiss JZ (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**, 4315–4320.
- Muller D, Mendez P, De Roo M, Klauser P, Steen S & Poglia L (2008). WITHDRAWN: Role of NCAM in Spine Dynamics and Synaptogenesis. *Neurochem Res*; DOI: 10.1007/s11064-008-9653-5.
- Nakata D & Troy FA 2nd (2005). Degree of polymerization (DP) of polysialic acid (polySia) on neural cell adhesion molecules (N-CAMS): development and application of a new strategy to accurately determine the DP of polySia chains on N-CAMS. *J Biol Chem* **280**, 38305–38316.
- Nakayama J, Fukuda MN, Fredette B, Ranscht B & Fukuda M (1995). Expression cloning of a human polysialyltransferase that forms the polysialylated neural cell adhesion molecule present in embryonic brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7031–7035.
- Nelson RW, Bates PA & Rutishauser U (1995). Protein determinants for specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* **270**, 17171–17179.

- Nutku E, Aizawa H, Hudson SA & Bochner BS (2003). Ligation of Siglec-8: a selective mechanism for induction of human eosinophil apoptosis. *Blood* **101**, 5014–5020.
- O’Connell AW, Fox GB, Barry T, Murphy KJ, Fichera G, Foley AG, Kelly J & Regan CM (1997). Spatial learning activates neural cell adhesion molecule polysialylation in a corticohippocampal pathway within the medial temporal lobe. *J Neurochem* **68**, 2538–2546.
- Oltmann-Norden I, Galuska SP, Hildebrandt H, Geyer R, Gerardy-Schahn R, Geyer H & Mühlhoff M (2008). Impact of the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV on polysialic acid synthesis during postnatal mouse brain development. *J Biol Chem* **283**, 1463–1471.
- Ong E, Nakayama J, Angata K, Reyes L, Katsuyama T, Arai Y & Fukuda M (1998). Developmental regulation of polysialic acid synthesis in mouse directed by two polysialyltransferases, PST and STX. *Glycobiology* **8**, 415–424.
- Ong E, Suzuki M, Belot F, Yeh J-C, Franceschini I, Angata K, Hindsgaul O & Fukuda M (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**, 18182–18190.
- Palmiter RD & Brinster RL (1986). Germ-line transformation of mice. *Annu Rev Genet* **20**, 465–499.
- Palmiter RD, Chen HY & Brinster RL (1982). Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. *Cell* **29**, 701–710.
- Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FC, Perez M, Singhal AK, Hakomori S & Paulson JC (1990). ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science* **250**, 1130–1132.
- Pilatte Y, Bignon J & Lambré CR (1993). Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: pathophysiological implications of sialidases in immunity. *Glycobiology* **3**, 201–218.
- Probstmeier R, Bilz A & Schneider-Schaulies J (1994). Expression of the neural cell adhesion molecule and polysialic acid during early mouse embryogenesis. *J Neurosci Res* **37**, 324–335.
- Reuter G & Gabius HJ (1996). Sialic acids structure-analysis-metabolism-occurrence-recognition. *Biol Chem Hoppe Seyler* **377**, 325–342.
- Reuter G, Pfeil R, Stoll S, Schauer R, Kamerling JP, Versluis C & Vliegenthart JF (1983). Identification of new sialic acids derived from glycoprotein of bovine submandibular gland. *Eur J Biochem FEBS* **134**, 139–143.
- Roth J, Kempf A, Reuter G, Schauer R & Gehring WJ (1992). Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*. *Science* **256**, 673–675.
- Rougon G & Hobert O (2003). New insights into the diversity and function of neuronal immunoglobulin superfamily molecules. *Annu Rev Neurosci* **26**, 207–238.
- Rutishauser U (2008). Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* **9**, 26–35.
- Sadoul R, Hirn M, Deagostini-Bazin H, Rougon G & Goridis C (1983). Adult and embryonic mouse neural cell adhesion molecules have different binding properties. *Nature* **304**, 347–349.

- Sato C & Kitajima K (2013). Disialic, oligosialic and polysialic acids: distribution, functions and related disease. *J Biochem (Tokyo)* **154**, 115–136.
- Schachter H (2000). The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches. *Glycoconj J* **17**, 465–483.
- Schauer R (1988). Sialic Acids as Antigenic Determinants of Complex Carbohydrates. In *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates*, ed. Wu AM & Adams LG, Advances in Experimental Medicine and Biology, pp. 47–72. Springer US. Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4613-1663-3_2 [Accessed June 12, 2014].
- Schauer R (2004). Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology* **107**, 49–64.
- Schauer R (2009). Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol* **19**, 507–514.
- Scheidegger EP, Sternberg LR, Roth J & Lowe JB (1995). A human STX cDNA confers polysialic acid expression in mammalian cells. *J Biol Chem* **270**, 22685–22688.
- Schenkman S, Jiang MS, Hart GW & Nussenzweig V (1991). A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell* **65**, 1117–1125.
- Schwarzkopf M, Knobloch K-P, Rohde E, Hinderlich S, Wiechens N, Lucka L, Horak I, Reutter W & Horstkorte R (2002). Sialylation is essential for early development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5267–5270.
- Seki T & Rutishauser U (1998). Removal of polysialic acid-neural cell adhesion molecule induces aberrant mossy fiber innervation and ectopic synaptogenesis in the hippocampus. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **18**, 3757–3766.
- Seppala R, Lehto VP & Gahl WA (1999). Mutations in the human UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase gene define the disease sialuria and the allosteric site of the enzyme. *Am J Hum Genet* **64**, 1563–1569.
- Seppala R, Tietze F, Krasnewich D, Weiss P, Ashwell G, Barsh G, Thomas GH, Packman S & Gahl WA (1991). Sialic acid metabolism in sialuria fibroblasts. *J Biol Chem* **266**, 7456–7461.
- Shaw L & Schauer R (1988). The biosynthesis of N-glycolylneuraminic acid occurs by hydroxylation of the CMP-glycoside of N-acetylneuraminic acid. *Biol Chem Hoppe Seyler* **369**, 477–486.
- Sillanaukee, Pönniö & Jääskeläinen (1999). Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders. *Eur J Clin Invest* **29**, 413–425.
- Simon P, Bäumner S, Busch O, Röhrich R, Kaese M, Richterich P, Wehrend A, Müller K, Gerardy-Schahn R, Mühlenhoff M, Geyer H, Geyer R, Middendorff R & Galuska SP (2013). Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase ST8SiaII. *J Biol Chem* **288**, 18825–18833.
- Soares RM, de A Soares RM, Alviano DS, Angluster J, Alviano CS & Travassos LR (2000). Identification of sialic acids on the cell surface of *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1474**, 262–268.
- Sprenger N, Julita M, Donnicola D & Jann A (2009). Sialic acid feeding aged rats rejuvenates stimulated salivation and colon enteric neuron chemotypes. *Glycobiology* **19**, 1492–1502.

- Stäsche R, Hinderlich S, Weise C, Effertz K, Lucka L, Moormann P & Reutter W (1997). A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Molecular cloning and functional expression of UDP-N-acetyl-glucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *J Biol Chem* **272**, 24319–24324.
- Storms SD & Rutishauser U (1998). A Role for Polysialic Acid in Neural Cell Adhesion Molecule Heterophilic Binding to Proteoglycans. *J Biol Chem* **273**, 27124–27129.
- Takeda A (1987). Sialylation patterns of lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) differ between T and B lymphocytes. *Eur J Immunol* **17**, 281–286.
- Taketo M, Schroeder AC, Mobraaten LE, Gunning KB, Hanten G, Fox RR, Roderick TH, Stewart CL, Lilly F & Hansen CT (1991). FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2065–2069.
- Tedder TF, Tuscano J, Sato S & Kehrl JH (1997). CD22, a B lymphocyte-specific adhesion molecule that regulates antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol* **15**, 481–504.
- Theodosios DT, Rougon G & Poulain DA (1991). Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: polysialylated neural cell adhesion molecule in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5494–5498.
- Thomas GH, Reynolds LW & Miller CS (1985). Overproduction of N-acetylneuraminic acid (sialic acid) by sialuria fibroblasts. *Pediatr Res* **19**, 451–455.
- Townes TM, Lingrel JB, Chen HY, Brinster RL & Palmiter RD (1985). Erythroid-specific expression of human beta-globin genes in transgenic mice. *EMBO J* **4**, 1715–1723.
- Troy FA (1992). Polysialylation: from bacteria to brains. *Glycobiology* **2**, 5–23.
- Tsuda E, Kawanishi G, Ueda M, Masuda S & Sasaki R (1990). The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. *Eur J Biochem FEBS* **188**, 405–411.
- Varki A (1992). Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* **2**, 25–40.
- Varki A (2011). Evolutionary forces shaping the Golgi glycosylation machinery: why cell surface glycans are universal to living cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; DOI: 10.1101/cshperspect.a005462.
- Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW & Etzler ME eds. (2009). *Essentials of Glycobiology*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1908/> [Accessed April 18, 2014].
- Verma IM & Somia N (1997). Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* **389**, 239–242.
- Vitale C, Romagnani C, Falco M, Ponte M, Vitale M, Moretta A, Bacigalupo A, Moretta L & Mingari MC (1999). Engagement of p75/AIRM1 or CD33 inhibits the proliferation of normal or leukemic myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci* **96**, 15091–15096.
- Walop JN, Boschman TA & Jacobs J (1960). Affinity of N-acetylneuraminic acid for influenza virus neuraminidase. *Biochim Biophys Acta* **44**, 185–186.

- Walsh FS, Parekh RB, Moore SE, Dickson G, Barton CH, Gower HJ, Dwek RA & Rademacher TW (1989). Tissue specific O-linked glycosylation of the neural cell adhesion molecule (N-CAM). *Dev Camb Engl* **105**, 803–811.
- Wang Y & Neumann H (2010). Alleviation of Neurotoxicity by Microglial Human Siglec-11. *J Neurosci* **30**, 3482–3488.
- Warren L & Felsenfeld H (1961). N-Acetylmannosamine-6-phosphate and N-acetylneuraminic acid-9-phosphate as intermediates in sialic acid biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* **5**, 185–190.
- Doerfler W (1991). Patterns of DNA methylation--evolutionary vestiges of foreign DNA inactivation as a host defense mechanism. A proposal. *Biol Chem Hoppe Seyler* **372**, 557–564.
- Weinhold B, Seidenfaden R, Röckle I, Mühlenhoff M, Schertzinger F, Conzelmann S, Marth JD, Gerardy-Schahn R & Hildebrandt H (2005). Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* **280**, 42971–42977.
- Weiss P & Ashwell G (1989). The asialoglycoprotein receptor: properties and modulation by ligand. *Prog Clin Biol Res* **300**, 169–184.
- Weiss P, Tietze F, Gahl WA, Seppala R & Ashwell G (1989). Identification of the metabolic defect in sialuria. *J Biol Chem* **264**, 17635–17636.
- Wolfe LA & Krasnewich D (2013). Congenital disorders of glycosylation and intellectual disability. *Dev Disabil Res Rev* **17**, 211–225.
- Wong NSC, Yap MGS & Wang DIC (2006). Enhancing recombinant glycoprotein sialylation through CMP-sialic acid transporter over expression in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* **93**, 1005–1016.
- Wopereis S, Abd Hamid UM, Critchley A, Royle L, Dwek RA, Morava E, Leroy JG, Wilcken B, Lagerwerf AJ, Huijben KMLC, Lefeber DJ, Rudd PM & Wevers RA (2006). Abnormal glycosylation with hypersialylated O-glycans in patients with Sialuria. *Biochim Biophys Acta* **1762**, 598–607.
- Woronowicz A, Amith SR, De Vusser K, Laroy W, Contreras R, Basta S & Szewczuk MR (2007). Dependence of neurotrophic factor activation of Trk tyrosine kinase receptors on cellular sialidase. *Glycobiology* **17**, 10–24.
- Wuhrer M, Geyer H, von der Ohe M, Gerardy-Schahn R, Schachner M & Geyer R (2003). Localization of defined carbohydrate epitopes in bovine polysialylated NCAM. *Biochimie* **85**, 207–218.
- Yabe U, Sato C, Matsuda T & Kitajima K (2003). Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. *J Biol Chem* **278**, 13875–13880.
- Yang P, Yin X & Rutishauser U (1992). Intercellular space is affected by the polysialic acid content of NCAM. *J Cell Biol* **116**, 1487–1496.
- Yoshida Y, Kojima N, Kurosawa N, Hamamoto T & Tsuji S (1995). Molecular cloning of Sia alpha 2,3Gal beta 1,4GlcNAc alpha 2,8-sialyltransferase from mouse brain. *J Biol Chem* **270**, 14628–14633.

- Zhang Y, Ghadiri-Sani M, Zhang X, Richardson PM, Yeh J & Bo X (2007a). Induced expression of polysialic acid in the spinal cord promotes regeneration of sensory axons. *Mol Cell Neurosci* **35**, 109–119.
- Zhang Y, Yeh J, Richardson PM & Bo X (2008). Cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily in axonal regeneration and neural repair. *Restor Neurol Neurosci* **26**, 81–96.
- Zhang Y, Zhang X, Wu D, Verhaagen J, Richardson PM, Yeh J & Bo X (2007b). Lentiviral-mediated Expression of Polysialic Acid in Spinal Cord and Conditioning Lesion Promote Regeneration of Sensory Axons Into Spinal Cord. *Mol Ther* **15**, 1796–1804.
- Zhang Y, Zhang X, Yeh J, Richardson P & Bo X (2007c). Engineered expression of polysialic acid enhances Purkinje cell axonal regeneration in L1/GAP-43 double transgenic mice. *Eur J Neurosci* **25**, 351–361.
- Zuber C, Lackie PM, Catterall WA & Roth J (1992). Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. *J Biol Chem* **267**, 9965–9971.

8 Thesen

1. Ziel der Arbeit war es eine transgene Maus zu etablieren, welche die UDP-*N*-Acetylglukosamin-2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamin-Kinase (GNE) mit der Sialurie-Mutation R263L exprimiert, um die Auswirkungen einer erhöhten intrazellulären Sialinsäurekonzentration *in vivo* untersuchen zu können.
2. Aufgrund einer umgebremsten Sialinsäurebiosynthese scheiden Sialurie-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp bis zu 400-mal mehr *N*-Acetylneuraminsäure im Urin aus.
3. Im Gehirn der Sialurie-Mäuse kommt es zur Erhöhung der zytoplasmatischen Sialinsäurekonzentration sowohl bei jungen als auch bei adulten Mäusen. Der gesteigerte Sialinsäuregehalt beeinflusst die Regulation der Polysialytransferasen und führt bei Sialurie-Mäusen zur vermehrten Expression der an NCAM gebundenen Polysialinsäure, sowohl bei jungen als auch bei adulten Mäusen.
4. Es stellte sich heraus, dass es im Blutplasma der Sialurie nicht zur Akkumultion von freien Sialinsäuren kommt. Es konnte jedoch mittels Durchflusszytometrie eine Steigerung der Oberflächensialylierung auf Leukozyten festgestellt werden.
5. Als Alternative zum transgenen Versuchsansatz wurde Wildtyp-Mäusen der physiologische Sialinsäurevorläufer ManNAc über das Trinkwasser und über die Muttermilch verabreicht. Es zeigte sich bei den Mäusen, welche ManNAc über die Muttermilch erhalten haben, eine deutliche Erhöhung der Polysialinsäurekonzentration. Die Applikation von ManNAc über das Trinkwasser hatte keinen Einfluss auf den Sialinsäurehaushalt der Mäuse.
6. Die in dieser Arbeit etablierte transgene Maus stellt ein geeignetes *in vivo* Model dar, um den Sialinsäurehaushalt im Organismus näher zu untersuchen.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Denise Kreuzmann
Anschrift	Steinweg 24, 06110 Halle/Saale
Telefon	0345/25178469
Mobil	0152/29747978
E-mail	Denise.Kreuzmann@gmx.de
Geburtsdaten	10.11.1983 in Wippra



Berufliche Erfahrungen

seit 04/2012	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Prof. Dr. R. Horstkorte) mit geplantem Promotionsabschluss voraussichtlich Oktober 2015 <i>Thema der Dissertation: Erzeugung und Charakterisierung einer transgenen Maus als Tiermodell für die humane Erbkrankheit Sialurie</i>
11/2011-03/2012	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Forschergruppe: Zelluläre Biochemie (Prof. Dr. I. Heilmann)
10/2010-10/2011	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Forschergruppe: Mikrobielle Biotechnologie/Virologie (Prof. Dr. S.E. Behrens) <i>Thema der Diplomarbeit: Charakterisierung und Anwendung verschiedener BVDV-Chimären</i>
03/2010-10/2010	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Forschergruppe: Mikrobielle Biotechnologie/Virologie (Prof. Dr. S.E. Behrens)
12/2009	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Forschergruppe: Molekulare Mikrobiologie (Prof. Dr. D.H. Nies)

- 02/2009 Praktikum am Institut für Rechtsmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Forschergruppe: Forensische Molekulargenetik (Dr. U.D. Immel)
- 10/2005 Auslandspraktikum am Institut de Ciències del Mar Barcelona, Spanien
- 07/2002 Praktikum am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben

Bildungsweg

- 10/2006-10/2011 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit Abschluss Diplom-Biochemikerin
- 09/2003-07/2006 Ausbildung zur Biologielaborantin am Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften in Borstel
- 1996-2003 Novalis-Gymnasium in Hettstedt mit Abschluss Abitur

Halle (Saale), 11.06.2015

Denise Kreuzmann

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und alle wörtlichen oder sinngemäß übernommenen Textstellen als solche kenntlich gemacht habe. Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar Geldwerte Leistungen für die Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle (Saale), 11.06.2015

Denise Kreuzmann

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich habe nur diesen einen Antrag auf Eröffnung des Promotionsverfahrens eingereicht und kein anderes Promotionsverfahren an einer anderen Universität oder Hochschule im In- und Ausland beantragt bzw. zu laufen.

Halle (Saale), 11.06.2015

Denise Kreuzmann

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen meinen Dank aussprechen, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe, für die fachliche und freundliche Unterstützung und für sein stetes Interesse an meiner Arbeit.

Dr. Kaya Bork danke ich für seine gute Betreuung, seine stete Diskussionsbereitschaft und dem Vertrauen in meine Arbeit.

Dr. Guido Kohla danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der HPLC Analysen sowie für seine fachlichen Anregungen und Ratschläge. Beim gesamten Team von Octapharma in Berlin möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft und freundliche Atmosphäre während meiner Besuche in Berlin bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe Weber für die Bereitstellung der Lyophilisate bedanken. Insbesondere danke ich Frau Medek für Ihre Unterstützung bei der Trocknung unzähliger Proben.

Bei Dr. Hiebl möchte ich mich für seine Hilfsbereitschaft im tierexperimentellen Bereich bedanken.

Der gesamten Arbeitsgruppe Horstkorte danke ich für die gute Stimmung während der Arbeit, für die stete Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit.