

# **Analyse der Polysialylierung von Neuropilin-2 im Harnblasenkarzinom**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Elena Honnef**

aus Linz am Rhein

2022

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Muders
2. Gutachterin: PD Dr. Isabella Syring-Schmandke

Tag der Mündlichen Prüfung: 29.09.2022

Aus dem Institut für Pathologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Glen Kristiansen

*Für Marion*  
(† 14.03.2022)



## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1	Das Harnblasenkarzinom	12
1.1.1	Pathogenese und Klinik des Harnblasenkarzinoms	12
1.1.2	Aktueller Therapiestandard in der Harnblasenkarzinomtherapie	14
1.2	Neuropiline	15
1.2.1	Die Familie der Neuropiline und ihre Liganden	15
1.2.2	Neuropilin-2 und seine Isoformen	16
1.2.3	Die Expression und Rolle von Neuropilin-2 in Karzinomen	18
1.3	Polysialinsäure	20
1.3.1	Aufbau und Funktion von Polysialinsäure	20
1.3.2	Die Synthese von Polysialinsäure	22
1.3.3	Polysialylierung von NCAM1	23
1.3.4	Polysialylierung von Neuropilinen	23
1.3.5	Die Bedeutung von Polysialinsäure in Karzinomen	25
1.4	Fragestellung und Zielsetzung	25
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>26</b>
2.1	Material	26
2.1.1	Zelllinien	26
2.1.2	Reagenzien und Substanzen	27
2.1.3	Puffer und Lösungen	30
2.1.4	Kits	31
2.1.5	Primäre Antikörper	32
2.1.6	Sekundäre Antikörper	33
2.1.7	siRNA	34
2.1.8	Primer	34

2.1.9	Materialien und Hilfsmittel	35
2.1.10	Geräte	36
2.1.11	Software	38
2.2	Methoden	38
2.2.1	Zellkultur	38
2.2.2	RIPA-Lyse	39
2.2.3	BCA-Assay	39
2.2.4	SDS-PAGE	40
2.2.5	Western Blot	41
2.2.6	Immundetektion und Auswertung	42
2.2.7	Immunpräzipitation	42
2.2.8	siRNA-Transfektion	42
2.2.9	RNA-Isolation	44
2.2.10	cDNA-Synthese	44
2.2.11	Quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR)	45
2.2.12	Herstellung einer Positivkontrolle aus Mausgehirn	46
2.2.13	Enzymatische Abspaltung von N-Glykanen durch PNGase F	46
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
3.1	Etablierung von SDS-PAGE und Western Blot	47
3.2	Expression von Neuropilin-2 und Polysialinsäure in Blasenkarzinomzellen	48
3.3	Analyse der Polysialylierung von Neuropilin-2 in Blasenkarzinomzellen	51
3.4	Transfektion und Knockout von Neuropilin-2	53
3.5	Überexpressionszellen	54
3.6	Immunpräzipitation von Neuropilin-2	56
3.7	Untersuchung reifer dendritischer Zellen als Positivkontrolle	57
3.8	Immunhistochemische Untersuchung von Tissue Microarrays	60
3.9	GLG1 als möglicher Polysia-Akzeptor	61

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>68</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang</b>	<b>70</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>78</b>
<b>8.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>94</b>

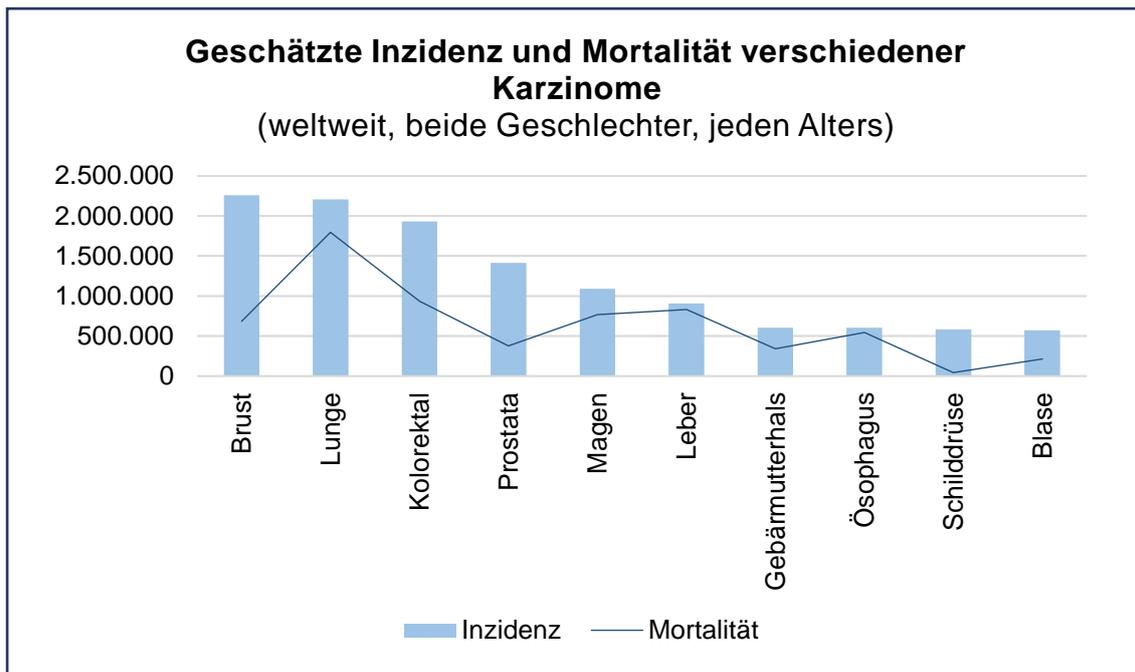
## Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CCL21	C-C-Chemokin-Ligand 21
CCR7	C-C-Chemokinrezeptor 7
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
c-Met	Rezeptor des Hepatozyten-Wachstumsfaktors
Ct	Amplifikationszyklus (cycle treshold)
DC	dendritische Zellen
ddH <sub>2</sub> O	deionisiertes und entmineralisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FGFR3	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 3
GLG1	Golgi Glykoprotein-1
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HA-Tag	Hämagglutinin-Tag
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
IB	Immunoblot
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
mDCs	reife dendritische Zellen
MIBC	muskelinvasives Blasenkarzinom
mRNA	messenger-RNA
NC	Negativkontrolle
NCAM1	Neurales Zelladhäsionsmolekül-1

NEAA	nicht-essenzielle Aminosäuren
NMIBC	nicht-muskelinvasives Blasenkarzinom
NRP	Neuropilin
NTC	No Template Control (Kontrollansatz ohne cDNA)
P/S	Penicillin/ Streptomycin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	Thrombozyten-Wachstumsfaktor
Polysia	Polysialinsäure
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
PST-1	Polysialyltransferase-4 (ST8Sia4)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT-qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RCT	Radiochemotherapie
RNA	Ribonukleinsäure
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	small interfering RNA
sNRP	lösliches Neuropilin
SD	Standardabweichung
STX	Polysialyltransferase-2 (ST8Sia2)
SynCAM1	synaptisches Zelladhäsionsmolekül (CADM1)
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung
TBST	Trisgepufferte Kochsalzlösung mit 0,05 % Tween-20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TURBT	Transurethrale Blasentumorresektion
VEGF	vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren
WB	Western Blot
WCL	Gesamtzell-Lysat

## 1. Einleitung

Blasenkrebs ist eine sehr weit verbreitete Erkrankung, die mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität verbunden ist. Mit durchschnittlich 573.278 neuen Fällen und 212.536 Todesfällen pro Jahr zählt Blasenkrebs als zehnthäufigste Krebsursache (Abb.1) weltweit (Sung et al. 2021).



**Abb. 1:** Inzidenz und Mortalität verschiedener Karzinome. Blasenkrebs gilt als zehnthäufigste Krebsursache weltweit. Eigene Darstellung nach Sung et al., 2021

Trotz großer Fortschritte in Diagnose und Behandlung von Blasenkarzinomen, geht der komplexe und oft sehr heterogene klinische Verlauf der Erkrankung mit einigen Problemen einher. Als große Herausforderung gelten Resistenzen gegen therapeutische Behandlungen, das Wiederauftreten von Tumoren und die Entstehung von Metastasen (Mercurio, 2019). In die Entstehung dieser Tumorentität sind etwa 140 Gene involviert. Von besonderer Bedeutung in Bezug auf das Überleben von Zellen haben sich Neuropiline (NRPs) erwiesen (Niland und Eble, 2019). Neuropiline sind Glykoproteine, die mit zellulären Prozessen wie Angiogenese, Immunität, axonaler Führung und Knochenhomöostase sowie pathologischen Erkrankungen wie Krebs in Verbindung gebracht werden (Roy et al., 2018). Es wurde eine Korrelation zwischen der Expression von NRP auf

Tumorzellen und bösartigen Phänotypen bei Melanomen, Brust-, Prostata-, kolorektalen und Pankreaskarzinomen gezeigt (Dallas et al., 2008). Zudem zeigten Tumore, die mit einer schlechten Patientenprognose assoziiert sind, oft eine Hochregulation der Neuropiline (Gemmill et al., 2017). Zur Familie der Neuropiline gehören im Wesentlichen Neuropilin-1 (NRP1) und Neuropilin-2 (NRP2) (Muders und Baretton, 2015). Während für NRP1 gezeigt wurde, dass es das Krebszellwachstum beeinflusst (Matkar et al., 2018), spielt NRP2 zusätzlich eine wesentliche Rolle in der Therapieresistenz und Metastasierung (Keck et al., 2015). Keck et al. zeigten, dass NRP2 auch in die Progression von Blasenkarzinomen involviert ist. Die NRP2-Expression erwies sich bei Patienten, die mit transurethraler Blasentumorresektion (TURBT) sowie Radiochemotherapie (RCT) behandelt wurden, als prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben und ging mit einem erhöhten Risiko eines frühen krebsspezifischen Todes einher (Keck et al., 2015).

Zu den häufigsten krebssassoziierten Strukturmerkmalen zählt, vor allem bei Blasenkarzinomen, die Veränderung der Glykosylierungsmuster (Azevedo et al., 2017). Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Modulation der zellulären Aktivität, der Differenzierung sowie der Migration (Stamatos et al., 2014) und sind durch die Erhöhung der strukturellen und funktionellen Vielfalt maßgeblich für heterogene Krankheitsverläufe bei Blasenkarzinomen verantwortlich (Mühlenhoff et al., 2013).

Einen besonderen Stellenwert hat hier die Modifizierung mit Polysialinsäure – auch bekannt als Polysialylierung. Polysialinsäure (Polysia) ist ein onkogenes Antigen (Roth et al., 1988) bestehend aus alpha-2,8 N-Acetyl-Sialinsäureresten (Chen et al., 2017). Sie wird durch die beiden Polysialyltransferasen ST8Sia2 und ST8Sia4 an einer sehr begrenzten Anzahl von Proteinen synthetisiert. Neben dem bekanntesten polysialylierten Protein NCAM1, dient auch NRP2 als Ziel der Polysialyltransferasen. Polysia spielt eine signifikante Rolle in der neuronalen Entwicklung und Regeneration, der Zellmigration und dem Immunsystem und dient darüber hinaus als Reservoir für Signalmoleküle (Loers et al., 2016).

Die Expression von Polysia erfolgt altersabhängig mit einer starken Expression in der embryonalen Entwicklung und einer signifikanten Reduktion im adulten Stadium (Angata et al., 2007). In Krebszellen jedoch wird Polysia erneut exprimiert (Falconer et al., 2012) und korreliert mit aggressiven und invasiven Erkrankungen sowie einer schlechten klinischen Prognose (Al-Sarairoh et al., 2013). Erforscht wurde dies beispielsweise bereits

für Lungenkarzinome (Campodónico et al., 2010), das Gliom (Suzuki et al., 2005), das Neuroblastom (Valentiner et al., 2011) sowie für Brustkrebs (Wang et al., 2016).

Zum Zusammenhang zwischen Blasenkarzinomen und Polysialylierung liegen derzeit noch keine Daten vor. Die Untersuchung dieser Modifizierung im Blasenkarzinom ist insbesondere für das Protein NRP2 interessant, welches in hohen Konzentrationen in Blasenkrebszellen nachgewiesen werden konnte (Keck et al., 2015).

Zusammenfassend ist Neuropilin – speziell polysialyliertes Neuropilin ein interessantes Protein bezüglich der Progression, Therapie und Prognose einiger Tumorentitäten. Sowohl seine Wirkungsweise als auch das Potenzial als Biomarker zu dienen, muss dabei weiter untersucht werden.

## 1.1 Das Harnblasenkarzinom

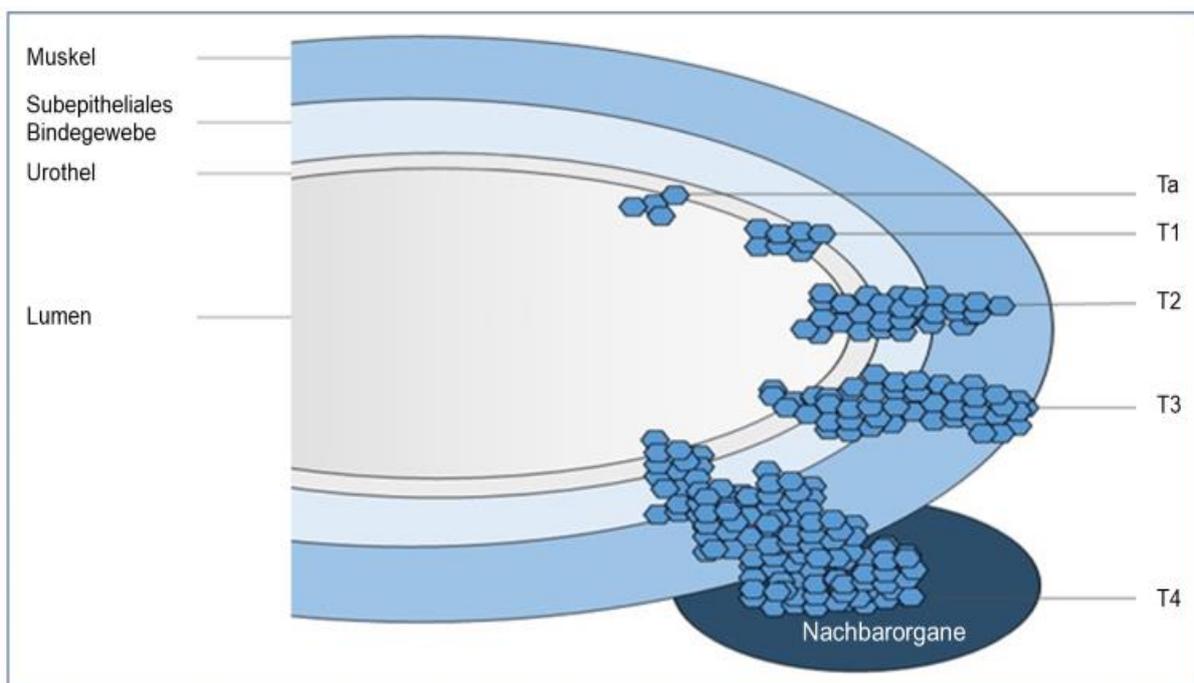
### 1.1.1 Pathogenese und Klinik des Harnblasenkarzinoms

Blasenkrebs ist der häufigste Krebs der Harnwege und tritt bei Männern drei Mal häufiger auf als bei Frauen (Knowles und Hurst, 2015; Siegel et al., 2020).

Als bedeutendster Risikofaktor für das Entstehen eines Blasenkarzinoms gilt das Alter des Patienten, welches zum Zeitpunkt der Diagnose im Durchschnitt 70 Jahre beträgt. Das größte umweltbedingte Risiko geht mit dem Rauchen von Tabak einher. Schätzungsweise stehen mehr als die Hälfte aller Blasenkarzinome und 40 % aller Todesfälle durch Blasenkarzinome im Zusammenhang mit Tabakkonsum (Antoni et al., 2017). Weitere Faktoren sind beispielsweise die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung oder der Missbrauch phenacetinhaltiger Analgetika (Knowles und Hurst, 2015).

In Europa sind mehr als 90 % der Blasenkarzinome Urothelkarzinome. Weitere histologische Typen sind Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome, mikropapilläre, kleinzellige und plasmazytotische Karzinome. Unterschieden werden beim Urothelkarzinom papilläre nicht-muskelinvasive Tumoren (NMIBC), die über eine epitheliale Hyperplasie entstehen und muskelinvasive Blasenkarzinome (MIBC), welche sich aufgrund einer flachen Dysplasie entwickeln (Knowles und Hurst, 2015).

Eine weitere Einteilung, die eine Unterscheidung hinsichtlich Infiltrationstiefe des Primärtumors (T), Lymphknotenbefall (N) und Metastasierung (M) erlaubt, ist die TNM-Klassifikation (Abb. 2). Hier wird die Tumorausdehnung weiter spezifiziert. Papilläre Tumoren des Grades Ta sowie T1-Tumoren, welche zwar die Epithelmembran, doch nicht den Muskel infiltrieren entsprechen den NMIBCs. Muskelinvasive Blasenkarzinome werden weiterhin eingeteilt in die Grade T2 (Invasion bis innerhalb des Muskels), T3 (Invasion durch den Muskel hindurch bis in das perivesikale Fettgewebe), bis hin zu dem Grad T4, der Karzinome beschreibt, welche bereits Nachbarorgane infiltrieren (Knowles und Hurst, 2015).



**Abb. 2:** Infiltrationsgrade von Harnblasenkarzinomen gemäß der TNM-Klassifikation. Die verschiedenen Stadien spezifizieren die Tumorausdehnung. Ta (papilläre Tumoren) und das Stadium T1 entsprechen nicht-muskelinvasiven Tumoren, während die Stadien T2 (Invasion bis in den Muskel), T3 (Invasion durch den Muskel) und T4 (Infiltration von Nachbarorganen und tieferer Strukturen) muskelinvasive Tumoren charakterisieren. Eigene Darstellung modifiziert nach Azevedo et al., 2017

70-80 % der Blasenkarzinome sind zum Zeitpunkt der Diagnose nicht-muskelinvasiv. Zwar haben Patienten mit Tumoren diesen Stadiums eine hohe 5-Jahres-Überlebensrate von 90 % (Zuiverloon et al., 2018), doch treten diese in Form von Rezidiven in 70-80 % der Fälle wieder auf (Shah et al., 2011). 30 % aller NMIBCs entwickeln sich langfristig zu MIBCs, welche eine 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 50 % aufweisen (Zuiverloon et al., 2018) und sich durch genomische Instabilität sowie eine hohe Metastasierungsrate auszeichnen (Kamoun et al., 2020).

Zwar geben bestimmte Biomarker wie eine hyperaktivierende Mutation im Gen, das für FGFR3 kodiert, Hinweise auf die Entstehung sekundärer Malignome, doch ist die Sensitivität in Bezug auf Tumoren kleinen Durchmessers begrenzt. Daher hat die Suche nach neuen Biomarkern in der Therapie und dem Monitoring von Blasenkrebs besondere Priorität (Zuiverloon et al., 2011).

#### 1.1.2 Aktueller Therapiestandard der Harnblasenkarzinomtherapie

Die Erkrankung tritt meist durch eine makroskopische Hämaturie in Erscheinung. Die Sicherung der Diagnose erfolgt anschließend über eine transurethrale Resektion des Tumors (TURBT), die gleichzeitig der Behandlung von nicht-muskelinvasiven Karzinomen dient (Sanli et al., 2017). Unterstützend kann eine Instillation der Blase mit einem Chemotherapeutikum wie Mitomycin C oder mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG) erfolgen, um die Zeit bis zum Wiederauftreten des Malignoms zu verzögern. Höhergradige Tumoren hingegen erfordern aggressivere Behandlungsstrategien. Als Standardtherapie von MIBCs gilt die radikale Zystektomie mit Harnableitung, wobei eine neoadjuvante Chemotherapie den Behandlungserfolg erhöhen kann (Shah et al., 2011). Als blasenschonende Alternative für morbidere Patienten wird häufig auf eine kombinierte TURBT mit Radiochemotherapie zurückgegriffen, mit der bislang bei einigen Patienten vergleichbare onkologische und funktionelle Ergebnisse erzielt werden konnten (Keck et al., 2015).

Nicht-invasive Urintests weisen zwar eine gewisse Spezifität und Sensitivität beim Nachweis von MIBCs auf, NMIBCs bleiben jedoch oft unerkannt. So konnten diese Tests regelmäßige Zystoskopien in der Klinik bisher nicht ersetzen (Knowles und Hurst, 2015).

## 1.2 Neuropiline

### 1.2.1 Die Familie der Neuropiline und ihre Liganden

Neuropiline (NRPs) sind Transmembranglykoproteine und dienen als Corezeptoren ohne intrazelluläre Signaltransduktion nach Ligandenbindung. Sie sind mit zellulären Prozessen wie der Entwicklung des Nervensystems, Axonführung, Angiogenese, Immunität und Knochenhomöostase sowie pathologischen Prozessen wie Krebs assoziiert (Roy et al., 2018).

Man unterscheidet im Wesentlichen NRP1 (circa 120 kDa) und NRP2 (circa 112 kDa), welche auf Aminosäureebene zu 44 % homolog sind und als paraloge Gene auf unterschiedlichen chromosomalen Regionen lokalisiert sind (Bhide et al., 2016). Beide NRPs teilen den gleichen strukturellen Aufbau bestehend aus fünf extrazellulären Domänen. Den zwei CUB-Domänen, auch a1/a2 genannt, die Ähnlichkeiten zu den Komplementbindungs-faktoren C1r und C1s aufweisen, folgen zwei Faktor V/VIII-Domänen, auch b1/b2 genannt, deren Namen auf die Ähnlichkeit zu den jeweiligen Gerinnungsfaktoren zurückzuführen sind. Eine einzelne MAM-Domäne sowie die Transmembrandomäne verbinden den extrazellulären Teil mit einem kurzen zytosolischen Schwanz. Da NRPs keine zytosolische Tyrosinkinase-Domäne aufweisen, bilden sie Corezeptor-Komplexe mit anderen Rezeptoren wie dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren-Rezeptor (VEGF-Rezeptor) oder auch Plexinen und Integrinen, um die Signaltransduktion zu vermitteln (Rollenhagen et al., 2013). Für beide NRPs gibt es eine Vielzahl von Spleißvarianten (Abb. 3). So kodiert das NRP2-Gen unter anderem auch für die beiden Isoformen NRP2a und NRP2b. Die NRP-Isoformen unterscheiden sich in ihrer Transmembrandomäne und der Anzahl von Aminosäuren im zytosolischen Teil, der bei NRP1 44 Aminosäuren und bei NRP2a und NRP2b 42 beziehungsweise 46 Aminosäuren lang ist. Weiterhin gibt es lösliche Varianten von NRP (sNRP1 und sNRP2), die zwar aus a1/a2- sowie der b1/b2-Domäne bestehen, jedoch keine MAM-Domäne besitzen (Niland und Eble, 2019).

Die Isoformen unterscheiden sich nicht nur anhand ihrer Größe. Auch die Bindungskapazitäten erweisen sich für NRP1 und NRP2 unterschiedlich. Beispielsweise binden beide NRPs mit hoher Affinität an Semaphorin 3C, während die Semaphorine 3F und 3G bevorzugt von NRP2 gebunden werden (Giger et al., 2000).

NRP1 und NRP2 finden sich in vielen Geweben. Ihre Verteilung ist jedoch sehr unterschiedlich. Beide NRPs werden auf vaskulären Endothelzellen exprimiert, wo sie Proliferation, Migration und Angiogenese beeinflussen. In lymphatischem Endothel hingegen konnte bislang nur NRP2 festgestellt werden (Curreli et al., 2007).

Neben Endothelzellen und anderen Zellen wie basophilen Granulozyten (Paulis et al., 2006), Keratinozyten oder Muskelzellen, so auch die glatte Muskulatur der Harnblase (Vasquez et al., 2017), zeigen Tumorgewebe eine hohe Expression des Proteins. Für einige Krebsarten wie Gliome, Pankreaskarzinome und Brustkrebs wurde gezeigt, dass NRPs in die Proliferation, das Überleben und die Migration von Krebszellen involviert sind (Prud'homme und Glinka, 2012). Roy et al. zeigten, dass NRP2 in Makrophagen darüber hinaus als molekularer Mediator fungiert, der immunsuppressive und tumorfördernde Gene hochreguliert und so eine entscheidende Rolle in der Tumorförderung spielt (Roy et al., 2018).

Dabei korrespondieren NRPs mit dem pathologischen Stadium und Tumorgrad. So wurde durch Kawakami et al. beschrieben, dass die Koexpression von NRP1 und NRP2 durch die Förderung der Angiogenese zu einer schlechten Prognose beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom führt (Kawakami et al., 2002).

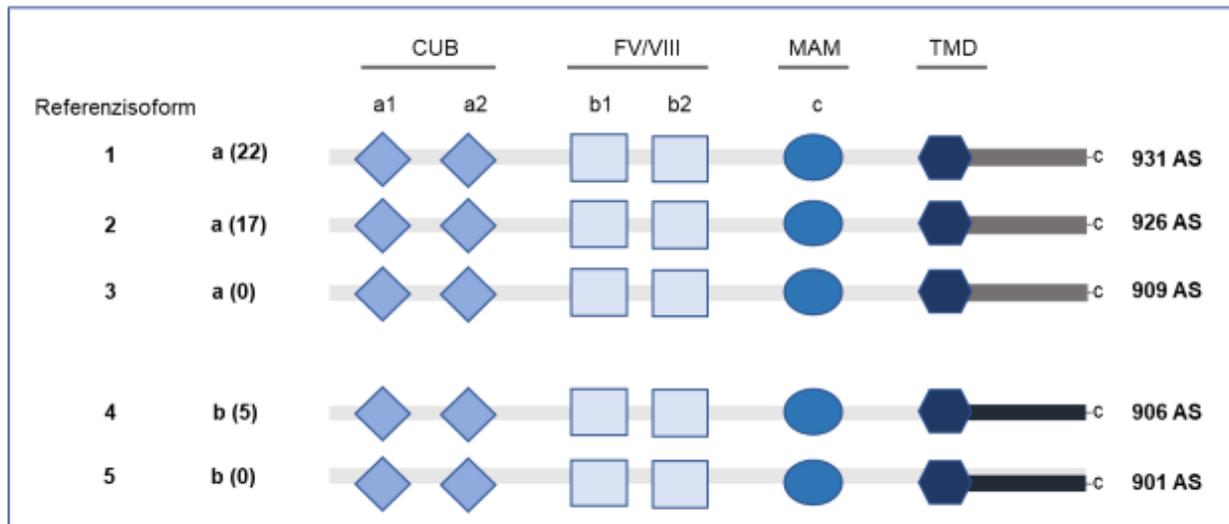
Dass NRPs eine besondere Bedeutung zukommt, zeigen auch Knockout-Experimente. Mäuse, denen NRP1 fehlt, sterben aufgrund von Defekten in der Gefäßentwicklung bereits zwischen dem 10. und 14. Embryonaltag. Ein Knockout von NRP2 hingegen zeigt einen milderen Phänotypen – die Mäuse sind trotz Defekten im lymphatischen System und der Axonführung lebensfähig und fertil (Bhide et al., 2016).

Während sich in der Vergangenheit viele Untersuchungen auf NRP1 stützten, welches durch gesteigerte Zellproliferation nachweislich am Tumorwachstum beteiligt ist (Muders und Baretton, 2015), rückt auch NRP2 immer mehr in den Fokus der Krebsforschung.

### 1.2.2 Neuropilin-2 und seine Isoformen

NRP2 lässt sich aufgrund von Unterschieden in der primären Sequenz der Transmembran-Domäne und des zytosolischen Teils in NRP2a und NRP2b einteilen. Durch eine optionale Insertion von 5, 17 oder 22 Aminosäuren C-terminal zur Aminosäure 808 im membrannahen Teil von NRP2a ergeben sich weitere Varianten, die jedoch bisher

nur zum Teil im Menschen nachgewiesen werden konnten (Abb.3). So wurde NRP2a(5) nur in Mausmodellen beschrieben. Im Falle von NRP2b sind die beiden Formen NRP2b(0) sowie NRP2b(5) bekannt, deren Unterschied eine zusätzliche Insertion der fünf Aminosäuren GENFK (Gly-Glu-Asn-Phe-Lys) bedingt. Durch die Insertion des selbigen Kurzpeptids unterscheidet sich NRP2a (17) von NRP2a (22), was auf einen engen Zusammenhang der beiden Formen NRP2a und NRP2b hindeutet (Rollenhagen et al., 2013).



**Abb. 3:** Die verschiedenen Isoformen von NRP2. Den N-terminalen extrazellulären Teil teilen sich alle Isoformen von NRP2. Unterschieden werden die Isoformen NRP2a und NRP2b anhand ihrer unterschiedlichen C-terminalen Transmembrandomänen und zytoplasmatischen Regionen. Durch eine optionale Insertion von Kurzpeptiden mit einer Länge von 5, 17 oder 22 Aminosäuren (AS) hinter der Aminosäure 808 entstehen weitere Formen von NRP2a beziehungsweise NRP2b. Eigene Darstellung modifiziert nach Rollenhagen et al., 2013

Trotz einer sehr ähnlichen Gesamtstruktur, weisen NRP2a und NRP2b große Unterschiede in den C-terminalen Aminosäuren auf. In der zytoplasmatischen Domäne haben NRP2a und NRP2b lediglich 4 von 43 Aminosäuren gemeinsam, wohingegen NRP2a 54 % Ähnlichkeit zu NRP1 aufweist. Zudem gibt es keine korrespondierende b-Isoform für NRP1, was darauf hindeutet, dass die biologische Funktion von NRP2b einzigartig ist. Auch innerhalb der beiden Isoformen von NRP2 wird ihre unterschiedliche Wirkungsweise anhand der differentiellen Verteilung im Gewebe deutlich. Während die Expression von NRP2a in der Plazenta, der Leber, dem Dünndarm und der Lunge sehr hoch ist, wird NRP2b hier nur gering oder gar nicht exprimiert. Im Skelettmuskel hingegen lässt sich nur

NRP2b nachweisen (Gemmill et al., 2017). Auch in Tumoren lassen sich Unterschiede feststellen. So zeigten Gemmill et al., dass eine erhöhte Expression von NRP2b in Lungenkarzinomen signifikant mit dem Fortschreiten der Krankheit und einer schlechteren Prognose korrelieren. Während NRP2b mit erhöhter Migration und Metastasierung assoziiert ist und ein Knockdown von NRP2b die Anzahl sichtbarer Tumoren reduzierte, wirkt NRP2a hingegen hemmend auf Metastasierung und korreliert mit verstärkter Proliferation und Tumorwachstum (Gemmill et al., 2017).

Aufgrund der Expression von NRPs in vielen verschiedenen Gewebe sowie einer großen Vielfalt an unterschiedlichen Rezeptoren, die mit NRPs interagieren können, sind viele Wirkungsmechanismen der NRPs bislang unerforscht.

### 1.2.3 Die Expression und Rolle von Neuropilin-2 in Karzinomen

Als Rezeptor für VEGF-C und VEGF-D, die als lymphangiogene Faktoren bekannt sind, spielt NRP2 eine Schlüsselrolle bei der tumorassoziierten Lymphangiogenese und lymphatischen Metastasierung (Ni et al., 2018). Durch die Förderung lockerer und dichter Strukturen der Endothelzellverbindungen, wird es Tumorzellen erleichtert, durch die Lymphkapillaren zu entweichen und somit zur Metastasierung beizutragen (Matkar et al., 2018). NRP2 wirkt durch Verstärkung der Reaktionen auf verschiedene Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ 1, den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) und seinen Rezeptor (c-Met), den Thrombozyten-Wachstumsfaktor (PDGF), den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) und Integrine und stellt somit ein wichtiges Protein des Tumorstoffwechsels dar (Keck et al., 2015). Gray et al. zeigten, dass in Mäusen mit Darmkrebs durch die Depletion von NRP2 die Bildung von Tumormetastasen verhindert werden konnte (Gray et al., 2008). Die Bedeutung von NRP2 stellte auch eine Untersuchung von Osteosarkom-Patienten heraus, bei denen die Expression von NRP2 mit der Vaskularisierung und der Prognose korrelierte (Handa et al., 2000).

Neben Prostatakarzinomen, Brustkrebs oder Pankreaskarzinomen, zeichnen sich auch Blasenkarzinome durch eine Expression von NRP2 aus (Mhaweck-Fauceglia et al., 2009). Keck et al. konnten NRPs als prognostische Faktoren für Blasenkarzinome bei einer Behandlung dieser mit Radiochemotherapie (RCT) identifizieren. Es wurde die Tumorzell-Proteinexpression von NRP2 und VEGF-C bei Patienten untersucht, die mit TURBT und RCT behandelt wurden. Die Untersuchungen ergaben, dass eine hohe

Expression von NRP2 die krebsspezifische Überlebenszeit von 166 Monaten auf 86 Monate verkürzte. Die Expression des Proteins korreliert mit einem 3,85-fachen Risiko eines krebsspezifischen Todes (Keck et al., 2015).

Diese Ergebnisse geben Hinweis auf eine gesteigerte Therapieresistenz im Zusammenhang mit NRP2. Die Krebszellen werden durch die Aktivierung antiapoptotischer und autophagischer Signalwege vor chemotherapeutischem Stress geschützt (Stanton et al., 2013b). Autophagie ist ein Überlebensmechanismus, der innerhalb der Zelle durch Ausräumung geschädigter Organellen Energie produziert und somit die Resistenz gegen metabolischen Stress und Nährstoffmangel fördert (Hönscheid et al., 2014). Durch Hemmung der Aktivität des mTor-Komplexes-1 durch NRP2 und VEGF-C kommt es zu einer Aktivierung der Autophagie. Während die Autophagie im frühen Krebsstadium als Tumorsuppressor wirkt, fördert sie in fortgeschrittenen Tumoren die Tumorprogression und hilft metastasierenden Krebszellen ihren hohen Stoffwechselbedarf auch in nährstoffarmer Umgebung zu decken (Stanton et al., 2013a; Stanton et al., 2013b).

Mehrere Studien konnten zeigen, dass ein Targeting von NRP2 eine potenzielle Therapieoption darstellt (Peng et al., 2019; Matkar et al., 2018; Mercurio, 2019; Borchardt et al., 2019). Eine niedrige Expression in erwachsenen gesunden Geweben steht einer erhöhten Expression in Tumorgewebe gegenüber, wodurch in Mausmodellen nur geringe Nebenwirkungen dokumentiert wurden (Goel und Mercurio, 2013). Eine Blockade der Funktion durch spezifische NRP1- und NRP2-Antikörper führte in den Mäusen zu einem Rückgang des Tumorwachstums (Goel et al., 2013).

Mercurio et al. zeigten ebenfalls die hemmende Wirkung von NRPs in der Tumorinitiierung und Resistenz gegenüber Therapien auf. Durch die in der Krebstherapie eingesetzte VEGF-Therapie wird die Bindung von VEGF an Rezeptor-Tyrosinkinasen, nicht aber an NRPs blockiert, was die teils eingeschränkte Wirksamkeit erklären könnte und zudem den potenziellen Nutzen einer direkten Ausrichtung auf NRPs als Behandlungsansatz unterstreicht (Mercurio, 2019).

## 1.3 Polysialinsäure

### 1.3.1 Aufbau und Funktion von Polysialinsäure

Die Glykosylierung gilt als eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen und findet beim Menschen an mehr als 50 % der Proteine statt (Sato und Kitajima, 2020). Veränderungen in der Glykosylierung von Zelloberflächenproteinen modulieren die zelluläre Aktivität und erhöhen die strukturelle und funktionelle Vielfalt (Stamatos et al., 2014). Je nach Zelltyp, Entwicklungs- und zellulärem Stoffwechselzustand variieren die Glykosylierungsmuster (Mühlenhoff et al., 2013).

Eine einzigartige Form der Glykosylierung ist die Polysialylierung. Polysialinsäure (Polysia) ist ein lineares Glykan, das als posttranslationale Modifikation dient und aus acht bis zu über 400 alpha-2,8 verknüpften N-acetylneuraminsäureresten besteht (Zhu et al., 2015). Es ist ein großes raumerfüllendes Zelloberflächenglykoprotein, das durch sterische Effekte Zell-Zell-Interaktionen modulieren kann (Zhu et al., 2015) und eine Größe von bis zu 260 kDa erreicht (Wu et al., 2018). Polysia-Ketten mit mehr als 90 Sialinsäureresten bilden Polyanionen mit hoher Wasserbindungsfähigkeit, wodurch die Zellmotilität und axonale Wegfindung aufgrund der antiadhäsiven Funktion gefördert wird (Saini et al., 2016). Durch Erhöhung der synaptischen Plastizität hat es sich als wesentlich für die Regeneration von Nerven (Loers et al., 2014) wie beispielsweise nach Rückenmarksverletzungen bei Ratten erwiesen (Zhang et al., 2007).

Kürzlich wurde gezeigt, dass polysialyliertes NCAM1 durch Reaktivierung der visuellen kortikalen Plastizität zu einer eingeschränkten Wiederherstellung des Sehvermögens blinder Mäuse beitragen kann und somit ein Ziel für die Behandlung kortikal bedingter Sehstörungen darstellt (Luke et al., 2020). Darüber hinaus ist es an Prozessen wie Lernen und Gedächtnis, zirkadianen Rhythmen, Emotionen und sozialen Interaktionen beteiligt (Sato et al., 2016). Eine Dysregulation von Polysia wird mit psychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenie oder Autismus in Verbindung gebracht (Pshezhetsky und Ashmarina, 2018), was die Relevanz von Polysia im Zusammenhang mit einer angemessenen Gehirnentwicklung unterstreicht. Zudem konnte für Polysia die Fähigkeit nachgewiesen werden, als Reservoir für biologisch aktive Moleküle wie Neutrophine, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren zu dienen (Mori et al., 2017).

In Bezug auf das Immunsystem ist bekannt, dass Polysia bei bestimmten Zelltypen Einfluss auf Migration, Phagozytose, Antigenpräsentation und Zellkontakte besitzt (Schellenburg et al., 2017). Der für die Beseitigung von Krankheitserregern wichtige Prozess der Phagozytose wird durch Polysia negativ moduliert. So führt die Entfernung von Polysia aus Peritonealmakrophagen zu einer gesteigerten Phagozytose und somit einer erhöhten bakteriellen Clearance. Der Grad der Polysialylierung wird in Immunzellen bei einer Entzündungsreaktion dynamisch reguliert. Während eines frühen Stadiums der Immunantwort wird die Expression von Polysia in Monozyten herunterreguliert und erst später in differenzierten von Monozyten abgeleiteten Zellen wieder exprimiert (Stamatos et al., 2014).

Grundsätzlich beschränkt sich die Modifikation mit Polysia auf eine sehr begrenzte Anzahl von Proteinen. Das bekannteste polysialylierte Protein ist das neuronale Zelladhäsionsmolekül-1 (NCAM1) (Finne et al., 1983), welches perinatal zu 95 % polysialyliert vorliegt (Chen et al., 2017). Weitere Proteine, die Polysia tragen können, sind das synaptische Zelladhäsionsmolekül SynCAM1 (Galuska et al., 2010), der C-C-Chemokinrezeptor 7 (CCR7) (Kiermaier et al., 2016), die alpha-Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals im Zitteraal (James und Agnew, 1987), das Golgi Glykoprotein-1 (GLG1) (Werneburg et al., 2016) und der CD-36 Scavenger-Rezeptor der Muttermilch (Yabe et al., 2003) sowie die Polysialyltransferasen selbst, die zur Autopolysialylierung fähig sind (Mühlenhoff 1996; Bhide et al., 2018). Zuletzt konnten Currelli et al. in reifen dendritischen Zellen NRP2 als weiteren Polysia-Akzeptor identifizieren (Currelli et al., 2007).

Die Expression von Polysia erfolgt altersabhängig. In der Entwicklung der Maus tritt sie an Tag 9 erstmalig auf und bleibt während der embryonalen und neuronalen Entwicklung hoch exprimiert. Nach der ersten postnatalen Woche sinkt sie auf ein Drittel der Expression im Vergleich zur Geburt. Es folgt ein weiterer Rückgang bis auf ein Zehntel im Erwachsenenalter (Chen et al., 2017). Beim Menschen ist diese Abnahme von Polysia geringer als bei der Maus und die Expression bleibt noch bis zum 13. Lebensjahr bestehen. Mit Beginn der Adoleszenz sinkt die Plastizität und ebenso die Expression von Polysia (Sato und Kitajima, 2020). Im erwachsenen Nervensystem beschränkt sie sich auf Regionen neuronaler Plastizität wie etwa das olfaktorische System oder den Hippocampus (Loers et al., 2016).

### 1.3.2 Die Synthese von Polysialinsäure

Die Synthese von Polysia erfolgt durch zwei golgi-lokalisierte Polysialyltransferasen ST8Sia2 und ST8Sia4 (Bhide et al., 2016) auch bekannt als STX und PST-1, die in 59 % ihrer Aminosäuresequenz übereinstimmen (Rollenhagen et al., 2013). Von insgesamt sechs Sialyltransferasen sind diese die einzigen, die in Mensch und Maus Polysia mit einem Polymerisationsgrad von über 8 Resten synthetisieren können (Mehrabian et al., 2016). Während der Embryogenese und bei Neugeborenen werden sowohl ST8Sia2 als auch ST8Sia4 stark exprimiert. Im adulten Gehirn hingegen ist ST8Sia4 vorherrschend, wobei sich die Expression beider Enzyme überschneidet und der Knockout einzelner Transferasen nicht zu einem Gesamtverlust von Polysia führt (Angata et al., 2007). So kann der Verlust von ST8Sia2 in den ersten postnatalen Tagen vollständig durch ST8Sia4 kompensiert werden. Langfristig jedoch weisen ST8Sia2-defiziente Mäuse neurologische Entwicklungsdefekte auf, die sich in einer veränderten Topologie hippocampaler Moosfaserverprojektionen manifestieren und mit einem gestörten Angstverhalten (Angata et al., 2004b) in Verbindung gebracht werden. Ein Knockout von ST8Sia4 führt im Gegensatz dazu zu einer Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität ohne erkennbare morphologische Defekte (Eckhardt et al., 2000). Die entscheidende Rolle von Polysia wird dadurch deutlich, dass eine Ablation beider Transferasen bei Mäusen zu schweren Mängeln in der Topologie des Vorderhirns sowie einem verfrühten Tod führt (Weinhold et al., 2005; Angata und Fukuda, 2010).

Beide Transferasen arbeiten sehr spezifisch. Die Synthese von Polysia an NCAM1 kann durch beide Transferasen erfolgen. SynCAM1 hingegen wird ausschließlich durch ST8Sia2 polysialyliert (Werneburg et al., 2015), während NRP2 auf die Polysialylierung durch ST8Sia4 angewiesen ist (Rollenhagen et al., 2013).

Der Nachweis, dass ein Knockdown der Transferasen Veränderung in der Verbreitung von Tumorzellen herbeiführt, zeigt, dass die Transferasen mögliche therapeutische Angriffspunkte darstellen, um die Invasion und Metastasierung von Tumoren zu hemmen (Falconer et al., 2012).

### 1.3.3 Polysialylierung von NCAM1

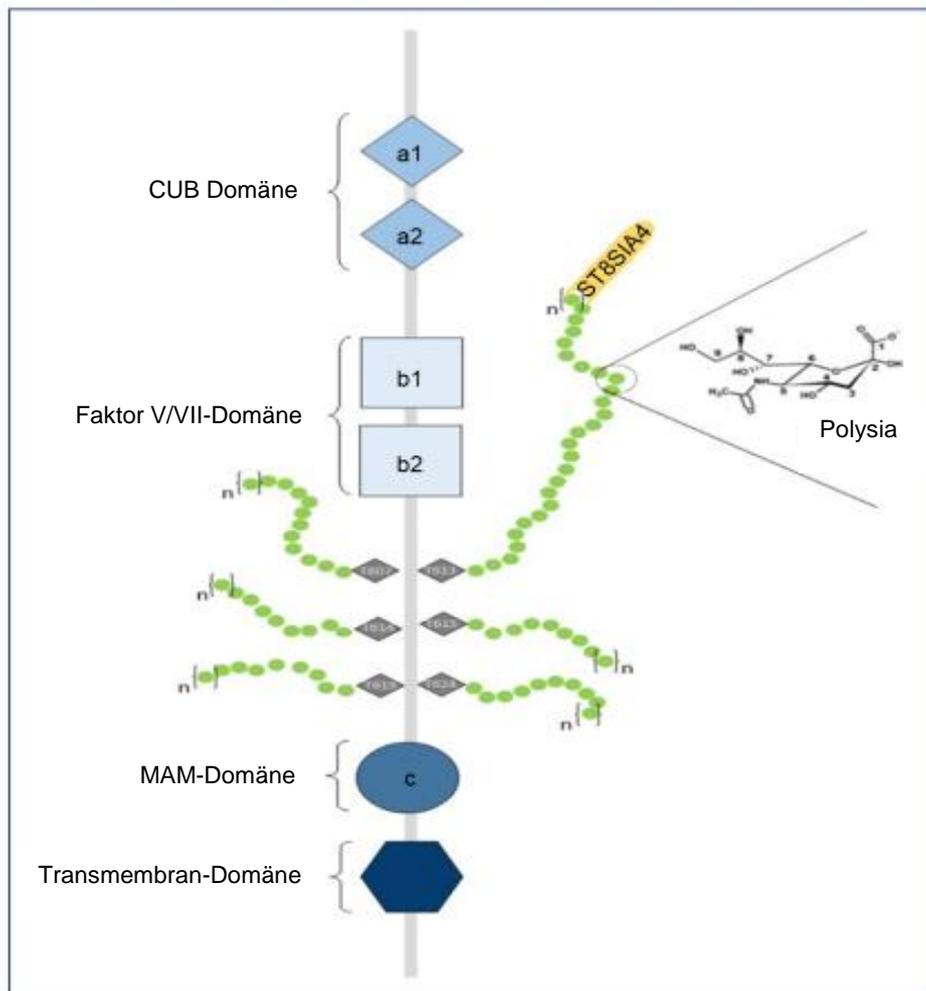
Seit 1982 erstmalig  $\alpha$ 2,8-verknüpfte Polysia am neuronalen Zelladhäsionsmolekül-1 (NCAM1) entdeckt wurde (Finne, 1982), gilt dieses Protein als das häufigste und am besten untersuchte polysialylierte Protein.

Die Polysialylierung von NCAM1 ist bei Wirbeltieren hauptsächlich auf Hirngewebe beschränkt und in der embryonalen Entwicklung von großer Bedeutung. Auch hier ist eine Reduktion der Polysialylierung im erwachsenen Gehirn sowie eine begrenzte Expression in Regionen synaptischer Plastizität, wie Riechkolben und Hippocampus zu beobachten (Angata et al., 2004a). Im Gegensatz zu NRP2 ist NCAM1 N-polysialyliert (Kudo et al., 1996).

Tanaka et al. fanden heraus, dass nicht kleinzellige Lungenkarzinome, die zwar Polysia doch kein NCAM1 exprimieren, aggressiver und metastasierter sind, als solche mit polysialyliertem NCAM1, wodurch man sich auf die Suche nach weiteren polysialylierten Substraten machte (Tanaka et al., 2000).

### 1.3.4 Polysialylierung von Neuropilinen

NRP2 wird durch die Polysialyltransferase ST8Sia4 sowohl in seiner membranassoziierten als auch in der löslichen Form O-polysialyliert. Als Akzeptorstelle für die Polysialylierung dient die O-Glykan-haltige Linker-Region zwischen der b2-Domäne und der c-Domäne (Abb. 4). Von circa 150 möglichen Glykosylierungsstellen haben sich sechs Threoninreste als wesentliche Verbindungsstellen für Polysia an NRP2 herausgestellt (Rollenhagen et al., 2013).



**Abb. 4:** NRP2: Aufbau und Polysialylierung. Polysialylierung findet zwischen der b2- und der c-Domäne statt. Dabei haben sich sechs Threoninreste als häufigste Polysialylierungsstellen erwiesen (graue Rauten). Eigene Darstellung modifiziert nach Schellenburg et al., 2017 und Bhide und Colley, 2017

Im Gegensatz dazu wird NRP1 nur zu einem geringen Teil polysialyliert und muss dazu in seiner membrangebundenen Form vorliegen (Bhide et al., 2016). Bislang konnte polysialyliertes NRP im Menschen ausschließlich an Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen (DCs) nachgewiesen werden. Es wirkt positiv auf die T-Zell-Aktivierung, indem es die Chemotaxis zu C-C-Chemokin-Ligand 21 (CCL21) hin verstärkt, welches dann vermehrt an den C-C-Chemokinrezeptor 7 (CCR7) präsentiert und somit die gezielte Migration von dendritischen Zellen in den Lymphknoten unterstützt (Rey-Gallardo et al., 2010). Der damit verbundene Reifungsprozess der dendritischen Zellen geht mit einer verstärkten Expression von ST8Sia4 und einer folglich Hochregulation von Polysia einher (Mühlenhoff et al., 2013).

### 1.3.5 Die Bedeutung von Polysialinsäure in Karzinomen

Bemerkenswert ist, dass es in Tumorzellen wie Brust- (Wang et al., 2016), Lungen-, Magen-, oder Darmkrebszellen zu einer erneuten Hochregulation von Polysia kommt (Wu et al., 2018), welche aufgrund ihrer antiadhäsiven Eigenschaften und ihrem Einfluss auf die Signalwirkung die Bildung von Metastasen positiv beeinflussen (Colley et al., 2014) und die Expression von Polysia somit mit aggressiven und invasiven Erkrankungen mit schlechter klinischer Prognose korreliert (Al-Saraireh et al., 2013). Daniel et al. zeigten, dass Lungenmetastasen, die durch injizierte Rhabdomyosarkomzellen in Mäusen hervorgerufen werden, durch die Abspaltung von Polysia verringert werden können (Daniel et al., 2001). Dabei gilt NCAM1 als Hauptträgerprotein von Polysia in Krebszellen und wird in der polysialylierten Form aufgrund der stark invasiven und proliferativen Eigenschaften als diagnostischer Marker für Neuroblastome, Glioblastome, Lungenkarzinome sowie Hypophysentumore verwendet (Sato und Kitajima, 2020). Wie Cox et al. anhand von Untersuchungen zu polysialyliertem NCAM1 zeigen konnten, bietet Polysia neben seiner diagnostischen Funktion auch das Potenzial, als mögliches Ziel einer Antikörper-basierten Krebstherapie zu fungieren (Cox et al., 2019).

### 1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Fragestellung, ob polysialyliertes NRP2 einen pro-tumorigenen Einfluss im Blasenkarzinom hat. Um diese Frage zu beantworten, ist Ziel dieser Dissertation die Expression von NRP2 und Polysia in acht Blasenkarzinomzelllinien zu überprüfen und in weiteren Versuchen nach NRP2 in der polysialylierten Form zu untersuchen. Neben zellbasierten Experimenten wird abschließend eine immunhistochemische Untersuchung von Gewebeproben in Form von Tissue Microarrays ausgewertet und somit geklärt, ob weitere Untersuchungen zu polysialyliertem NRP2 einen Beitrag zur Erschaffung neuer Ansätze in Prävention und Therapie des Harnblasenkarzinoms leisten können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

**Tab. 1:** Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Firma/ bereitgestellt durch
J32 P80 10NK	NRP2-Knockout-Zelllinie; enthält die kodierende Region von NRP2a, exprimiert diese jedoch nicht Ursprung: RT112	Dr. Thomas Mayr, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn
J32 P80 16E	Zelllinie mit Überexpression von NRP2a, Ursprung: RT112	Dr. Thomas Mayr, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn
J32 P80 23E	Zelllinie mit Überexpression von NRP2bGSS, Ursprung: RT112	Dr. Thomas Mayr, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn
J82	Übergangszellkarzinom, Blase	American Type Culture Collection
RT112	Übergangszellkarzinom, Blase	Dr. Thomas Mayr, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn
RT112/84	Übergangszellkarzinom, Blase	Dr. Philipp Erben, Institut für Urologie, Universität Mannheim
RT4	Übergangszellpapillom	Dr. Philipp Erben, Institut für Urologie, Universität Mannheim

SCaBER	Plattenepithelkarzinom, Blase	Dr. Philipp Erben, Institut für Urologie, Universität Mannheim
T24/83	Übergangszellkarzinom, Blase	Dr. Philipp Erben, Institut für Urologie, Universität Mannheim
U251MG	Astrozytom, Gehirn	Prof. Dr. Torsten Pietsch, Institut für Neuropathologie, Universität Bonn
UMUC3	Übergangszellkarzinom, Blase	Dr. Philipp Erben, Institut für Urologie, Universität Mannheim
UROtsa	Immortalisiertes gesun- des Urothel	Dr. Philipp Erben, Institut für Urologie, Universität Mannheim

### 2.1.2 Reagenzien und Substanzen

**Tab. 2:** Verwendete Reagenzien und Substanzen

Reagenz	Hersteller
2-Mercaptoethanol >99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
5x siRNA Buffer	Dharmacon/Horizon Discovery, LaFayette, USA
Albumin Fraktion V, Blotting grade	NeoFroxx GmbH, Einhausen, DE
Albumin Standard	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS) 98 % extra pure	Acros Organics, New Jersey, USA
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Dharmafect 1 Transfection Reagent	Dharmacon/Horizon Discovery, LaFayette, USA
Dharmafect 2 Transfection Reagent	Dharmacon/Horizon Discovery, LaFayette, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem/ Labomedic, Barcelona, ES

DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
dNTP Mix (10 mM each)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Essigsäure 100 % Ph.Eur., reinst.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Fetal Bovine Serum (FBS)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Formaldehyde solution 4 % buffered, pH 6.9	Merck KGaA, Darmstadt, DE
G418 Sulfate, 20 ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycin Blotting Grade >99 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Halt Protease and Phosphatase Inhibitor (100X)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Isopropanol	Acros Organics, New Jersey, USA
Laemmli SDS Sample Buffer, reducing (6X)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
McCoy's 5A (modified) medium	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
MEM Alpha (1x) Minimum Essential Medium	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Methanol	Acros Organics, New Jersey, USA
Milchpulver Blotting Grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumhydroxid	VWR International, Darmstadt, DE
OPTI-MEM® (1x)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

PageRuler™ Unstained Protein Ladder	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
PBS (phosphate buffered saline), pH 7.4 (1X)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Penicillin/Streptomycin (P/S) (10.000 U/ml)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Pierce RIPA Buffer	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Poly-L-Lysine solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ponceau S	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Protein A/G PLUS-Agarose	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Random Hexamer Primer	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Reaction Buffer, 5x	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Resolving Gel buffer (1.5 M Tris-HCl buffer pH 6.8)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
RevertAid H Minus Reverse Transcriptase	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
RevertAid Premium Reverse Transcriptase (200 U/μl)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/μl)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
RNase Away	Molecular BioProducts Inc, San Diego, USA
RNase free water	Qiagen, Hilden, DE
Rotiphorese® Acrylamid/Bis-Lösung 30 (29:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Salzsäure 20 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
SDS - Solution 20 % pure	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Sodium Pyruvate	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

Stacking gel Buffer, 1 L	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
SuperSignal™ Western Blot Enhancer	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
TBS, 10X, pH 7.4	VWR International, Darmstadt, DE
TBS, 10X, pH 7.4	Chemometec, Allerod, DK
TEMED	VWR International, Darmstadt, DE
ThermoClean® DC	Bioanalytic GmbH, Waldmatten, DE
Tris Base Ultrapure	Biomol, Hamburg, DE
TRIS-buffered saline (TBS 10x)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin-EDTA, 10X	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Tween-20	NeoFroxx GmbH, Einhausen, DE
Via1-Cassette	Chemometec, Allerod, DK
Wasserbadstabilisator ThermoClean DC	Labomedic, Bonn, DE
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

**Tab. 3:** Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Auftragspuffer	90 % Laemmli Sample Buffer + 10 % 2-Mercaptoethanol
Laufpuffer 10x	0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 1 % SDS
Laufpuffer 1x	1:10 Verdünnung des 10x Laufpuffers
Milchpulver-TBS, 5 %	5 % Magermilchpulver in 1x TBS
Ponceau S	5 % Essigsäure (96 %), 0,2 % Ponceau S
Stripping-Puffer	0,2 M Glycin, 0,5 M NaCl (pH 2,8)
Suspensionspuffer	1x cOmplete Protease Inhibitor gelöst in 2 ml aqua bidest. – 400 µl dieser Lösung + 9,6 ml PBS + 10 µl Triton

TBS 1x	1:10 Verdünnung des 10x TBS
TBS-T	0,05 % Tween-20 in 1x TBS
Transferpuffer 10x	390 mM Glycin, 480 mM Tris Base, 0,375 % SDS
Transferpuffer 1x + 20 % Methanol	1:10 Verdünnung des 10x Transferpuffer + 20 % Methanol
Tris-HCl 0,5 M	Tris/HCl 0,5 M pH 6,8
Tris-HCl 1,5 M	Tris/HCl 1,5 M pH 8,8

#### 2.1.4 Kits

**Tab. 4:** Verwendete Kits

Kit	Firma
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
PNGase F	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
RNA-free DNase I Kit	Qiagen, Hilden, DE
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE

## 2.1.5 Primäre Antikörper

**Tab. 5:** Verwendete Primäre Antikörper

Antikörper	Firma	Verdünnung	Verwendung
Anti-beta Actin antibody (AC15) Maus mAb	Abcam #ab6276	1:20.000 in Milchpulver-TBS	WB
Anti-NCAM ab clone 123C3 Maus mAb	aus Hybridomzellen, von Dr. Simone Diestel, (Universität Bonn)	1:2.000 in Milchpulver-TBS	WB
Anti-Neuropilin 2 Ziege pAb	r&d systems #AF2215	WB: 1:400 in Milchpulver-TBS	WB, ICH
anti-Polysialic acid clone 735 Maus mAb	absolute antibody #ab00240-23.0	WB: 1:1.000 in Milchpulver-TBS IP: 10 µg	WB, IP, ICH
CD68 mAb (PG-M1)	Dako (Agilent) #M0876	1:100	ICH
HA-Tag (C29F4) Kaninchen mAb	Cell Signaling Technology #3724	1:1000 in BSA-TBS	WB
Kaninchen mAb (DA1E) IgG XP®	Cell Signaling Technology #3900	Menge korrespondierend zu IP	IP
Neuropilin-2 (D39A5) XP Kaninchen mAb	Cell Signaling Technology #3366	1:1000 in BSA-TBS	WB
Normal mouse IgG2a	Santa Cruz #sc-3878	Menge korrespondierend zu IP	IP

Normal mouse IgG2b	Santa Cruz #sc-3879	Menge korrespondierend zu IP	IP
NRP-2 (C-9) Maus mAb	Santa Cruz #sc-13117	IP: 4µg	IP

### 2.1.6 Sekundäre Antikörper

**Tab. 6:** Verwendete Sekundäre Antikörper

Antikörper	Firma	Verdünnung	Verwendung
anti-mouse IgG H&L (HRP) Ziege pAb	Abcam #ab6789	1:10.000	WB
anti-goat IgG (H+L), HRP Ziege pAb	ThermoFisher Scientific #A16005	1:1000	WB
anti-mouse IgM Ziege pAb	Thermo Fisher Scientific #31440	1:5000	WB
Anti-Rabbit Immuno- globulins, HRP Schwein pAb	Dako/Agilent #P039901-2	1:5000	WB

## 2.1.7 siRNA

**Tab. 7:** Verwendete siRNAs

siRNA	Sequenz	Firma
ON-TARGETplus human NRP2 (8828) #L-017721-00-0010	GUGCGGAG- GUCGUUUGAAU, GUUAGAAUC- CGCCCUCAGA, CAACACAGG- GAGCGAUUC, CAACAACGAUGCAA- CUGAG	Dharmacon, LaFayette, USA
ON-TARGETplus Non-targeting Pool #D-001810-10-20	UGGUUACAUGUCGA- CUAA, UGGUUUACAU- GUUGUGUGA, UG- GUUUACAU- GUUUUCUGA, UG- GUUUACAUGUUUUC- CUA	Dharmacon, LaFayette, USA

## 2.1.8 Primer

**Tab. 8:** Verwendete Primer

Primer	Firma	Spezifizierung
NCAM1-1990 FW	Eurofins	GACCAGGTG- GAGCCATACTC
NCAM1-1990 RV	Eurofins	TTACGGCGTACGTTGTT- TCG
NRP2total FW	Eurofins	ACCAGAACTGCGAGTG- GATT
NRP2total RV	Eurofins	CGATGTT- CCCACAGTGTTTG

PPIA FW1	Eurofins	GCTGGAC- CCAACACAAATGG
PPIA RV1	Eurofins	GGCCTCCACAATATTCAT- GCCT
ST8SIA2 FW2	Eurofins	TCCTGAAGCACCACGT- CAAC
ST8SIA2 RV2	Eurofins	CGTGTGGCCAGGG- TATACAT
ST8SIA4 FW2	Eurofins	TCATT- CGAAAGGCTGGCTCT
ST8SIA4 RV2	Eurofins	TGCTCTTGACCACT- GACACAT

### 2.1.9 Materialien und Hilfsmittel

**Tab. 9:** Verwendete Materialien und Hilfsmittel

Hilfsmittel	Hersteller
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, DE
96-well PCR-Platte	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Adhesive PCR Plate Seals	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Filterpapier Whatman Chromatography paper	Whatman, GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Glasplatten & Gel-Gusshilfe	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Hamilton-Spritze	Hamilton, Reno, USA
Kryo-Röhrchen	neoLab, Heidelberg, DE
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Inc, Neenah, USA
Pasteurpipetten	Labomedic, Bonn, DE
PCR sealing film	Labomedic, Bonn, DE
Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, DE

Pipettenspitzen mit Filter	Nerbe plus GmbH, Winsen, DE
Pipettenspitzen ohne Filter	Greiner Bio-One, Kremismünster, AT
PVDF-Membran 0,2 µm	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Sterile 0,2 ml nuklease-freie Reaktionsgefäße	Biozym, Oldendorf, DE
Zellkultur-Flaschen (T-25, T-75, T-175 cm <sup>2</sup> )	VWR International, Darmstadt, DE
Zellkultur-Platten 100 mm	VWR International, Darmstadt, DE
Zellkultur-Platten 6-well	VWR International, Darmstadt, DE
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zentrifugen-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Kremismünster, AT

#### 2.1.10 Geräte

**Tab. 10:** Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloß, DE
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Bulle, CH
Gefrierschrank -80 °C	Panasonic, Kadoma, JP
Imager Fusion Solo 7S	Vilber Lourmat, Eberhardzell, DE
Inkubator Zellkultur	Panasonic, Kadoma, JP
Inkubator, Heraeus Oven	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, CH
Magnetrührer RSM-01HS	Phoenix Instruments, Garbsen, DE
Mikroskop CKX41	Olympus, Tokio, JP
Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Mini-Zentrifuge Fast Gene NG002R	Nippon Genetics, Düren, DE

Nanophotometer N60	Implen, München, DE
Nukleocounter NC-200	Chemometec, Allerød, DK
pH-Meter PCE-228	PCE Instruments, Hampshire UK
Pipettierhilfe accu-jet	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE
Platform Shaker RS-RR10	Phoenix Instruments, Garbsen, DE
Power Supply PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Präzisionswaage Entris	Sartorius, Göttingen, DE
Roller Shaker RS-TR 10	Phoenix Instruments, Garbsen, DE
Rotator mixer Biosan Multi Bio	Peqlab Biotechnologies, Erlangen, DE
SpectraMax iD3 Multiplatten-Reader	Molecular Devices, San José, USA
Taqman® PCR 7500 fast System	Applied Biosystems, Waltham, USA
Thermocycler Biometra Trio	Analytik Jena, Jena, DE
ThermoMixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, DE
Trans-Blot® SD Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules USA
Vakuumpumpe	Welch Vacuum, Fürstfeldbruck, DE
Vortex-Laborrührer RS-VA10	Phoenix Instruments, Garbsen, DE
Wärmeschrank Heraeus series 6000	Heraeus Instruments, Hanau, DE
Wasserbad	Memmert GmbH & Co KG, Schwabach, DE
Zellkulturbank Mars Safety Class 2 Scanlaf	Labogene, Lyngø, DK
Zentrifuge Legend Micro 21R	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Sigma 1-14K	Sigma, Osterode, DE
Zentrifuge Sigma 1-16K	Sigma, Osterode, DE
Zentrifuge Sigma 2-16KL	Sigma, Osterode, DE
Zentrifuge Sigma 2-7	Sigma, Osterode, DE

## 2.1.11 Software

**Tab. 11:** Verwendete Software

Software	Firma/Programmierer
7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Waltham, USA
Evolution Capt.	Vilber Lourmat, Eberhardzell, DE
Microsoft Office 2016	Microsoft Corp., Redmond, USA

## 2.2 Methoden

## 2.2.1 Zellkultur

**Tab. 12:** Zusammensetzung der Reagenzien für die Zellkultur

Medium	Zusammensetzung	Zelllinien
DMEM-Komplettmedium	DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S	RT112/84, U251MG, UMUC3
Mc Coy's 5A-Komplettmedium	Mc Coy's + 10 % FBS + 1 % P/S	RT4, T24/83
MEM-alpha Komplettmedium	MEM-alpha + 10 % FBS +1 % P/S + 1 % Natri- umpyruvat + 1 % NEAA	J82, SCaBER
MEM-alpha Medium + G418	MEM-alpha + 10 % FBS + 1 % Natriumpyruvat + 1 % P/S + 0,1 % G418	J32 P80 10NK, J32 P80 23E, J32 P80 16E
RPMI-Komplettmedium	RPMI + 10 % FBS + 1 % P/S	RT112
Kryomedium zur Langzeitlagerung bei -80 °C	80 % des entsprechen- den Komplettmediums, 10 % FBS, 10 % DMSO	

Die Zelllinien wurden regelmäßig negativ auf Mykoplasmenkontamination getestet. Eine Authentifizierung wurde bei Multiplex human cell authentication test in Auftrag gegeben und war positiv. Die Kultivierung erfolgte jeweils bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO<sub>2</sub>. Nach spätestens 72 Stunden wurde ein Medienwechsel durchgeführt. Bei einer Konfluenz von 80-90 % erfolgte das Passagieren. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2x Trypsin/EDTA versetzt. Trypsin/EDTA bewirkt den Entzug von Magnesium- und Kalziumionen sowie eine Spaltung der Oberflächenproteine, wodurch es zu einer Ablösung der adhärent wachsenden Zellen kommt. Zur Beschleunigung des Vorgangs erfolgte eine kurze Inkubation von 2 bis 5 Minuten bei 37 °C. Anschließend wurde die Reaktion mit Komplettmedium gestoppt und die Zellen 4 Minuten bei 200 xg zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet erneut resuspendiert.

Zur Langzeitlagerung wurde das Zellpellet in Kryomedium (80 % Komplettmedium, 10 % FBS, 10 % DMSO) suspendiert und anschließend in Kryoröhrchen bei -80 °C eingefroren. Zum Auftauen wurden die Röhrchen im Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut, in Komplettmedium suspendiert und dann 4 Minuten bei 200 xg zentrifugiert bevor sie in frischem 5 ml Komplettmedium suspendiert und in einer T25-Zellkulturflasche bei 37 °C kultiviert wurden.

### 2.2.2 RIPA-Lyse

Zur Lyse erfolgten alle Schritte auf Eis. Die Zellen wurden zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen. RIPA-Lysepuffer wurde zusammen mit Halt Protease- und Phosphatase-Inhibitor zu den Zellen gegeben (400 µl pro T75-Flasche, 300 µl auf eine 10 mm-Zellkulturplatte und 100 µl pro well einer 6-well-Platte), die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit folgte eine Zentrifugation von 15 Minuten bei 20.000 xg und 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß gegeben und bei -20 °C gelagert oder weiterverwendet.

### 2.2.3 BCA-Assay

Das BCA-Assay dient der Bestimmung der totalen Proteinkonzentration in einer Probe im Vergleich zu einem Proteinstandard. Es wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit verwendet. Im ersten Schritt wurde eine Standardreihe mit bovinem Serumalbumin und autoklaviertem bidestilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) hergestellt.

**Tab. 13:** Konzentrationen der Standardreihe zur Bestimmung mittels BCA-Assay

A	B	C	D	E	F	G
0 mg/ml	0,06 mg/ml	0,125 mg/ml	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml

Es erfolgte eine zehnfache Verdünnung der Probe mit autoklaviertem bidestilliertem Wasser und je 10 µl des Standards und der Probe wurden in Triplikaten auf eine 96-well-Platte pipettiert. Danach wurden Reagenz A und B des Kits 1:50 gemischt und je 200 µl pro well auf die Platte gegeben. Diese wurde für 30 Minuten bei 37 °C in einem Inkubator gelagert und anschließend bei 562 nm mit dem SpectraMax iD3 Multiplatten-Reader ausgelesen.

#### 2.2.4 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen hinsichtlich ihrer molekularen Masse. Dabei wurde nach dem Prinzip der diskontinuierlichen SDS-PAGE nach Laemmli gearbeitet, indem man ein großporiges Sammelgel sowie ein kleinporiges Trenngel verwendet. Durch diese Methode können wesentlich schärfere Banden erzeugt werden.

**Tab. 14:** Zusammensetzung der Gele für SDS-PAGE [ml]

	Trenngel (8 %)
Aqua bidest.	9,3
Acrylamid (30 %)	5,3
Tris-HCl, pH 8,8	5
SDS 10 %	0,2
APS 10 %	0,2
TEMED	0,12

	Sammelgel (6 %)
Aqua bidest.	4,1
Acrylamid (30 %)	1
Tris-HCl pH 6,8	0,75
SDS 10 %	0,06
APS 10 %	0,06
TEMED	0,006

Für die Gelelektrophorese wurden 8 %-Gele mit einer Dicke von 1 mm oder 1,5 mm verwendet. Zum Gießen des Sammelgels wurden alle Lösungen zusammengegeben und zuletzt TEMED hinzugefügt. Das Gel wurde mit Isopropanol überschichtet und 30 Minuten auspolymerisiert. Im zweiten Schritt wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel gegossen und der Kamm eingesetzt, bevor eine weitere 30-minütige Inkubationszeit folgte. Die gewünschten Proteinmengen wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf das gleiche Volumen gebracht und 6x Auftragspuffer hinzugegeben. Nachfolgend wurden die Zellen bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt und kurz zentrifugiert.

Verschiedene Proteinleiter zwischen 250 kDa und 10 kDa dienten als Referenz. Die Gelelektrophorese lief in SDS-Laufpuffer. Nach den ersten 15 Minuten wurde die Spannung von 100 V auf 200 V erhöht.

#### 2.2.5 Western Blot

Mittels Western Blot erfolgte eine Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran). Dazu wurde das Gel für 10 Minuten in Transferpuffer gelagert, während die PVDF-Membran in Methanol aktiviert wurde. Das Blotting wurde für 90 Minuten bei 1 mA/cm<sup>2</sup> pro Membran durchgeführt. Anschließend wurde die Membran für weitere 5 Minuten in Methanol für die darauffolgende reversible Ponceau-Färbung vorbereitet, die zur Kontrolle der Effizienz des Proteintransfers dient. Nun erfolgte das Schneiden der Membran und ein Entfärben mit TBS-T.

Eine Stunde lang wurde die Membran in 5 %-Milchpulver-TBS blockiert und dann über Nacht bei 4 °C in primärem Antikörper verdünnt je nach Antikörper in 5 %-Milchpulver oder Albumin in einem 50 ml-Gefäß rotierend inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch bindender Antikörper, wurde die Membran drei Mal 10 Minuten in TBS-T gewaschen und dann in sekundärem Antikörper verdünnt in 5 %-Milchpulverlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur rotierend inkubiert. Nachfolgend wurde die Membran drei Mal 10 Minuten in TBS-T und ein Mal 10 Minuten in TBS gewaschen.

Um eine bereits antikörperhaltige Membran erneut mit einem anderen Erstantikörper zu untersuchen, wurde diese gestrippt. Dazu wurde die Membran im ersten Schritt zwei Mal zehn Minuten in TBS-T gewaschen, um die Chemilumineszenz-Lösung abzuwaschen. Es folgte eine zehnminütige Inkubation in Stripping-Puffer und anschließend zwei Waschschritte in TBS-T, bevor die Membran ein wiederholtes Mal für eine Stunde in Milchpulver-

TBS blockiert wurde. Dieses Vorgehen löst den vorherigen Antikörper vollständig ab und ermöglicht eine erneute Inkubation in einem alternativen Erstantikörper.

#### 2.2.6 Immundetektion und Auswertung

Zur Immundetektion starker Signale wurde das Pierce™ ECL Western Blotting Substrate verwendet. Schwache Signale ließen sich mit SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate detektieren. Die Reagenzien wurden 1:1 gemischt und 500 µl pro Membran aufgetragen. Die Detektion des Signals erfolgte über Chemilumineszenz mittels des Geräts Fusion Solo 7S (Vilber Lourmat) und der Software Evolution Capt.

#### 2.2.7 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation dient der Isolierung und Konzentrierung eines speziellen Proteins in einer Lösung. Dazu wurde 100-500 µg eines Lysats mit 1-10 µg Primärantikörper für eine Stunde bei 4 °C rotierend inkubiert. Zur Kontrolle wurde eine weitere Probe mit der gleichen Menge eines Kontrollantikörpers inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte eine Inkubation mit Protein A/G PLUS-Agarose Beads bei 4 °C rotierend über Nacht. Am nächsten Tag wurde das Lysat für 5 Minuten bei 4 °C und 1.000 xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Beads am Boden des Gefäßes wurden mit 500 µl RIPA-Puffer gewaschen. Diese Schritte wurden drei Mal wiederholt. Abschließend wurden die Beads mit 30 µl 2x Auftragspuffer gemischt und für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Zuletzt wurde die Lösung für eine Minute bei 14.000 xg zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Analyse der gesamten Probe mittels SDS-PAGE und Western Blot. Zur Positivkontrolle wurden 10 % der Menge als unbehandelte Probe ebenfalls auf das Gel geladen. Um auch schwächerer Signale sicher detektieren zu können, wurden die Membranen häufig oberhalb von 55 kDa geschnitten, um eine Störung starker Antikörpersignale bei längerer Belichtungszeit auszuschließen.

#### 2.2.8 siRNA-Transfektion

Diese Methode erlaubt den Knockdown oder die Depletion eines spezifischen Targets durch Binden der small interfering RNA (siRNA) an die messenger RNA (mRNA), wodurch dieses Gen nicht mehr exprimiert werden kann.

**Tab. 15:** Zellzahlen und Volumina für die siRNA-Transfektion

		J82	RT112	RT112/84	SCaBER
6-well- Platte	Zellzahl	$3 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$3 \times 10^5$
	siNRP2	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l
	+ serumfreies Medium	+ 196 $\mu$ l			
10 mm Schale	Dharmafect-1	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
	+ serumfreies Medium	+ 195 $\mu$ l			
	Zellzahl	$1,7 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$
10 mm Schale	siNRP2	16 $\mu$ l	16 $\mu$ l	16 $\mu$ l	16 $\mu$ l
	+ serumfreies Medium	+ 3.136 $\mu$ l			
	Dharmafect-1	80 $\mu$ l	80 $\mu$ l	80 $\mu$ l	80 $\mu$ l
+ serumfreies Medium	+ 3.120 $\mu$ l	+ 3.120 $\mu$ l	+ 3.120 $\mu$ l	+ 3.120 $\mu$ l	

Die Zellzahl wurde mittels Nucleocounter bestimmt und die Zellen wurden in antibiotikafreiem Medium in der jeweilig bestimmten Anzahl ausgesät. Die Transfektion erfolgte 24 Stunden später mittels Dharmafect 1. Dazu wurden siRNA und Dharmafect in serum- und antibiotikafreiem Medium verdünnt und 5 Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Lösungen 1:1 gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen erfolgte ein Medienwechsel mit antibiotikafreiem Medium, sodass sich ein abschließendes Gesamtvolumen inklusive Transfektionsreagenz von 8 ml für 10 mm-Zellkulturschalen und 2 ml für das well einer 6-well-Platte ergab. Dieses wurde tropfenweise hinzugegeben. Es folgte eine 48-stündige Inkubationszeit bevor die Zellen weiter

analysiert wurden. Die endgültige Konzentration von siRNA betrug 10 nM. Zur Kontrolle wurden ebenfalls unbehandelte Zellen in antibiotikafreiem Medium kultiviert sowie Zellen mit einer unspezifischen Non-Target-siRNA analog behandelt.

#### 2.2.9 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mittels RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit. Im ersten Schritt wurden die Zellen auf Eis mit kaltem PBS zwei Mal gewaschen. Mit 350 µl RLT-Puffer (mit 0,1 % 2-Mercaptoethanol versetzt) und einem Zellschaber wurden die Zellen abgelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, in das anschließend 350 µl Ethanol unter mehrfachem Auf- und Abpipettieren hinzugefügt wurde. Die Probe wurde nun in eine Säule des RNeasy<sup>®</sup> Mini Kits gegeben und für 30 Sekunden bei 10.000 xg zentrifugiert. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der Durchfluss verworfen. Es wurde nun mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. 10 µl DNase I (RNase-frei) wurden mit 70 µl RDD-Puffer gemischt, auf die Mitte der Membran gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die an die Membran der Säule gebundene RNA wurde nun mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde zwei Mal 500 µl RPE-Puffer hinzugegeben und 30 Sekunden beziehungsweise 2 Minuten lang zentrifugiert. Mit 30 µl RNA-freiem Wasser wurde die RNA in ein neues 1,5 ml-Gefäß eluiert. Danach wurde die Konzentration der RNA spektrophotometrisch bestimmt.

#### 2.2.10 cDNA-Synthese

Für die Transkription von RNA in cDNA wurde pro Probe und Gen ein Mastermix hergestellt aus 4 µl Reaktionspuffer, 0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl), 1 µl Random Hexamer Primer (100 µM), 2 µl dNTP-Mix (jeweils 1 µ), 1 µl RevertAid H Minus Reverse Transkriptase (200 U/µl) und 0,5 µl nuklease-freiem Wasser hergestellt. 1 µg RNA wurde mit nuklease-freiem Wasser auf 11 µl verdünnt, mit dem Mastermix gemischt und kurz zentrifugiert. Die cDNA-Synthese erfolgte nun im Thermocycler für 10 Minuten bei 25 °C, 60 Minuten bei 42 °C und 10 Minuten bei 70 °C. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C.

### 2.2.11 Quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR)

Für die RT-qPCR wurde die cDNA 1:20 mit nuklease-freiem Wasser verdünnt. Je 2 µl (5 ng/µl) der verdünnten cDNA wurden mit 8 µl eines Mastermix aus 5 µl Maxima SYBR Green Mix, 0,25 µl Forward Primer (10 µM), 0,25 µl Reverse Primer (10 µM) und 2,5 µl nuklease-freiem Wasser pro well einer 96-well-Platte pipettiert.

Als Ladekontrolle diente das Referenzgen Peptidylprolylisomerase A (PPIA, Haushaltsgen). Die Zyklustemperaturen sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

**Tab. 16:** Zyklusabläufe der RT-qPCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
1	50 C°	2 min	1
2	95 C°	10 min	1
3	95 C° 63 C° 60 C°	15 s 2 s 1 min	40
4	95 C° 60 C° 95 C°	15 s 1 min 30 s	1 1 % Anstieg
5	60 C°	15 s	

Die RT-qPCR wurde auf dem Taqman® PCR 7500 fast System (Applied Biosystems/ThermoFisher Scientific) durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software 7500 Real-Time PCR System von Applied Biosystems. Unter der Verwendung von Excel wurde die mRNA-Expression folgendermaßen berechnet:

$$\Delta Ct_{\text{Probe}} = Ct_{\text{Analyt}} - Ct_{\text{Haushaltsgen}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Probe}} - \Delta Ct_{\text{Referenz}}$$

$$\text{relative mRNA-Expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

### 2.2.12 Herstellung einer Positivkontrolle aus Mausgehirn

Zur Herstellung der Positivkontrolle für Polysia wurde uns das Gehirn einer adulten Wildtyp-Maus freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Kato zur Verfügung gestellt. Aufgrund einer postnatal vergleichsweise hohen Expression von Polysia in Thalamus, Hippocampus und Riechkolben, wurden diese Bereiche entnommen, mittels Trockeneis eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Im nächsten Schritt wurde ein Suspensionspuffer hergestellt. Mit Hilfe von Isopropanol und Trockeneis wurde ein handelsüblicher Granitmörser 30 Minuten lang gekühlt bevor die gefrorenen Teile des Gehirns gemörsert wurden. Anschließend erfolgte eine Homogenisierung der Masse mit 500 µl des Suspensionspuffers in einem 1,5 ml-Gefäß mit einer nachfolgenden Zentrifugation für 15 Minuten bei 10.000 xg. Der Überstand wurde bei -80 °C eingefroren und mittels Western Blot weiter untersucht.

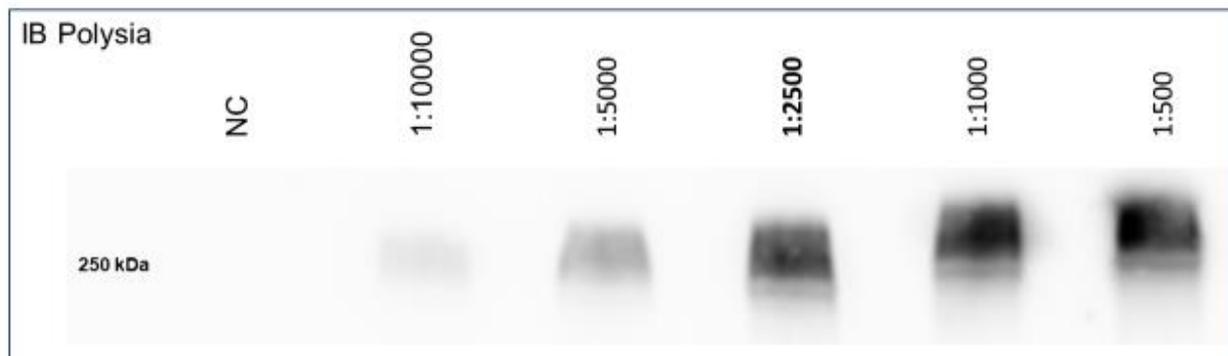
### 2.2.13 Enzymatische Abspaltung von N-Glykanen durch PNGase F

Um zu überprüfen, ob Polysia an N- oder O-Glykanen gebunden ist, wurde eine enzymatische Abspaltung mit PNGase F gemäß Hersteller-Protokoll durchgeführt. Dazu wurden 20 µg der Probe mit 1 µl Denaturierungspuffer versetzt, mit bidestilliertem Wasser auf ein Volumen von 10 µl gebracht und anschließend für 10 Minuten auf 100 °C erhitzt, bevor es für 10 Sekunden gekühlt zentrifugiert wurde. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl Glycospuffer 2 (10x), 2 µl 10 % NP-40, 6 µl ddH<sub>2</sub>O sowie 1 µl PNGase F. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde die Probe mittels Western Blot analysiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung von SDS-PAGE und Western Blot

Aufgrund der erstmaligen Anwendung der Methode des Western Blots im Rudolf-Becker-Labor am Universitätsklinikum Bonn galt es zunächst bekannte Standardprotokolle zu vergleichen und zu erproben, um eine gesicherte Grundlage für die weitere Forschung zu garantieren. Neben Experimenten zur RIPA-Lyse, wurden verschiedene Vorgehensweisen von SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Der Fokus der Etablierung lag auf der Bestimmung geeigneter Antikörper und deren Konzentrationen. So wurden sowohl Erst- als auch Zweitantikörper in unterschiedlichen Konzentrationen ausgetestet und eine unspezifische Bindung durch Negativkontrollen ausgeschlossen. Aufgrund der vergleichsweise geringen Expression von Polysia wurde eine starke Positivkontrolle benötigt. Da Polysia in großen Mengen im Gehirn, vor allem jedoch in Thalamus, Hippocampus und Riechkolben exprimiert wird, erfolgte die Herstellung eines Lysats dieser Strukturen, mit Hilfe dessen eine geeignete Konzentration des Antikörpers gegen Polysia festgestellt werden konnte.

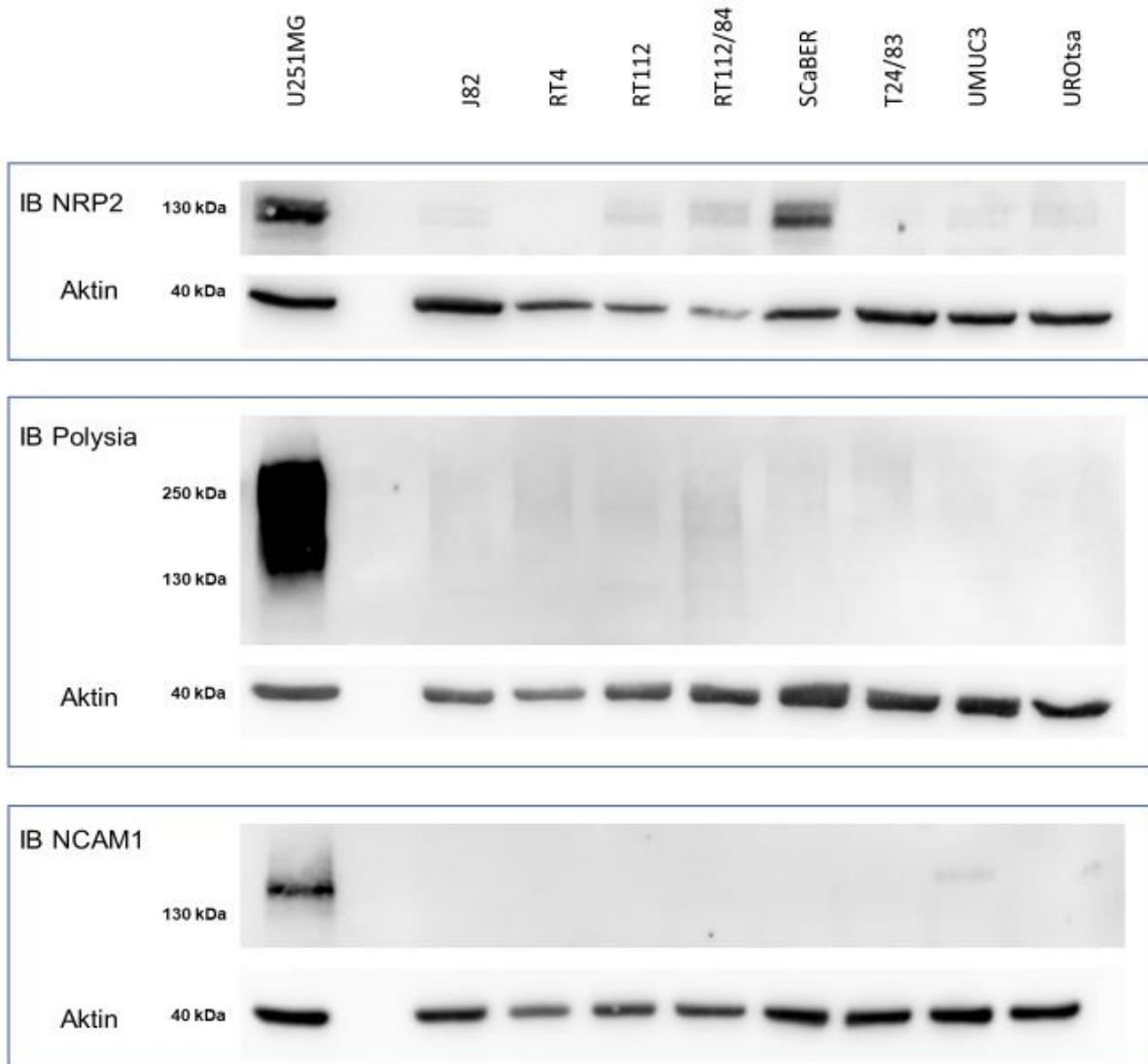


**Abb. 5:** Etablierung des Antikörpers anti-Polysialic acid clone 735. Für die Etablierung des Polysia-Antikörpers wurden Teile des Gehirns einer adulten Wildtyp-Maus entnommen, ein Lysat hergestellt und anschließend mittels Western Blot untersucht. Der Anti-Polysia-Antikörper wurde in verschiedenen Konzentrationen in Milchpulver-TBS ange-setzt. Im Rahmen der Negativkontrolle (NC) erfolgte eine Inkubation in Milchpulver-TBS ohne Erstantikörper. Als Zweitantikörper diente goat anti-mouse IgG H&L-HRP (siehe Anhang 1).

Um sicherzustellen, dass auch geringere Mengen Polysia zuverlässig detektiert werden, wurde eine Konzentration von 1:2.500 für weitere Experimente ausgewählt (Abb. 5). Alle Antikörper wurden zunächst in verschiedenen Zelllinien getestet, wobei sich die Zelllinie U251MG als weitere Positivkontrolle für sowohl Polysia als auch für NRP2 und NCAM1 herausstellte. Aufgrund der praktikablen Anwendung ersetzte U251MG als Positivkontrolle für Polysia somit das Lysat aus dem Gehirn der Maus für weitere Versuche.

### 3.2 Expression von Neuropilin-2 und Polysialinsäure in Blasenkarzinomzellen

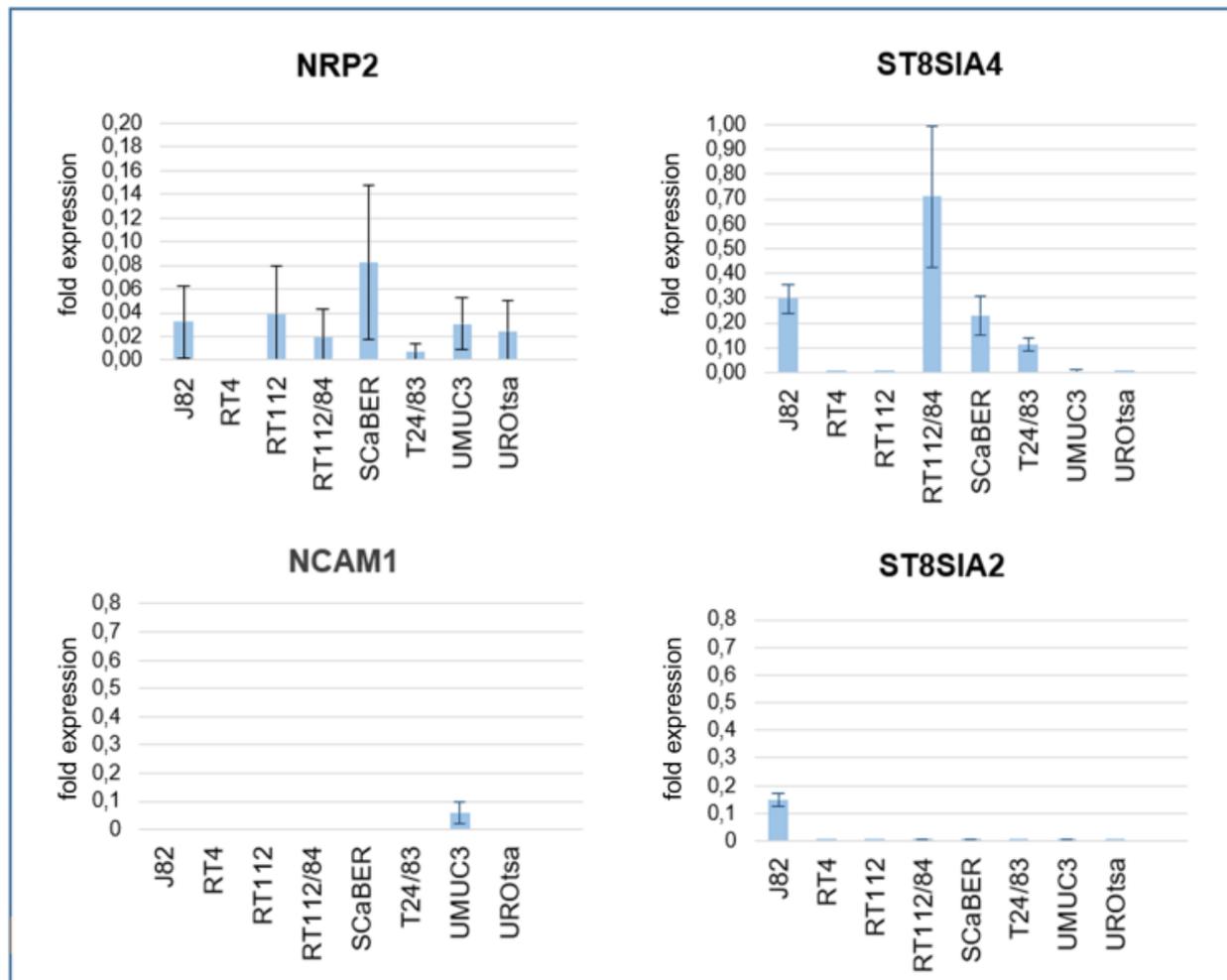
Im nächsten Schritt wurden ausgewählte Zelllinien, darunter die Blasenkrebszelllinien J82, RT4, RT112, RT112/84, SCaBER, T24/83 und UMUC-3 sowie die Zelllinie gesunden Urothels UROtsa, auf die Expression von NRP2 (Anti-NRP 2, r&d systems), NCAM1 (Anti-NCAM 123C3) und Polysia (anti-Polysialic acid clone 735) untersucht (Abb. 6). In der Auswertung des Western Blots zeigt sich eine unterschiedlich hohe Expression von NRP2 innerhalb des Zellpanels. Insbesondere die Zelllinie SCaBER zeichnet sich durch die höchste Expression aus, während sich für RT4 und T24/83 kein Signal im Western Blot detektieren lässt. Da NCAM1 weitaus häufiger polysialyliert vorliegt als NRP2, wurden die Zellen ebenfalls daraufhin charakterisiert. Hier lässt sich neben der Positivkontrolle lediglich für die Zelllinie UMUC-3 eine Expression nachweisen. Die Detektion von Polysia zeigt einen charakteristischen Schleier zwischen ca. 130 kDa und 300 kDa, jedoch war das Signal sehr schwach und variierte in den verschiedenen Wiederholungen, sodass die Expression den jeweiligen Zelllinien nicht eindeutig zugeordnet werden kann.



**Abb. 6:** Expression von NRP2, Polysia und NCAM1 in ausgewählten Blasenkarzinomzellen sowie UROtsa (gesundes Urothel). Als Positivkontrolle dient jeweils die Zelllinie U251MG. NRP2 wird in einigen Zelllinien exprimiert, während NCAM1 lediglich in UMUC-3 nachgewiesen wird. Polysia lässt sich in sehr geringen Mengen detektieren – eine Expression kann den Zelllinien nicht eindeutig zugeordnet werden (siehe Anhang 2). n=4

Zur Verifizierung erfolgte daher im nächsten Schritt eine Untersuchung auf NRP2, die beiden Transferasen ST8Sia2 und ST8Sia4 sowie NCAM1 auf RNA-Ebene mittels RT-qPCR (Abb. 7). Während für ST8Sia4 eine hohe Expression in einigen Zelllinien, besonders jedoch in RT112/84 nachweisbar ist, beschränkt sich die Expression der Transferase ST8Sia2 auf die Zelllinie J82. Die Auswertung der Expression von NCAM1 und NRP2 stützt die Ergebnisse aus dem Western Blot (Abb. 6). Als relevante Zelllinien für

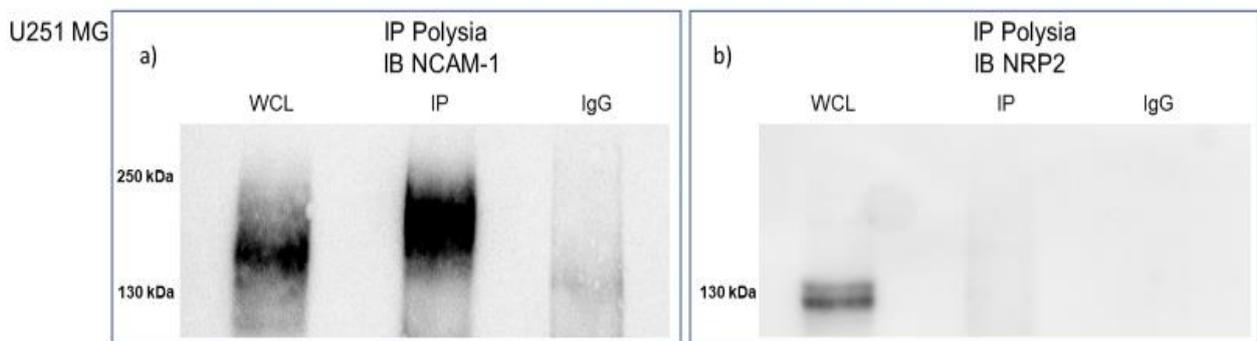
die weitere Untersuchung stellten sich neben der NRP2-exprimierenden Linie SCaBER auch J82 aufgrund der Expression beider Transferasen heraus. Eine weitere beachtenswerte Zelllinie ist RT112/84 aufgrund einer hohen Expression der Transferase ST8Sia4 sowie zu Vergleichszwecken die Parental-Zelllinie RT112, die sich hinsichtlich der Expression dieser Transferase stark unterscheidet.



**Abb. 7:** Relative mRNA-Expression der Blasenkarzinomzelllinien und UROtsa mit Analyse der Expression von NRP2, NCAM1 sowie der Transferasen ST8Sia2 und ST8Sia4 mittels RT-qPCR. Zur leichteren Vergleichbarkeit wurden die Expression von NRP2, Polysia und der Polysialyltransferasen zunächst auf das Housekeeping-Gen PPIA normalisiert und anschließend ins Verhältnis gesetzt zur Referenzprobe U251MG (nicht gezeigt). Die Auswertung erfolgte gemäß der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  der Standardabweichung (SD) aus drei unabhängigen Versuchen ( $n=3$ ). Die Ergebnisse für NRP2 und NCAM1 decken sich mit den Resultaten aus dem Western Blot.

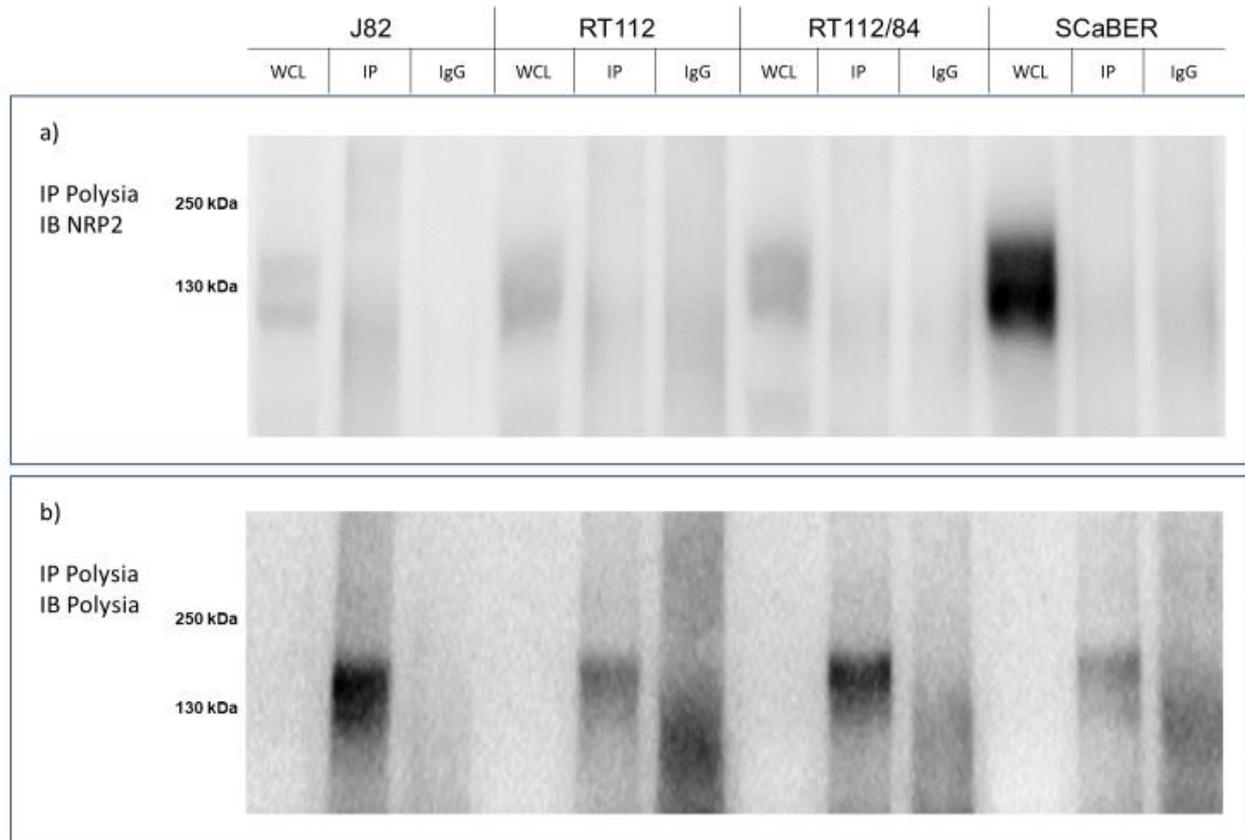
### 3.3 Analyse der Polysialylierung von Neuropilin-2 in Blasenkarzinomzellen

Um die ausgewählten Zelllinien auf eine Polysialylierung an NRP2 zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt eine Immunpräzipitation (IP) durchgeführt. Zuvor wurden in verschiedenen Experimenten die Bedeutung frischer im Vergleich zu bereits gefrorenen Lysaten herausgestellt und anhand einer IP von NCAM1 verschiedene Mengen von Protein A/G PLUS-Agarose Beads getestet. Da die Lysate komplexe Gemische sind und Proteine, Nucleinsäuren, Kohlenhydrate und Lipide enthalten, kann es bei der Verwendung von Agarosebeads zu unspezifischen Bindungen kommen. Aufgrund dessen musste geprüft werden, ob ein zusätzlicher Vorreinigungsschritt (Prclearing) notwendig ist. Dazu wurde die Probe zunächst mit Beads ohne Antikörper inkubiert und diese anschließend verworfen, bevor das Lysat im Rahmen der Immunpräzipitation analysiert wurde. Dabei zeigte sich, dass durch eine zusätzliche Vorreinigung kein positiver Effekt erzielt werden konnte. Etabliert wurde die Methode mit der Positivkontrolle U251MG. Nach einer Immunpräzipitation mit 10 µg anti-Polysia-Antikörper (anti-Polysialic acid clone 735) und einer Isotyp-Kontrolle (normal mouse IgG2a), ließ sich eine Anreicherung von an NCAM1 gebundener Polysia erreichen (Abb. 8a). Die IgG-Kontrolle war nicht vollständig negativ und zeigte leichte unspezifische Banden. Wie erwartet findet die Polysialylierung in dieser Zelllinie an NCAM1 statt – polysialyliertes NRP2 konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 8b).



**Abb. 8:** Immunpräzipitation von Polysia in U251MG. Etablierung der IP mit Hilfe des Antikörpers anti-Polysialic acid clone 735: Die Anreicherung von Polysia ist erfolgreich, lässt sich allerdings in U251MG nur NCAM1-gebunden (a) und nicht in Form von polysialyliertem NRP2 nachweisen (b). Als Isotyp-Kontrolle dient normal mouse IgG2a. Das Gesamtzell-lysat (WCL) entspricht 10 % der Proteinmenge in der IP (siehe Anhang 3).

Nachdem gezeigt wurde, dass eine Anreicherung von Polysia grundsätzlich mit der Methode möglich ist, fand im nächsten Schritt die Untersuchung der vier bereits zuvor ausgewählten Blasenkarzinomzelllinien statt (Abb. 9).

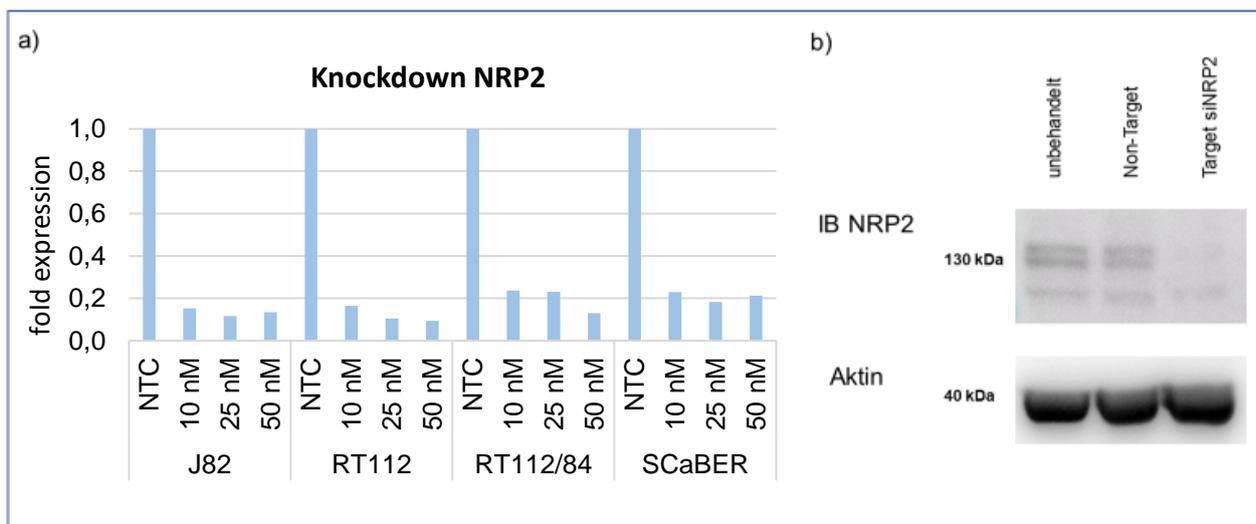


**Abb. 9:** Immunpräzipitation von Polysia in den vier zuvor ausgewählten Blasenkarzinomzelllinien mit anschließender Detektion von NRP2 (a). Es sind unspezifische Signale in IP und IgG-Kontrolle erkennbar. Zur Kontrolle der erfolgreichen Anreicherung wurde selbige Membran gestrippt und Polysia detektiert (b) (siehe Anhang 4). n=3

Die Zelllinie SCaBER zeichnet sich durch die höchste Expression von NRP2 im Lysat (whole cell lysate, WCL) aus. Leichte Banden sind sowohl in der IP als auch in der IgG-Kontrolle erkennbar und somit als unspezifisch zu werten. Trotz hoher Expression lässt sich kein polysialyliertes NRP2 mittels Immunpräzipitation nachweisen (Abb. 9a). Zur Sicherstellung der Methode wurde nach Stripping ebenfalls ein Immunoblot auf Polysia durchgeführt (Abb. 9b). Der Erfolg des Strippings wird daran ersichtlich, dass das Signal von NRP2 vollständig verschwindet. Deutliche Banden der IP bestätigen eine Anreicherung von Polysia.

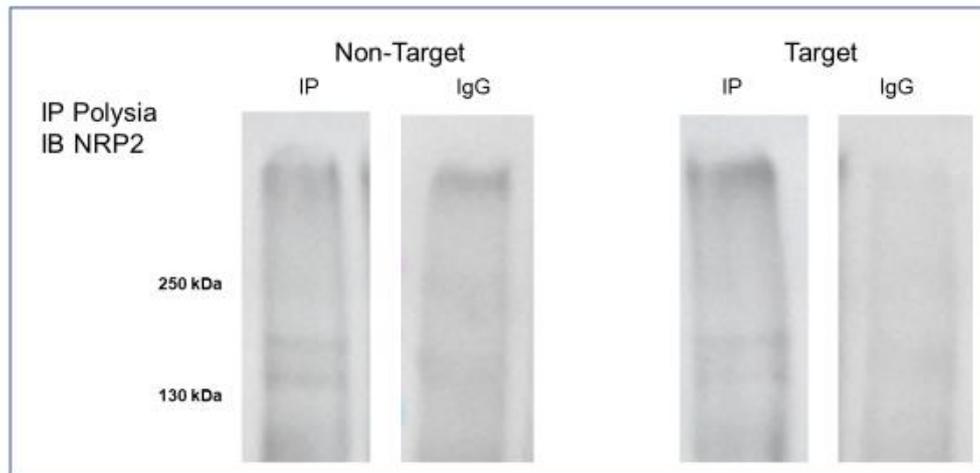
### 3.4 Transfektion und Knockout von Neuropilin-2

Um eine mögliche Beziehung von NRP2 und Polysia weiter zu untersuchen, erfolgte ein Knockdown von NRP2 durch die Transfektion mit siRNA Pools. Im Rahmen einer qPCR wurde die Effizienz der Transfektion überprüft (Abb. 10a). Neben der Kultivierung von unbehandelten Zellen in antibiotikafreiem Medium, wurden zu Kontrollzwecken ebenso Zellen mit einer unspezifischen Non-Target-siRNA behandelt und somit kontrolliert, in welchem Umfang das Transfektionsreagens Dharmafect einen Einfluss auf die Zellviabilität ausübt. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass bereits 10 nM genügen, um eine ausreichende Herunterregulierung der mRNA-Expression auf etwa 20 % der Ausgangsexpression zu erreichen. Für folgende Versuche wurde die Zelllinie J82 aufgrund der Expression beider Polysialyltransferasen ausgewählt und die Transfektion mittels Western Blot erneut überprüft (Abb. 10b).



**Abb. 10:** Knockdown von NRP2 in vier ausgewählten Blasenkarzinomzelllinien. Der Knockdown von NRP2 ist durch qPCR in allen Zelllinien bereits mit einer geringen siRNA-Konzentration effektiv nachweisbar (a). Die mRNA-Expression von NRP2 wurde auf das Housekeeping-Gen PPIA normalisiert. Die unbehandelte Kontrollprobe NTC (No Template Control) diente jeweils als Referenz ( $\Delta\Delta C_t$ -Methode), um den Knockdown darzustellen. Für weitere Versuche wurde die Zelllinie J82 ausgewählt und der Erfolg der NRP2-Depletion in Form von Reduktion der Proteinexpression mittels Western Blot überprüft (b) (siehe Anhang 5). n=1

Im nächsten Schritt erfolgte eine Immunpräzipitation der transfizierten J82-Zellen (Abb. 11). Wie erwartet wurden im Hinblick auf immunpräzipitiertes NRP2 keine Unterschiede zwischen Non-Target- und Target-Zellen beobachtet.



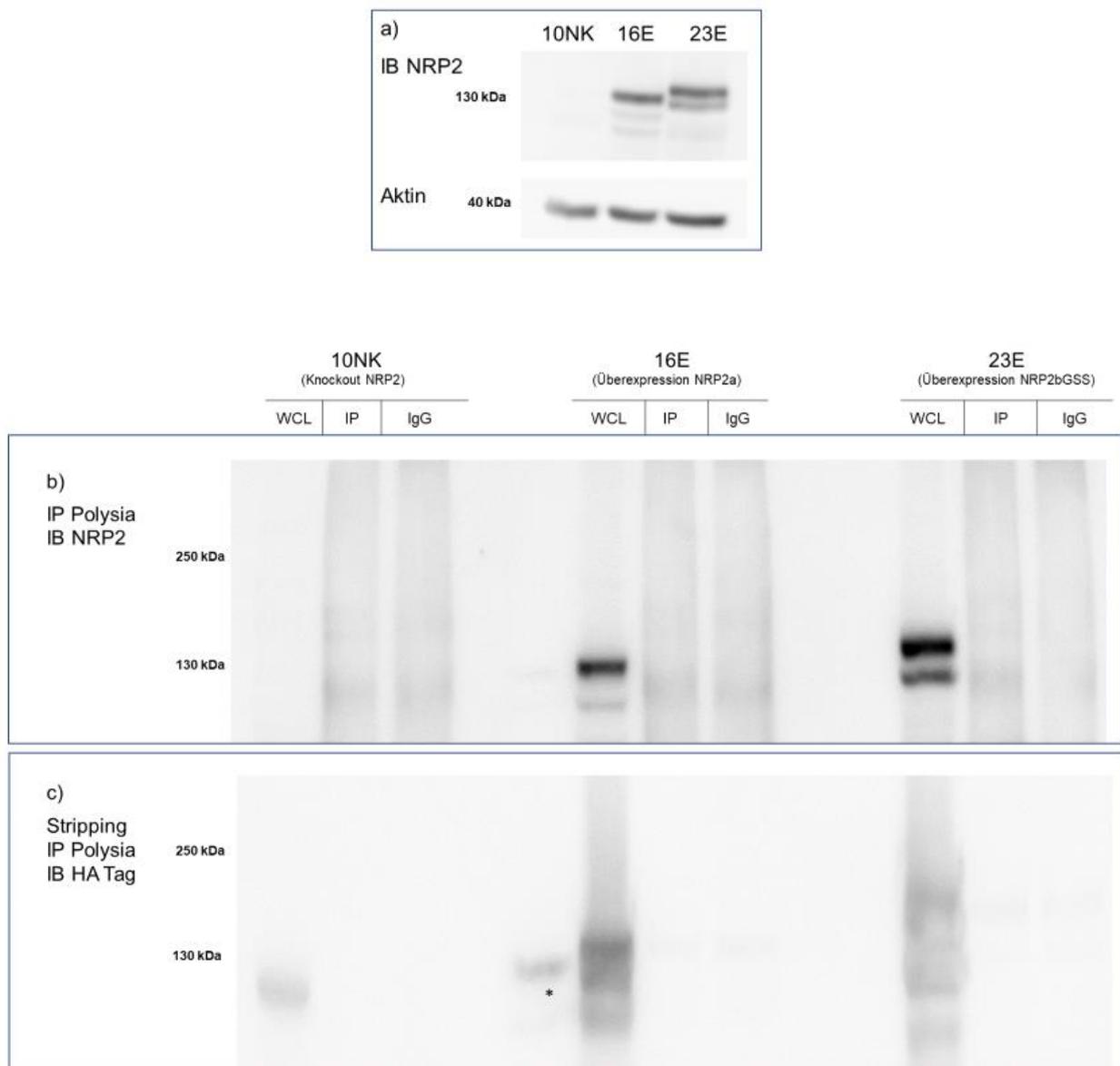
**Abb. 11:** Immunpräzipitation transfizierter J82-Zellen. Die Transfektion von NRP2 hat keinen Einfluss auf die Immunpräzipitation von Polysia mit anschließender Detektion von NRP2. Trotz Knockdown von NRP2 erscheinen unspezifische Signale in IP und IgG-Kontrolle (siehe Anhang 6). n=2

### 3.5 Überexpressionszellen

Im Umkehrschluss erfolgte eine Immunpräzipitation von Überexpressionszellen. Diese Zelllinien und Klone wurden freundlicherweise von Dr. Thomas Mayr zur Verfügung gestellt. Hierzu wurde NRP2 in der Parentalzelllinie RT112 zunächst gemäß dem Vorgehen von Schulz et al. (Schulz et al., 2019) ausgeknockt (Zelllinie J32) und anschließend NRP2a (Zelllinie J32 P80 16E) beziehungsweise NRP2bGSS (J32 P80 23E) eingebracht und überexprimiert. NRP2b-GSS, das durch Dr. Thomas Mayr bei seinen Forschungen zu NRP2b entdeckt wurde, zeichnet sich dadurch aus, dass es an Stelle des bekannten GSHC-Terminus ein C-terminales GSS-Motiv besitzt. In beiden Zelllinien wurde NRP2 mit einem Hämagglutinin (HA)-Tag nahe des Aminoterminus des murenen NRP2-Proteins versehen, der die Möglichkeit bietet, NRP durch einen spezifischen IP-gängigen HA-Antikörper zu detektieren. Als Nullkontrolle diente die Zelllinie J32 P80 10NK, welche ebenfalls aus J32 hervorgeht und die kodierende Region von NRP2a enthält, diese jedoch nicht exprimiert.

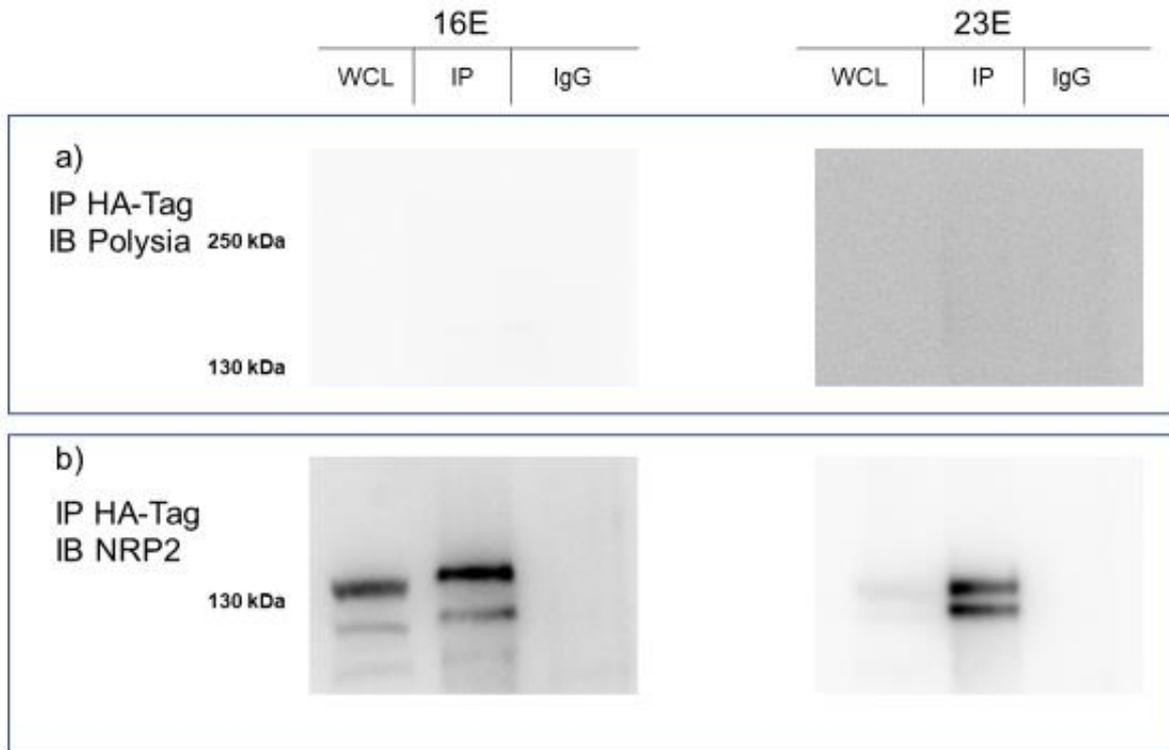
Zunächst wurde die Effektivität der Transfektion von NRP2 mittels Western Blot nachgewiesen (Abb. 12a), dann erfolgte eine Immunpräzipitation von Polysia mit nachfolgender Detektion von NRP2 (Abb. 12b). Nachdem auf diese Weise kein Signal in der IP detektiert werden konnte, wurde diese Membran gestrippt und auf HA-Tag untersucht (Abb. 12c).

Zwar erscheinen die Signale etwas ausgebrannt, doch dient dieser Western Blot als Bestätigung dafür, dass sich im IP-Signal kein HA-Tag und somit kein NRP2 befindet. Leichte Signale bei längerer Belichtung können somit eindeutig als unspezifisch identifiziert werden.



**Abb. 12:** Untersuchung NRP2-überexprimierender Zellen. Der NRP2-Knockout in RT112 Zellen (J32 P80 10NK) bzw. die Überexpression von NRP2a und NRP2bGSS in diesen KO-Zellen (J32 P80 16E bzw. J32 P80 23E) wurde mittels WB bestätigt (a) sowie eine Immunpräzipitation von Polysia mit Detektion von NRP2 (b) durchgeführt. Leichte Banden sind sowohl in der IP als auch in der IgG-Kontrolle erkennbar. Durch Stripping der Membran und Immunoblot von HA-Tag (c) können diese Signale als unspezifisch identifiziert werden (siehe Anhang 7). \*Signal aufgrund ungenauer Beladung des Gels

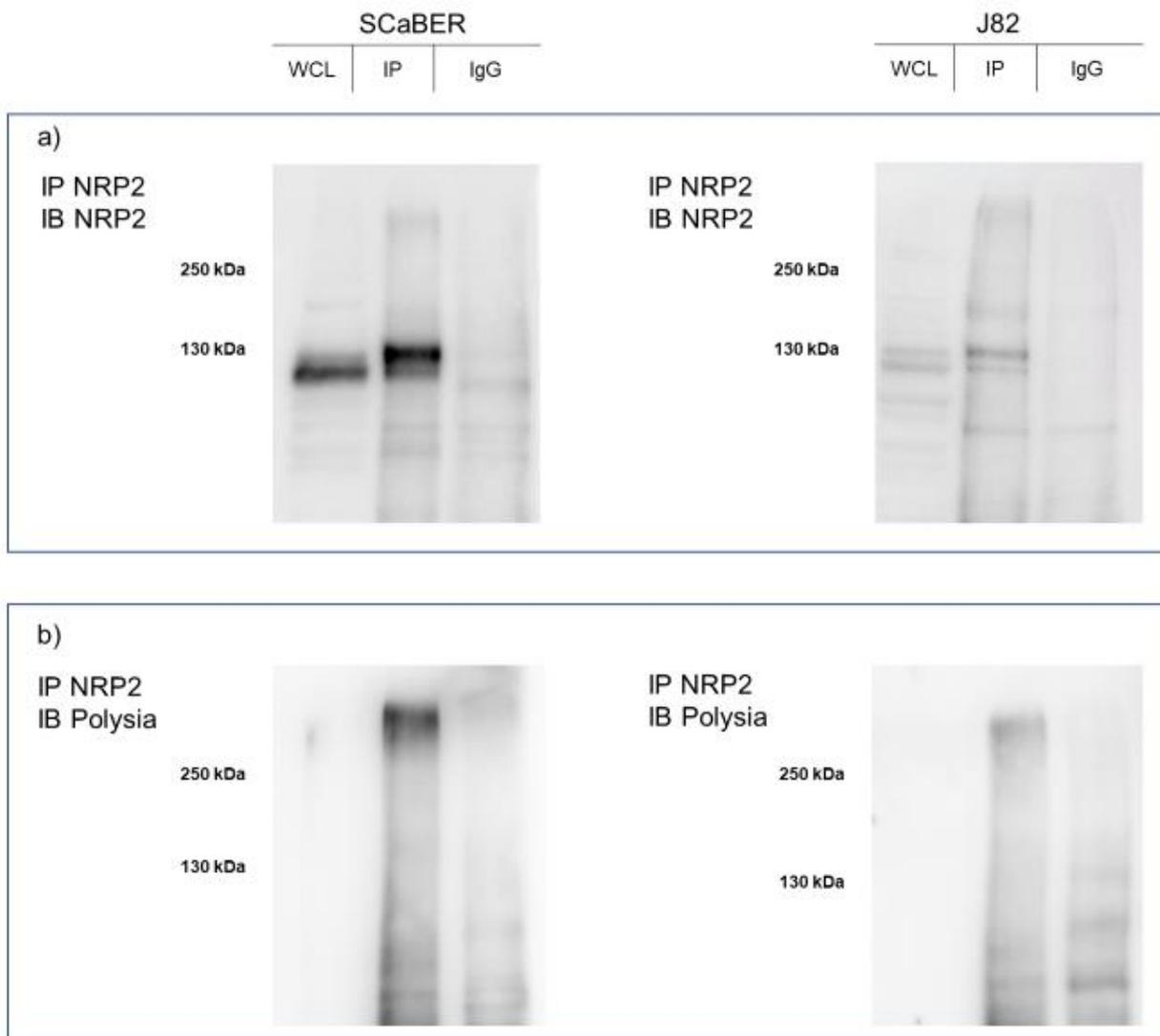
Zur Sicherung des Ergebnisses erfolgte ebenfalls eine IP von HA-Tag mit Untersuchung auf Polysia und NRP2 (Abb. 13). Trotz erfolgreicher Anreicherung von HA-Tag an NRP2 (Abb. 13b) ist kein Polysia-Signal erkennbar (Abb. 13a), womit eine Polysialylierung von NRP2 in RT112 ausgeschlossen werden kann. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der qPCR, welche zeigen, dass parentale RT112-Zellen weder ST8Sia2 noch ST8Sia4 exprimieren (Abb. 7).



**Abb. 13:** Immunpräzipitation von HA-getaggttem NRP2 mit Detektion von Polysia (a) und NRP2 (b). Eine deutliche Anreicherung zeigt, dass die IP erfolgreich ist. Polysia kann in den transfizierten Zellen nicht an NRP2 nachgewiesen werden (siehe Anhang 8).

### 3.6 Immunpräzipitation von Neuropilin-2

Eine Polysialylierung sollte ebenfalls durch die Immunpräzipitation von NRP2 in den Zelllinien SCaBER und J82 ausgeschlossen werden (Abb. 14). Hierzu wurde der anti-NRP2-Antikörper (C-9, Santa Cruz) sowie die normal mouse IgG2b-Isotypkontrolle verwendet. Zwar wurde ein Signal >300 kDa detektiert (Abb. 14b), doch kann dieses aufgrund der Größe nicht NRP2 zugeordnet werden. Zudem war eine Bande vergleichbarer Höhe in einigen der zuvor durchgeführten Immunpräzipitationen und auch IgG-Kontrollen erkennbar.

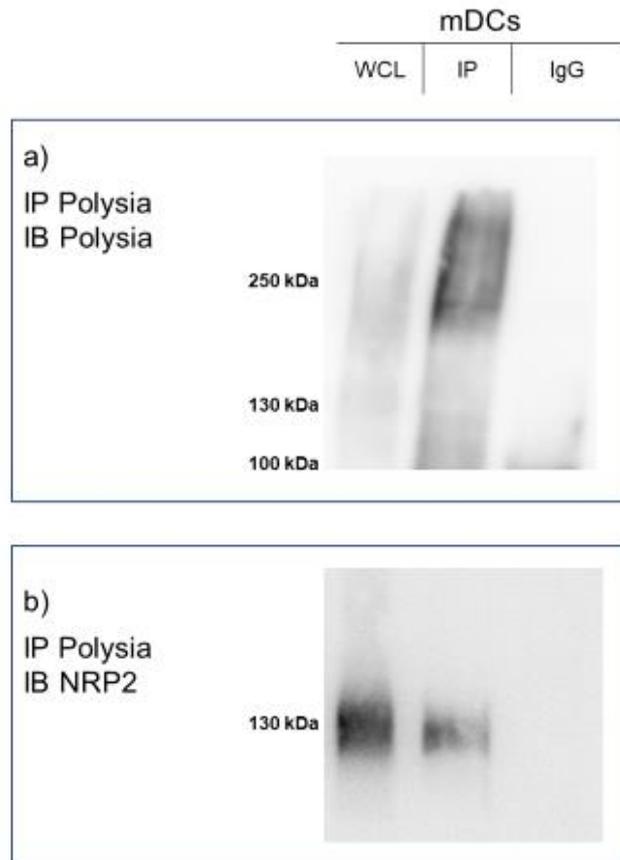


**Abb. 14:** Immunpräzipitation von NRP2 in SCaBER und J82 mit Detektion von NRP2 (a) und Polysia (b). Das Signal in der IP kann aufgrund der Größe nicht NRP2 zugeordnet werden.

### 3.7 Untersuchung reifer dendritischer Zellen als Positivkontrolle

In den durchgeführten Experimenten konnte keine Polysialylierung von NRP2 in Blasenkarzinomzellen nachgewiesen werden. Die folgenden Versuche wurden durchgeführt, um zu zeigen, dass die Negativergebnisse nicht auf methodische Fehler zurückzuführen sind und darauf basieren, dass NRP2 in Blasenkarzinomzellen nicht polysialyliert wird. Dazu wurden murine dendritische Vorläuferzellen, freundlicherweise von der AG

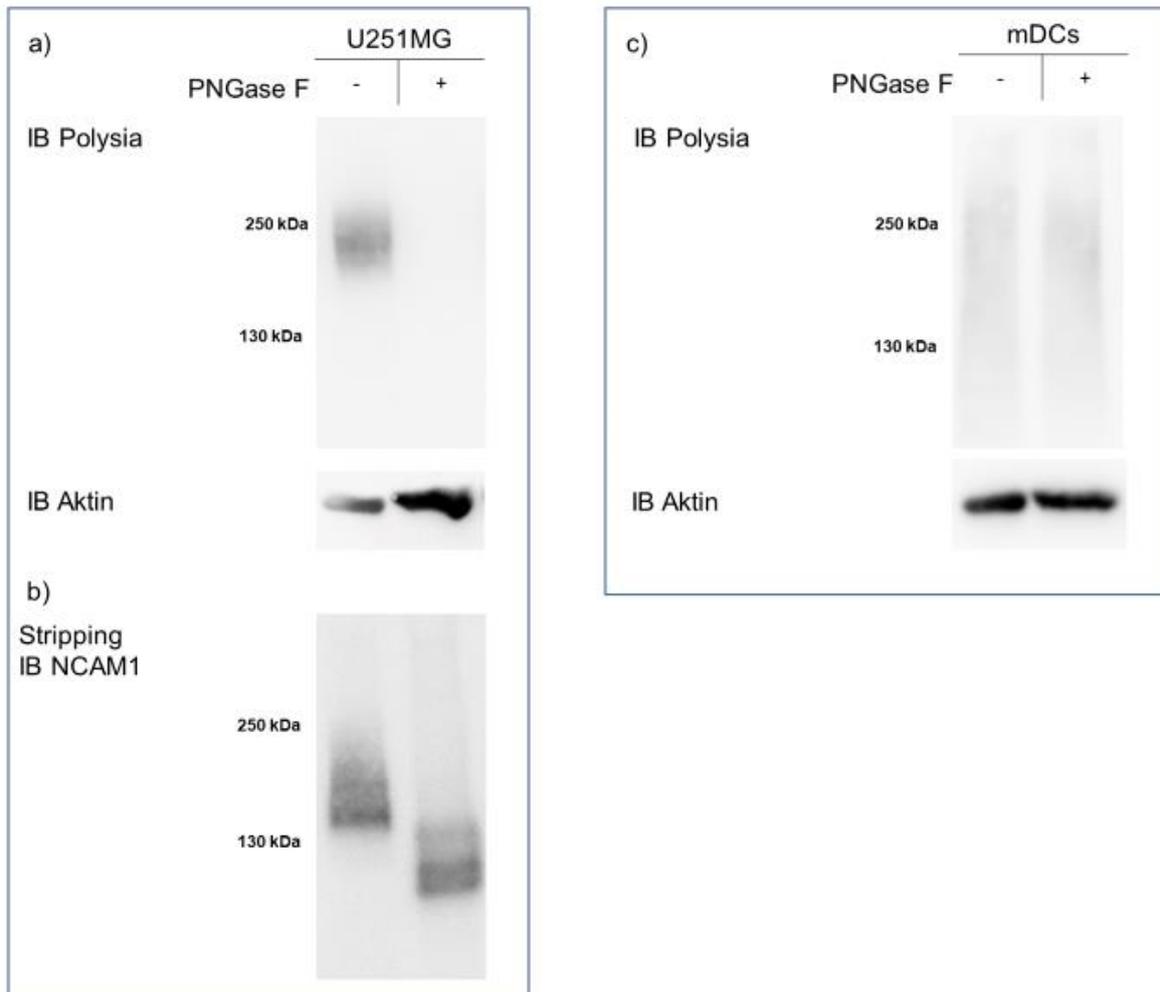
Kiermaier (Limes-Institut, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt, mit Hilfe von GM-CSF zu reifen dendritischen Zellen differenziert und auf PolySia-NRP2 untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Anreicherung von polysialyliertem NRP2 (Abb. 15b) und decken sich mit anderen Untersuchungen wie etwa von Curreli et al. (Curreli et al., 2007).



**Abb. 15:** Reife dendritische Zellen als Positivkontrolle für polysialyliertes NRP2. Als NRP2-Antikörper diente Neuropilin-2 (D39A5) XP (siehe Anhang 9).

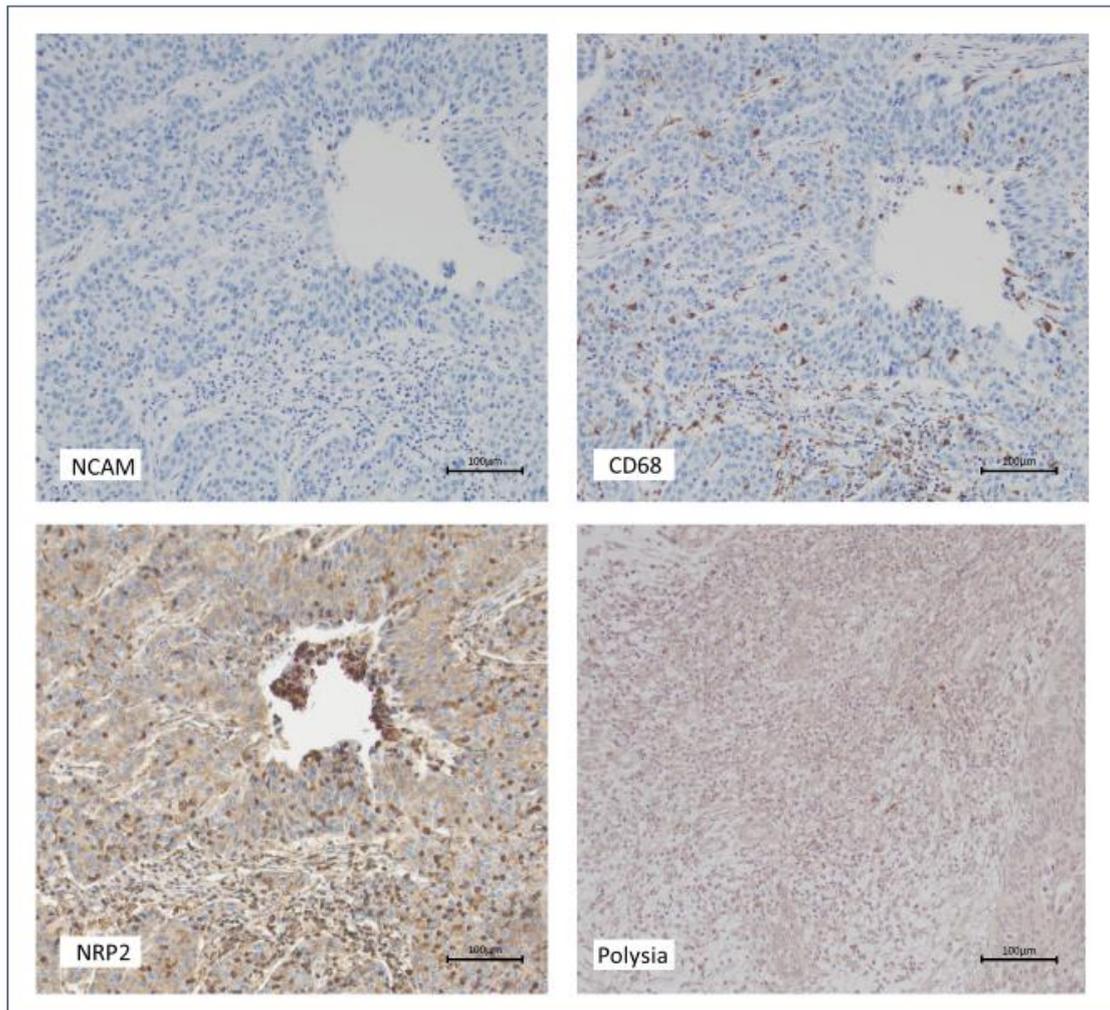
Im nächsten Schritt wurde die Polysialylierung von NRP2 in reifen dendritischen Zellen verifiziert, indem diese mit PNGase F behandelt wurden. PNGase F spaltet N-Glykosylierungen, nicht aber O-Glykosylierungen (Curreli et al., 2007). In der Kontrollzelllinie U251MG wird durch diese Behandlung die Polysialylierung an N-Glykanen, wie sie beispielsweise an NCAM1 stattfindet, vollständig entfernt (Abb. 16a). Durch Stripping dieser Membran und anschließende Detektion von NCAM1 zeigt sich ein deutlicher Shift (Abb. 16b). In reifen murinen dendritischen Zellen hingegen kommt es zu keiner

Veränderung des Signals, was auf die O-Polysialylierung von NRP2 zurückzuführen ist (Abb. 16c).



**Abb. 16:** Behandlung von U251MG und dendritischen Zellen mit PNGase F. Durch PNGase F werden N-verknüpfte Glykosylierungen abgespalten. Während dadurch Polysia in U251MG vollständig entfernt (a) und ein deutlicher Shift des NCAM1-Signals hervorgerufen wird (b), hat PNGase F keinen Einfluss auf die O-Polysialylierung in dendritischen Zellen (c).

### 3.8 Immunhistochemische Untersuchung von Tissue Microarrays



**Abb. 17:** Immunhistochemische Untersuchung von Tissue Microarrays von Blasenkarzinomen. 6 von 105 Proben sind polysia-positiv.

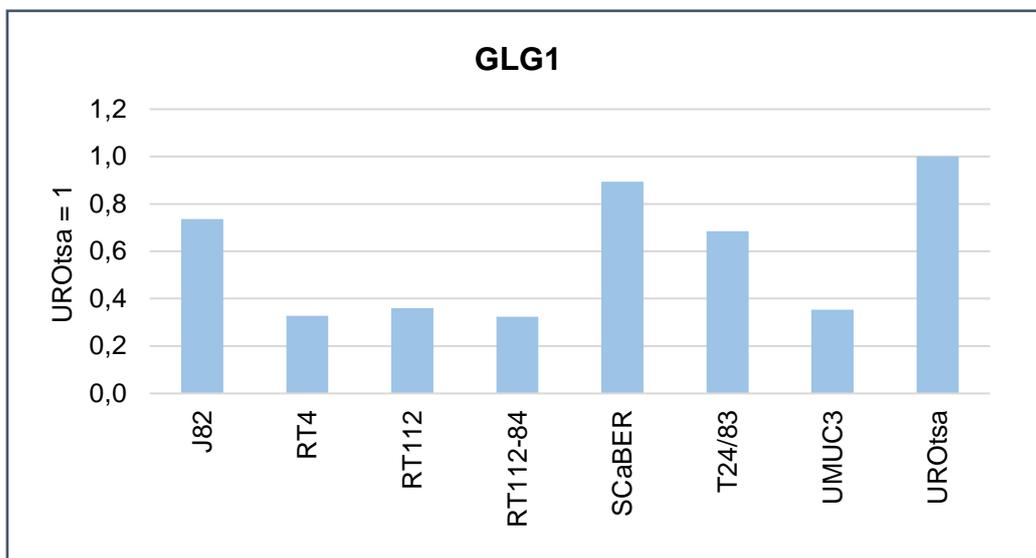
Zusätzlich zu den Untersuchungen auf Zellebene erfolgte die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von Tissue Microarrays von Blasenkarzinomen (Abb. 17). Die Färbung erfolgte freundlicherweise durch Frau Steiner (Institut für Pathologie, Uniklinikum Bonn) und Dr. Sarah Förster.

NCAM1, als häufigster Träger von Polysia diente als Ausschlussfärbung und wurde nicht nachgewiesen. Es zeigte sich eine starke Färbung von NRP2 auf Immunzellen, die mit dem Makrophagenmarker CD68 korreliert. Ebenfalls kam der bereits für Western-Blot-Untersuchungen verwendete Antikörper anti-Polysialic acid clone 735 zum Einsatz. In Anlehnung an die bisherigen Ergebnisse zeigte sich in lediglich 6 % (6 von 105 Proben) eine

schwache Färbung von Polysia in Krebszellen, bei welchen es sich maßgeblich um Immunzellen handelt.

### 3.9 GLG1 als möglicher Polysia-Akzeptor

Da bereits gezeigt wurde, dass Polysia in Blasenkarzinomzellen exprimiert wird und diese jedoch nicht im Zusammenhang mit NRP2 oder NCAM1 stehen, gilt es den Polysia-Träger in diesen Zellen zu identifizieren. Neben den Polysialyltransferasen selbst kommen SynCAM1 (CADM1), Golgi Glykoprotein-1 (GLG1) oder aber der Chemokinrezeptor 7 (CCR7) in Frage. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang das Protein GLG1, welches die Adhäsion von zirkulierenden Krebszellen an Endothelzellen vermittelt und somit von grundlegender Bedeutung für Tumorprogression und Metastasierung ist (Carrascal et al, 2018). Dies liegt die Vermutung nahe, dass GLG1 ein mögliches Ziel der Polysialyltransferasen in Malignomen der Harnblase darstellt. Daher wurden die Zelllinien im Rahmen einer qPCR auf GLG1 hin überprüft, wobei eine Expression für alle Zelllinien gezeigt werden konnte (Abb. 18).



**Abb. 18:** RT-qPCR der Blasenkarzinomzelllinien und UROtsa mit Analyse der Expression von Golgi Glykoprotein-1 (GLG1). Eine Expression kann für alle Zelllinien nachgewiesen werden. Als Referenz dient die Zelllinie gesunden Urothels (UROtsa).

## 4. Diskussion

Aufgrund der hohen Rezidivrate von Blasenkarzinomen und der begrenzten Sensitivität bekannter Biomarker haben Früherkennung, Risikobewertung und die Suche nach neuen Therapieoptionen einen hohen Stellenwert (Azevedo et al., 2017; Shah et al., 2011). Ziel meiner Arbeit war die Untersuchung des Proteins NRP2, dessen Bedeutung im Harnblasenkarzinom bereits durch Keck et al. herausgestellt werden konnte (Keck et al., 2015). Insbesondere durch Zunahme der Therapieresistenz und seiner Rolle als prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben einer bestimmten Gruppe von Blasenkarzinompatienten (Keck et al., 2015), ist die Erforschung von NRP2 von wissenschaftlichem Interesse. Ferner wurde auch für andere Krebsarten wie das Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse gezeigt, dass NRP2 wesentliche krebsinitiierende und fördernde Reaktionen vermittelt und ein Knockdown von NRP2 die Tumorpherifation drastisch reduziert (Matkar et al., 2018; Borchardt et al., 2019). In Brustkrebs belegen Goel et al., dass eine Therapie gegen NRP2 *in vivo* gezielt eingesetzt werden kann, um die Tumorinitiierung zu verzögern (Goel et al., 2013).

Neben der pro-tumorigenen Wirkung von NRP2 selbst, eignet sich auch dessen Polysialylierung als Zielmolekül für Krebstherapien, was bereits durch einige Studien gezeigt wurde (Stein et al., 2006; Heimbürg-Molinaro et al., 2011; Krug et al., 2012; Cox et al., 2019). Von Vorteil ist, dass Polysialin ebenso wie NRP2 außerhalb von Malignomen nur gering exprimiert wird und somit eine sehr gute Selektivität aufweist (Cox et al., 2019).

Aufgrund dieser vielversprechenden Erkenntnisse und dem Umstand, dass derzeit noch keine Untersuchungen zu polysialyliertem NRP2 im Harnblasenkarzinom vorliegen, wurde in dieser Arbeit der Fragestellung nachgegangen, ob NRP2 im Harnblasenkarzinom polysialyliert wird und als therapeutischer Ansatzpunkt dienen kann.

Da perinatal circa 95% der Polysialylierung an Isoformen von NCAM1 gebunden ist (Chen et al., 2017), galt es zunächst Zelllinien auszuschließen, in denen Polysialylierung an NCAM1 stattfindet. Der Western Blot (Abb. 6) identifizierte eine Expression von NCAM1 in lediglich einer der acht Zelllinien, während sich NRP2 in einem Großteil der Zelllinien nachweisen ließ. Das Signal für Polysialin war hingegen weniger eindeutig. Es zeigte sich ein leichter Schleier zwischen 130 kDa und 300 kDa, der jedoch in vier Wiederholungen

kein konstantes Ergebnis für die jeweilige Zelllinie lieferte. Die Breite der Polysia-Bande von 150 kDa bis zu 300 kDa kann darauf zurückzuführen sein, dass anti-polysialic acid clone 735 verwendet wurde, ein Antikörper, der die Fähigkeit hat, sich wiederholende Epitope aus einer einzelnen verlängerten Kette von Polysia zu erkennen, während der monoklonale Antikörper gegen NRP2 lediglich ein einzelnes Epitop auf polysialyliertem NRP2 erkennt. Daraus resultiert, dass das Signal für Polysia aufgrund von Polysiaketten unterschiedlich großer molekularer Masse sehr diffus erscheint (Curreli et al., 2007).

Die nachfolgend durchgeführte qPCR (Abb. 7) bestätigte das Ergebnis des Western Blots und zeigte vielversprechend, dass ST8Sia4, das Enzym welches die Polysialylierung von NRP2 verantwortet, in einigen der Zelllinien exprimiert wird. Interessant in diesem Zusammenhang ist der große Unterschied der Expression dieser Transferase in den Zelllinien RT112 und RT112/84. Während die Parentalzelllinie RT112 die Transferase nicht exprimiert, ergab sich für RT112/84 die höchste Expression dieser. Trotz des hohen Levels an ST8Sia4 konnte für RT112/84 jedoch keine erhöhte Polysia-Expression gezeigt werden (Abb. 6). Dies lässt sich mit Erkenntnissen von Zhu et al. begründen, die zeigen, dass die zellulären Mengen an mRNA, welche für ST8Sia2 und ST8Sia4 kodieren, in einigen Fällen nicht mit dem posttranslationalen Niveau von Polysia korrelieren, da es auf translationaler und posttranslationaler Ebene zu einer Regulation kommt. Mögliche Gründe dafür sind neben enzymatischen Aktivitäten der Transferasen und deren Stabilität ebenfalls die Expression des entsprechenden Substrats (Zhu et al. 2015).

Zu Vergleichszwecken wurde RT112 neben J82, SCaBER und RT112/84 weiter untersucht. Die Detektion von NRP2 nach vorheriger IP von Polysia zeigte in diesen vier Zelllinien keine Polysialylierung von NRP2 (Abb. 9). Trotz des negativen Ergebnisses wurden die Untersuchungen an dieser Stelle nicht abgebrochen, da letzte Zweifel in Form minimaler Signale in IP und IgG, die als unspezifisch gewertet wurden, ausgeräumt werden sollten. Zunächst erfolgte ein Knockdown von NRP2, welcher vorherige Ergebnisse stützte: Obwohl NRP2 nachgewiesen herunterreguliert wurde (Abb. 10b), erschienen in IP und IgG-Kontrolle erneut unspezifische Banden auf gleicher Höhe (Abb. 11).

Curreli et al. postulierten, dass die Expression von NRP2 mit hoher Wahrscheinlichkeit in reifen dendritischen Zellen den limitierenden Faktor für die Zelloberflächenpolysialylierung darstellt (Curreli et al., 2007). Aus diesem Grund wurden die Experimente ergänzend zu den Knockdown-Untersuchungen mit NRP2-Überexpressionszellen durchgeführt

(Abb.12). Über einen spezifischen HA-Tag an NRP2 boten diese Zelllinien die Möglichkeit, die minimalen Signale in IP und IgG eindeutig als unspezifisch zu identifizieren. Dazu wurde im Rahmen einer IP von Polysia kein HA-Tag und somit gleichbedeutend kein NRP2 in IP und IgG detektiert (Abb. 12c). Umgekehrt zeigte eine IP von HA-Tag jedoch eine Anreicherung von NRP2 (Abb. 13b) ohne Signal bei einer Detektion von Polysia (Abb. 13a). Somit konnte durch eine Vielzahl von Untersuchungen gezeigt werden, dass NRP2 kein Träger von Polysia im Harnblasenkarzinom ist.

Probleme gab es hingegen bei der IP von NRP2, welche diese These nur bedingt stützte. Obgleich es zu einer Anreicherung von NRP2 kam (Abb. 14a), zeigte sich bei der Untersuchung auf Polysia eine deutliche Bande über 300 kDa, welche in der IP, nicht jedoch in der IgG-Kontrolle erschien (Abb. 14b).

Dass eine IP von NRP2 möglich ist, zeigen Werneburg et al. mit dem Antikörper neuropilin-2 (H-300): sc-5542 von santa cruz (Werneburg et al., 2015). Dieser ist wiederum nicht mehr verfügbar – als Alternative wird auf den in dieser Arbeit verwandten Antikörper verwiesen. Ob dieser sich gleichermaßen für die IP eignet, ist unklar. Jedoch kann es sich aufgrund der Größe bei dem IP-Signal nicht um NRP2 handeln. Eine Vielzahl von Wiederholungen dieses Experiments konnte keine weiteren Erkenntnisse liefern. So bleibt die IP von NRP2 eine der Untersuchungen, welche in Zukunft überarbeitet oder mit Hilfe eines anderen Antikörpers etabliert werden muss.

Da bisherige Experimente lediglich Negativergebnisse zeigen konnten, wurde zuletzt eine Positivkontrolle für polysialyliertes NRP2 untersucht, um methodische Fehler auszuschließen. Die Polysia-IP reifer dendritischer Zellen zeigte ein deutliches Signal und stellte so heraus, dass eine Detektion von polysialyliertem NRP2 mit der angewandten Methode möglich ist (Abb. 15). Die Ergebnisse decken bisherige Untersuchungen zur Polysialylierung von reifen dendritischen Zellen (Curreli et al., 2007; Rey-Gallardo et al., 2011). Zur abschließenden Verifikation des Polysia-Antikörpers wurden Experimente mit PNGase F durchgeführt, einem Enzym, das spezifisch alle N-Glykosylierungen von Proteinen abspaltet (Abb.16). Eine Zugabe dieses Enzyms resultiert in der Abspaltung von N-verknüpfter Polysia wie etwa an U251MG. In dendritischen Zellen jedoch bleibt das Signal nach Zugabe aufgrund der O-Polysialylierung unverändert (Abb. 16c). Alternativ zu PNGase F wären Untersuchungen mit Hilfe von EndoN denkbar gewesen. EndoN ist ein Enzym welches spezifisch Polysialylierung abspaltet und somit sowohl Einfluss auf N- als auch auf

O-verbundene Polysia hat (Werneburg et al., 2016; Curreli et al., 2007; Rey-Gallardo et al., 2011). Anders als PNGase F ist es jedoch nicht kommerziell erhältlich und wird wie von Stummeyer beschrieben hergestellt (Stummeyer et al., 2005).

Trotz eines eindeutigen Negativergebnisses sind bei den vorliegenden Untersuchungen in Form von Zellkulturexperimenten Limitationen bezüglich der klinischen Aussagekraft gegeben. Während des Passagierens erfahren die Zellen genetische Veränderung aufgrund des Selektionsdrucks infolgedessen es zu einer Veränderung des Phänotyps kommen kann (Capes-Davis et al., 2013). Insbesondere in Blasenkarzinomzellen zeigen Zelllinien nach mehrfacher Passage deutliche Unterschiede zum ursprünglichen Tumor wie etwa einen Verlust von Heterozygotie oder eine Veränderung der Ploidie (Zuiverloon et al., 2018). Ergänzend zum Selektionsdruck führen suboptimale Kulturbedingungen wie Nährstoffmangel oder Passage bei zu geringer Dichte zu einer genetischen Veränderung der Zellen (Capes-Davis et al., 2013). Ein weiteres Risiko, dessen man sich bei der Kultur von Zellen bewusst sein muss, ist die Kreuzkontamination, welche den Vergleich von Ergebnissen zwischen einzelnen Laboren beeinträchtigt, die Reproduzierbarkeit reduziert und folglich zu unbrauchbaren therapeutischen Produkten führen kann (Markovic und Markovic, 1998). Diese ist ein unterschätztes Problem der Zellkulturforschung wie auch Bian et al. herausstellten, die in ihren Untersuchungen zeigen konnten, dass knapp ein Viertel aller untersuchten menschlichen Tumorzelllinien falsch identifiziert wurden (Bian et al., 2017). Eine Zelllinie, die für eine Vielzahl von Kontaminationen verantwortlich gemacht wird, ist die Zelllinie T24. Während einige Kulturen von J82 auf T24 zurückzuführen sind, unterscheiden sich RT4, RT112 und SCaBER eindeutig von dieser (O'Toole et al., 1983). Diese Erkenntnisse zeigen die Bedeutung regelmäßiger Zelllinien-Authentifizierung auf. Die Authentifizierung der verwendeten Zellen erfolgte 2019 zu Beginn des Projektes mittels Human cell authentication (Multiplexion).

Da eine Polysialylierung von NRP2 und NCAM1 im Blasenkarzinom auszuschließen ist, gilt es nun den Polysia-Träger zu identifizieren. Ein potenzielles Protein, das weiteren Untersuchungen bedarf, ist SynCAM1. Angesichts der in dieser Arbeit durchgeführten qPCR, ist jedoch damit zu rechnen, dass auch SynCAM1 im Blasenkarzinom ebenfalls nicht mit Polysia modifiziert wird. Dies ist darauf zurückzuführen, dass SyncAM1 durch die Transferase ST8Sia2 polysialyliert wird, welche in geringen Mengen lediglich in J82 nachzuweisen war (Abb. 7).

Komplementär zu NRP2 ist darüber hinaus NRP1 zu überprüfen: Zwar geben viele Autoren an, dass NRP1 nicht polysialyliert wird und stattdessen eine Modifikation mit Glykosaminoglykanen erfährt (Rollenhagen et al., 2013), doch argumentieren Bhide et al., dass NRP1 in seiner membrangebundenen Form zu einem geringeren Teil ebenfalls polysialyliert wird (Bhide et al., 2016).

Weiterhin ist nicht außer Acht zu lassen, dass die Transferasen selbst zur Autopolysialylierung fähig sind und diese speziell für NRP2 darüber hinaus Voraussetzung für dessen Polysialylierung ist (Bhide et al., 2018). Daher wären weitere Versuche mit Hilfe von Antikörpern gegen ST8Sia2 und ST8Sia4 denkbar, welche dies im Rahmen einer Immunpräzipitation überprüfen könnten. Dabei sollten bei der Probenaufbereitung Denaturierungsschritte bei hoher Temperatur vermieden werden, da bei weiteren Versuchen durch Dr. Sarah Förster nachgewiesen wurde, dass sich dadurch methodenbedingt der Nachweis der Polysialylierung drastisch verbessert.

Ein vielversprechender potenzieller Träger von Polysia im Malignom der Harnblase ist GLG-1, dessen Expression nachgewiesen mit der Krebsprogression und metastatischen Dissemination assoziiert ist (Läubli und Borsig, 2010). Für das Prostatakarzinom wurde gezeigt, dass GLG-1 exprimiert wird (Muz et al., 2021) und ein Knockdown zu einer reduzierten Krebsaggressivität führt (Yasmin-Karim et al., 2014). Eine Expression konnte in allen ausgewählten Blasenkarzinomzelllinien gezeigt werden (Abb. 18).

Parallel zu NRP2 konnte eine Polysialylierung in muriner Mikroglia und humanen THP1-Makrophagen belegt werden. Diese wird ebenso wie bei NRP2 durch die Transferase ST8Sia4 vermittelt (Werneburg et al., 2016). Untersuchungen zu Polysialylierung in Karzinomen liegen nicht vor. Interessant in diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse der immunhistochemisch gefärbten Tissue Microarrays (Abb. 17). Ein Vergleich der CD68-Färbung mit der Färbung von Polysia zeigt, dass Polysia-positive Zellen in Größe und Verteilung Ähnlichkeiten mit den CD68-gefärbten Makrophagen aufweisen. Da es mit einer Größe von 150 kDa (Willmroth und Beaudet, 1999; Werneburg et al., 2016) darüber hinaus mit den Signalen der Polysia-IP vereinbar ist und eine Expression in jeder der acht Zelllinien belegt wurde, sind diesbezüglich weitere Experimente notwendig.

Auch 30 Jahre nach seiner Entdeckung ist Polysia primär als Modifikation von NCAM1 bekannt – inzwischen wurden jedoch einige weitere Polysia-Träger identifiziert, deren

Funktionen bislang kaum erforscht wurden. Durch unsere Untersuchungen konnte NRP2 als polysialyliertes Protein und Therapieziel ausgeschlossen werden. Gleichzeitig rückt mit GLG1 ein mögliches Substrat dieser Modifikation in den Fokus, wodurch sich weitere interessante Ansätze zur Analyse der Polysialylierung im Harnblasenkarzinom ergeben.

## 5. Zusammenfassung

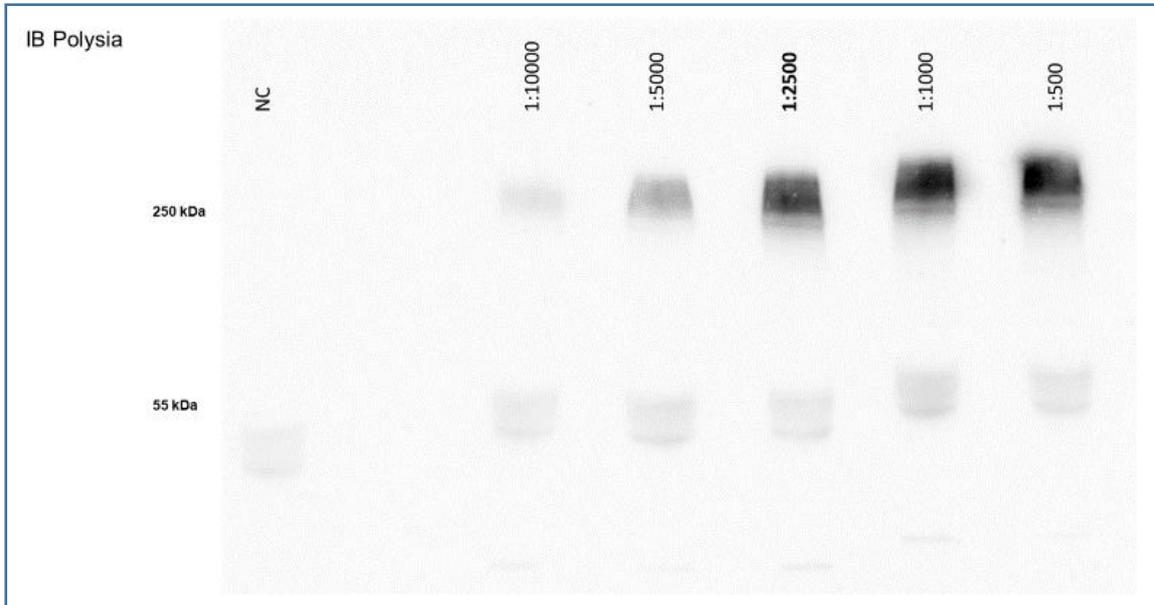
Als wichtigste posttranslationale Modifikation hat die Glykosylierung von Proteinen Einfluss auf die Stabilität und das Zellwachstum, verleiht neue Funktionen und verändert die Kommunikation mit anderen Zellen. Sie ist für viele biologische Prozesse des Stoffwechsels von Malignomen von grundlegender Bedeutung (Cox et al., 2019). So weist ein Großteil der Krebserkrankungen Veränderungen der Glykosylierungsmuster auf. Eine besondere Form, die ebenfalls mit Tumorerkrankungen in Verbindung steht, ist die Polysialylierung. Sie beschreibt die translationale Modifikation von Proteinen mit Polysialinsäure (Polysia), einem linearen Homopolymer bestehend aus alpha2,8-verknüpften Sialinsäureresten (Zhu et al., 2015). Die Expression ist entwicklungsabhängig: Sie nimmt nach der Geburt stark ab und beschränkt sich im Erwachsenenalter auf Hirnregionen, die zu struktureller und funktioneller Plastizität fähig sind (Sato und Kitajima, 2020). Ferner kommt es in Karzinomen zu einer erneuten Expression von Polysia. Neben dem bekanntesten polysialylierten Protein NCAM1, gibt es nur wenige weitere Träger von Polysia. Eines dieser Proteine ist Neuropilin-2 (NRP2), welches durch seine Schlüsselrolle bei der tumorassoziierten Lymphangiogenese und lymphatischen Metastasierung mit pathologischen Erkrankungen assoziiert ist (Roy et al., 2018; Ni et al., 2018). Neben Prostatakarzinomen, Brustkrebs oder Pankreaskarzinomen zeichnen sich Blasenkarzinome durch eine erhöhte Expression von NRP2 aus (Mhawech-Fauceglia et al., 2009; Keck et al., 2015). Neben einer Zunahme der Metastasierungswahrscheinlichkeit steht NRP2 im Zusammenhang mit einer gesteigerten Therapieresistenz durch die Aktivierung antiapoptotischer und autophagischer Signalwege (Stanton et al., 2013b).

Auf der Suche nach neuen Therapieoptionen für Blasenkarzinome, sind sowohl NRP2 als auch Polysia interessante Ansatzpunkte – speziell zur Polysialylierung von NRP2 im Harnblasenkarzinom liegen bislang keine Daten vor. Daher ging die Untersuchung der Frage nach, ob NRP2 im Harnblasenkarzinom polysialyliert vorliegt und folglich ein mögliches Therapieziel darstellt. Diese Untersuchung umfasste verschiedene Methoden zur Bestimmung der Expression von Polysia im Zusammenhang mit NRP2 in Blasenkarzinomzelllinien sowie einer Zelllinie gesunden Urothels (UROtsa). Dabei kam in erster Linie

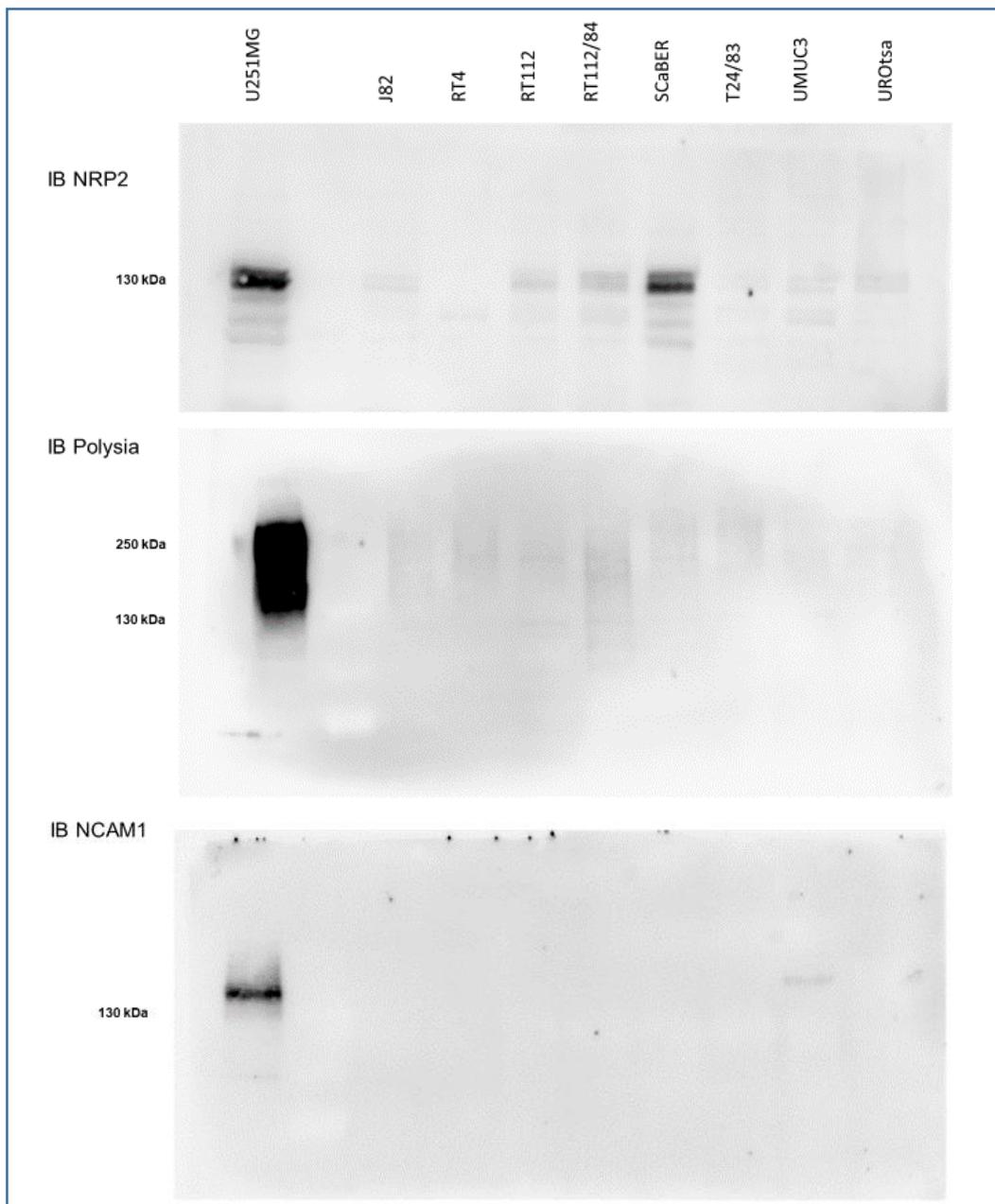
die Methode des Western Blots, unterstützt durch quantitative Real-Time-PCR zum Einsatz. Dabei wurde eine Expression von NRP2 und Polysia in einigen Blasenkarzinomzelllinien nachgewiesen. Das weitaus häufiger polysialylierte Protein NCAM1 wird hingegen nur in einer der getesteten Zelllinien exprimiert. Da Polysia in nur sehr geringen Mengen nachzuweisen war (Abb. 6), folgten Immunpräzipitationen zur Anreicherung von Polysia mit anschließender Detektion von NRP2 (Abb. 9a). In diesen Versuchen konnte kein polysialyliertes NRP2 in den Zelllinien gezeigt werden. Die Auswirkungen einer Depletion von NRP2 wurden durch einen siRNA-vermittelten Knockdown herausgestellt (Abb. 11). Weitere Ansätze umfassten eine Überexpression von NRP2 (Abb. 12). Alle Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass NRP2 im Malignom der Harnblase nicht polysialyliert vorliegt. Da eine Polysialylierung nachgewiesen wurde, diese jedoch nicht an NCAM1 und NRP2 stattfindet, legen diese Ergebnisse die Vermutung nahe, dass es im Harnblasenkarzinom einen weiteren Träger von Polysia geben muss. Neben der Autopolysialylierung der Transferasen selbst, ist eine Polysialylierung von Golgi Glykoprotein-1 denkbar, einem Protein welches nachweislich mit Tumorprogression und Metastasierung assoziiert ist (Läubli und Borsig, 2010). Eine Untersuchung der Blasenkarzinomzelllinien auf GLG1 konnte eine Expression in allen acht Zelllinien nachweisen (Abb. 18).

Somit ist zwar nachgewiesen, dass NRP2 im Blasenkarzinom nicht polysialyliert wird, doch wurde mit GLG1 ein weiterer potenzieller Polysia-Träger aufgezeigt, dessen Vorkommen und Funktion weiteren Untersuchungen bedarf.

## 6. Anhang

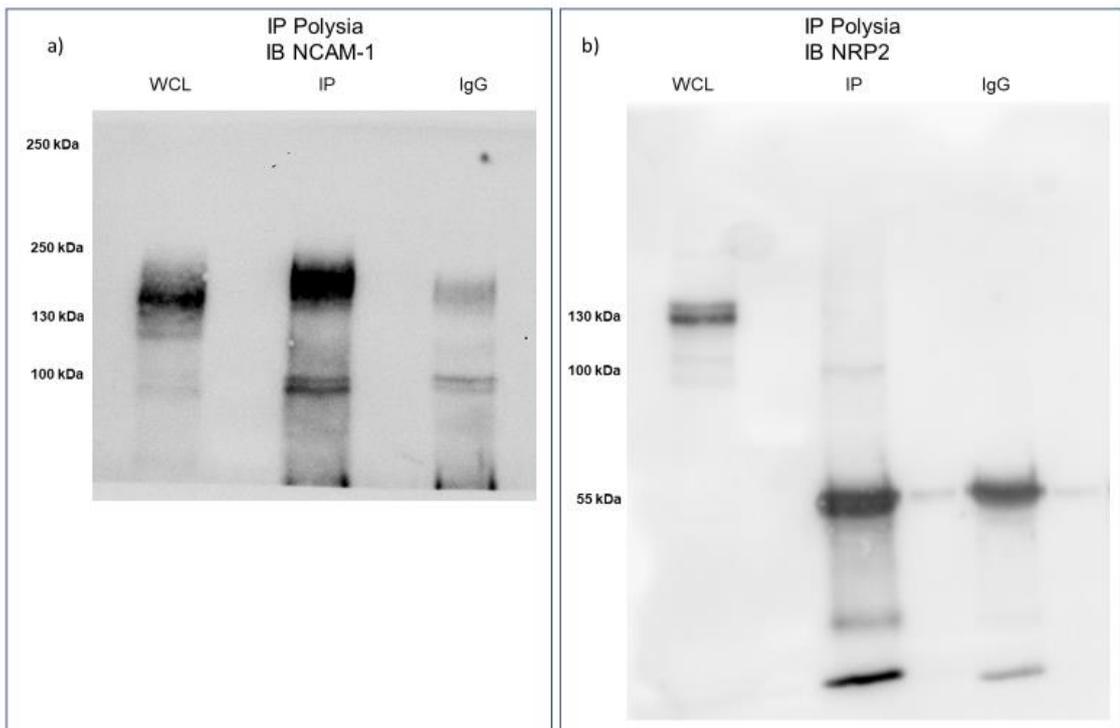


**Anhang 1:** Etablierung des Antikörpers anti-Polysialic acid clone 735 (siehe Abb. 5).

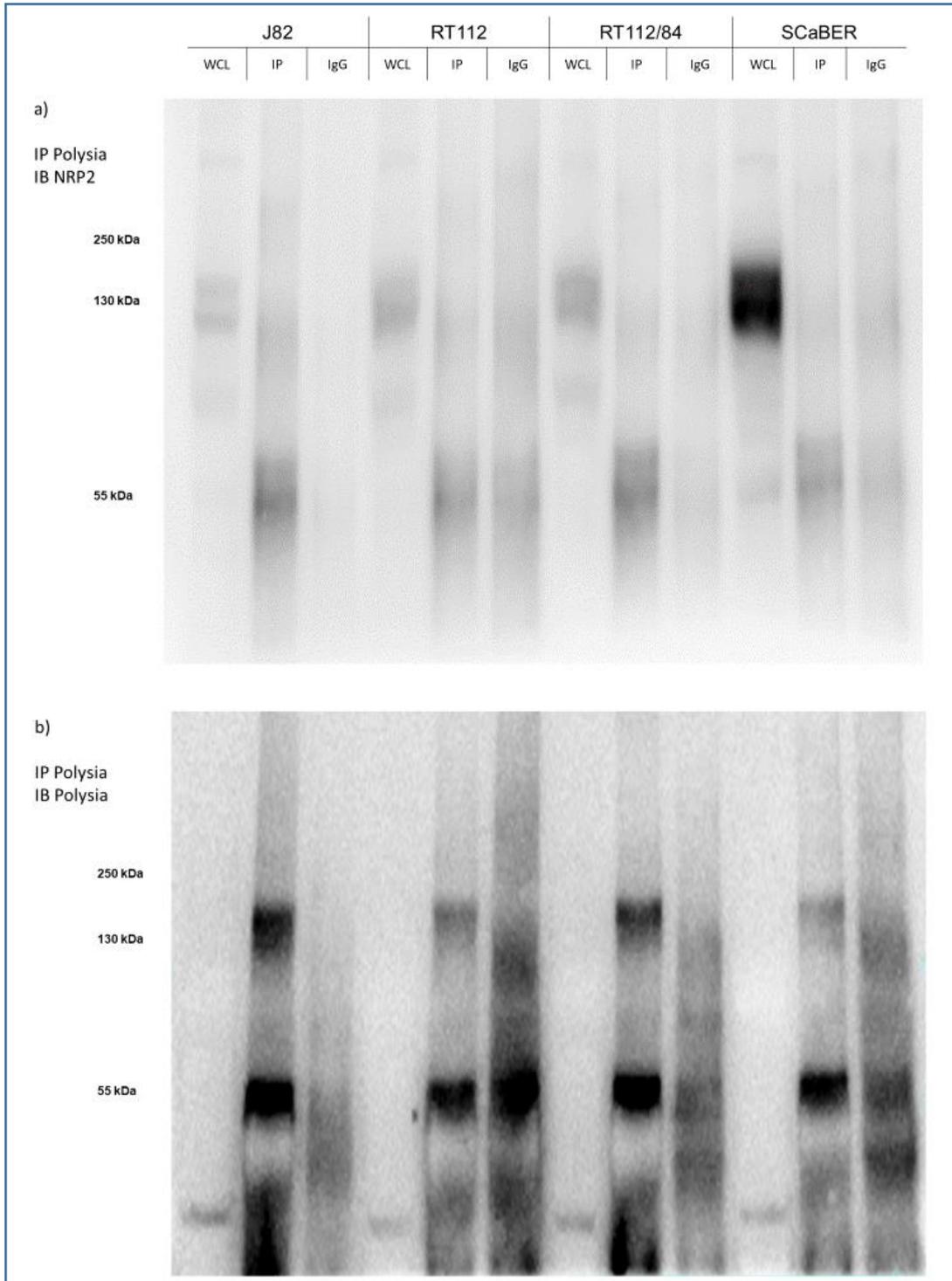


**Anhang 2:** Expression von NRP2, Polysia und NCAM1 in ausgewählten Blasenkarzinomzellen sowie UROtsa (siehe Abb. 6).

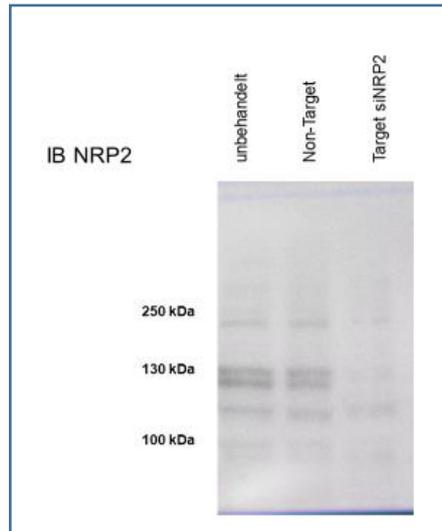
U251 MG



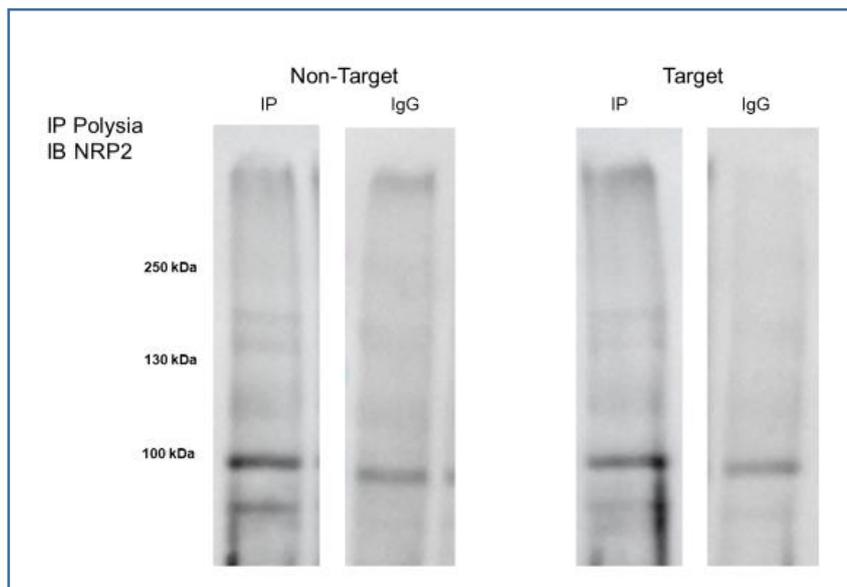
**Anhang 3:** Immunpräzipitation von Polysia in U251MG (siehe Abb. 8).



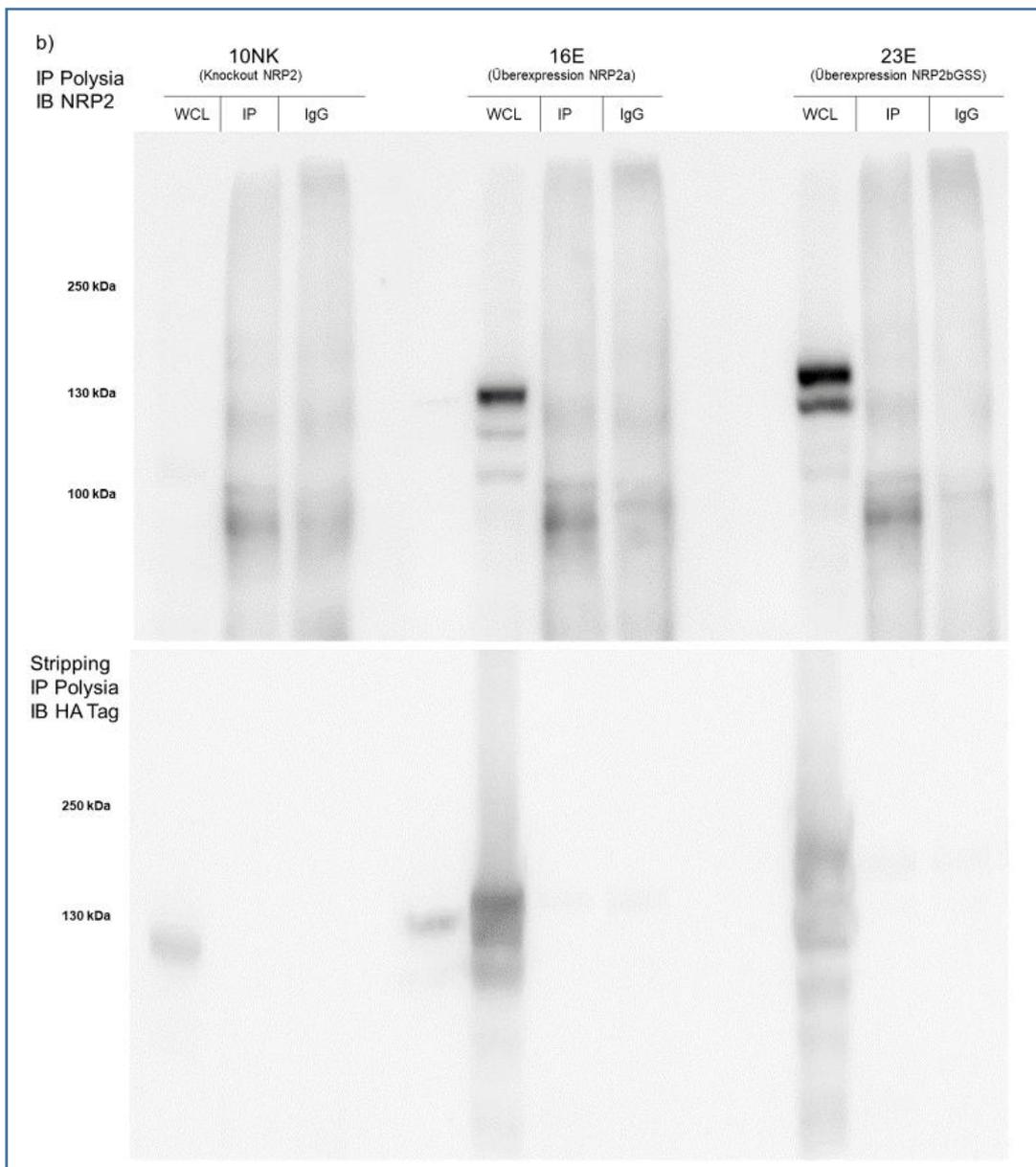
**Anhang 4:** Immunpräzipitation von Polysia in den vier zuvor ausgewählten Blasenkarzinomzelllinien mit anschließender Detektion von NRP2 (a) und Polysia (b) (siehe Abb. 9).



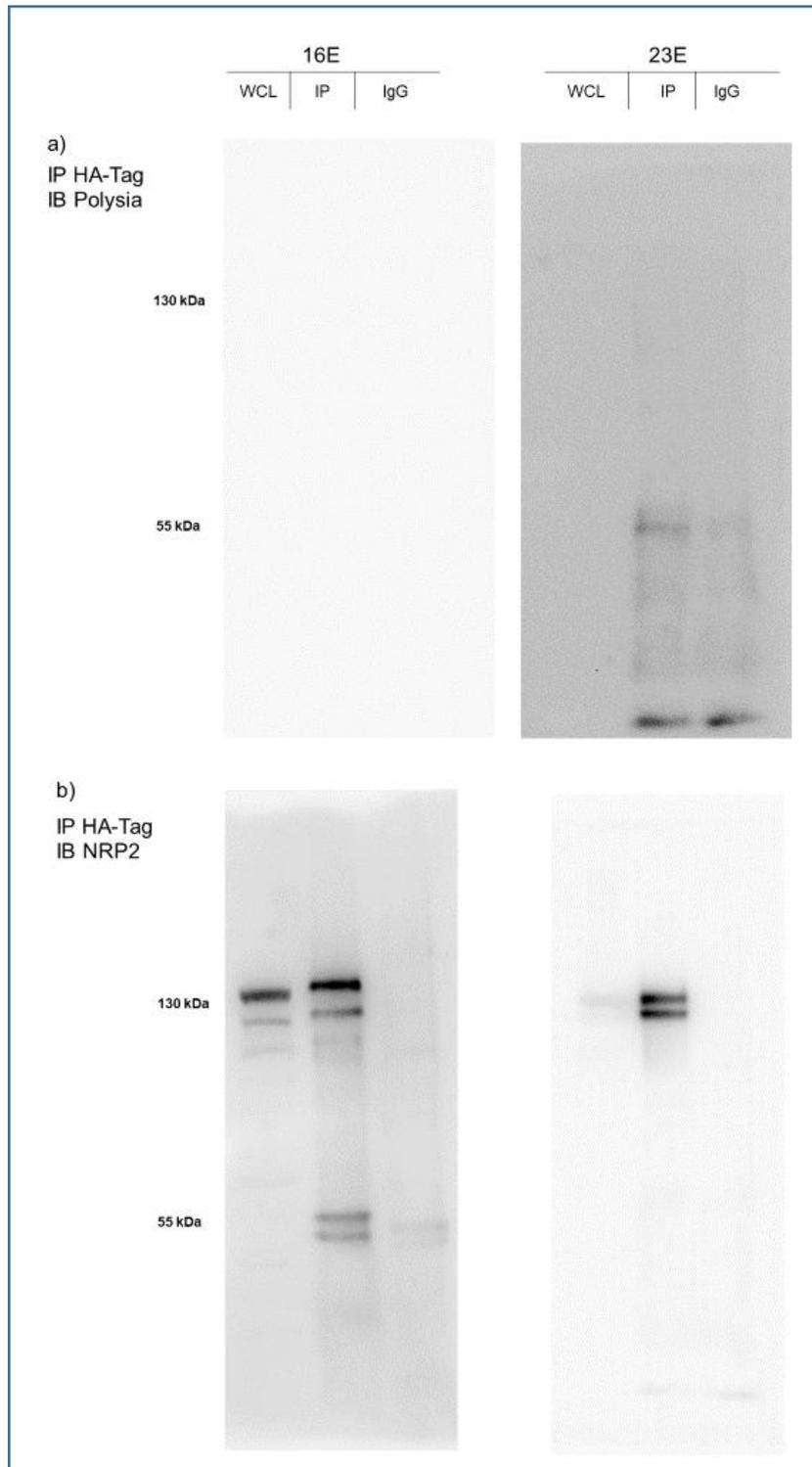
**Anhang 5:** Knockdown von NRP2 in J82 (siehe Abb. 10).



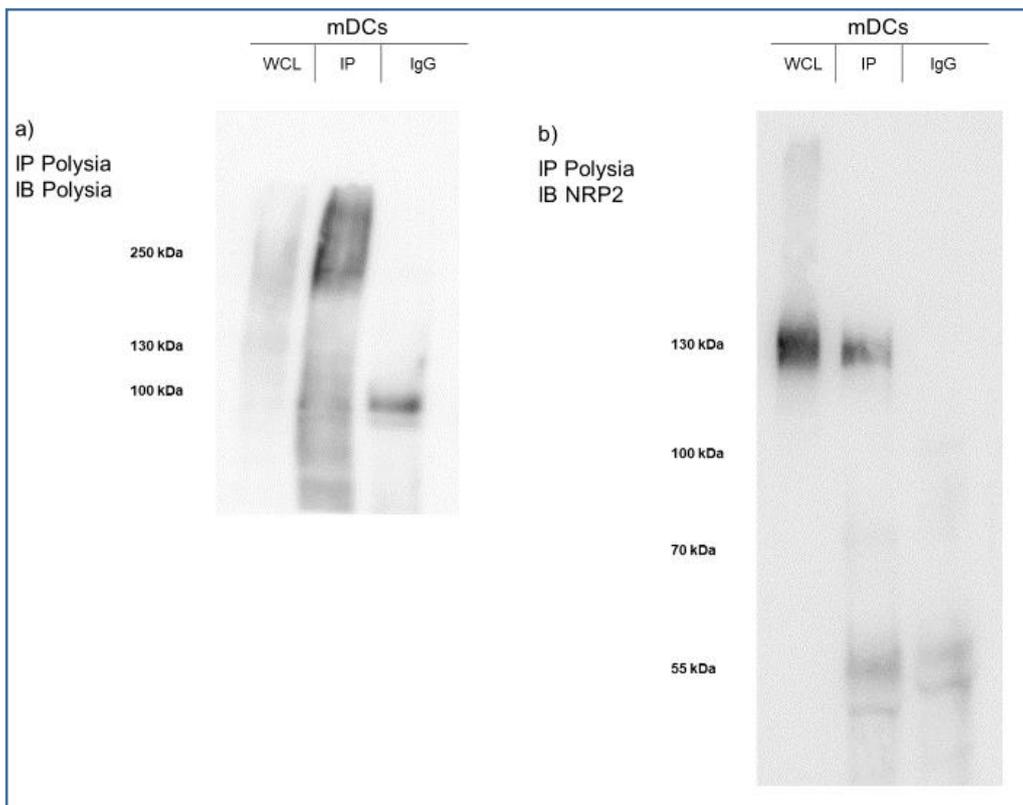
**Anhang 6:** Immunpräzipitation transfizierter J82-Zellen (siehe Abb. 11).



**Anhang 7:** Untersuchung NRP2-überexprimierender Zellen (siehe Abb. 12).



**Anhang 8:** Immunpräzipitation von HA-getagtem NRP2 mit Detektion von Polysia (a) und NRP2 (b) (siehe Abb. 13).



**Anhang 9:** Reife dendritische Zellen als Positivkontrolle für polysialyliertes NRP2 (siehe Abb. 15).

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Inzidenz und Mortalität verschiedener Karzinome	10
Abb. 2:	Infiltrationsgrade von Harnblasenkarzinomen gemäß der TNM-Klassifikation	13
Abb. 3:	Die verschiedenen Isoformen von NRP2	17
Abb. 4:	NRP2: Aufbau und Polysialylierung	24
Abb. 5:	Etablierung des Antikörpers anti-Polysialic acid clone 735	47
Abb. 6:	Expression von NRP2, Polysia und NCAM1 in ausgewählten Blasenkarzinomzellen sowie UROtsa (gesundes Urothel)	49
Abb. 7:	Relative mRNA-Expression der Blasenkarzinomzelllinien und UROtsa mit Analyse der Expression von NRP2, NCAM1 sowie der Transferasen ST8Sia2 und ST8Sia4 mittels RT-qPCR	50
Abb. 8:	Immunpräzipitation von Polysia in U251MG	51
Abb. 9:	Immunpräzipitation von Polysia in den vier zuvor ausgewählten Blasenkarzinomzelllinien mit anschließender Detektion von NRP2	52
Abb. 10:	Knockdown von NRP2 in vier ausgewählten Blasenkarzinom-Zelllinien	53
Abb. 11:	Immunpräzipitation transfizierter J82-Zellen	54
Abb. 12:	Untersuchung NRP2-überexprimierender Zellen	55
Abb. 13:	Immunpräzipitation von HA-getagtem NRP2 mit Detektion von Polysia und NRP2	56
Abb. 14:	Immunpräzipitation von NRP2 in SCaBER und J82 mit Detektion von NRP2 und Polysia	57
Abb. 15:	Reife dendritische Zellen als Positivkontrolle für polysialyliertes NRP2	58
Abb. 16:	Behandlung von U251MG und dendritischen Zellen mit PNGase F	59
Abb. 17:	Immunhistochemische Untersuchung von Tissue Microarrays von Blasenkarzinomen	60

Abb. 18: RT-PCR der Blasenkarzinomzelllinien und UROtsa mit Analyse der Expression von Golgi Glykoprotein-1 (GLG1) 61

## 8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Verwendete Zelllinien	26
Tab. 2:	Verwendete Reagenzien und Substanzen	27
Tab. 3:	Verwendete Puffer und Lösungen	30
Tab. 4:	Verwendete Kits	31
Tab. 5:	Verwendete Primäre Antikörper	32
Tab. 6:	Verwendete Sekundäre Antikörper	33
Tab. 7:	Verwendete siRNAs	34
Tab. 8:	Verwendete Primer	34
Tab. 9:	Verwendete Materialien und Hilfsmittel	35
Tab. 10:	Verwendete Geräte	36
Tab. 11:	Verwendete Software	38
Tab. 12:	Zusammensetzung der Reagenzien für die Zellkultur	38
Tab. 13:	Konzentrationen der Standardreihe zur Bestimmung mittels BCA-Assay	40
Tab. 14:	Zusammensetzung der Gele für SDS-PAGE	40
Tab. 15:	Zellzahlen und Volumina für die siRNA-Transfektion	43
Tab. 16:	Zyklusabläufe der RT-qPCR	45

## 9. Literaturverzeichnis

Al-Saraireh YMJ, Sutherland M, Springett BR, Freiburger F, Ribeiro Morais G, Loadman PM, Errington RJ, Smith PJ, Fukuda M, Gerardy-Schahn R, Patterson LH, Shnyder SD, Falconer RA. Pharmacological inhibition of polysialyltransferase ST8Siall modulates tumour cell migration. *PLoS one* 2013; 8: e73366

Angata K, Chan D, Thibault J, Fukuda M. Molecular dissection of the ST8Sia IV polysialyltransferase. Distinct domains are required for neural cell adhesion molecule recognition and polysialylation. *J Bio Chem* 2004a; 279: 25883–25890

Angata K, Fukuda M. Roles of polysialic acid in migration and differentiation of neural stem cells. *Methods Enzymol* 2010; 479: 25–36

Angata K, Huckaby V, Ranscht B, Terskikh A, Marth JD, Fukuda M. Polysialic acid-directed migration and differentiation of neural precursors are essential for mouse brain development. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 6659–6668

Angata K, Long JM, Bukalo O, Lee W, Dityatev A, Wynshaw-Boris A, Schachner M, Fukuda M, Marth JD. Sialyltransferase ST8Sia-II assembles a subset of polysialic acid that directs hippocampal axonal targeting and promotes fear behavior. *J Biol Chem* 2004b; 279: 32603–32613

Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol* 2017; 71: 96–108

Azevedo R, Peixoto A, Gaitero C, Fernandes E, Neves M, Lima L, Santos LL, Ferreira JA. Over forty years of bladder cancer glycobiology: Where do glycans stand facing precision oncology? *Oncotarget* 2017; 8: 91734–91764

Bhide GP, Colley KJ. Sialylation of N-glycans: mechanism, cellular compartmentalization and function. *Histochem Cell Biol* 2017; 147: 149–174

Bhide GP, Fernandes NRJ, Colley KJ. Sequence Requirements for Neuropilin-2 Recognition by ST8SialV and Polysialylation of Its O-Glycans. *J Biol Chem* 2016; 291: 9444–9457

Bhide GP, Zapater JL, Colley KJ. Autopolysialylation of polysialyltransferases is required for polysialylation and polysialic acid chain elongation on select glycoprotein substrates. *J Biol Chem* 2018; 293: 701–716

Bian X, Yang Z, Feng H, Sun H, Liu Y. A Combination of Species Identification and STR Profiling Identifies Cross-contaminated Cells from 482 Human Tumor Cell Lines. *Sci Rep* 2017; 7: 9774

Borchardt H, Schulz A, Datta K, Muders MH, Aigner A. Silencing of Neuropilins and GIPC1 in pancreatic ductal adenocarcinoma exerts multiple cellular and molecular antitumor effects. *Sci Rep* 2019; 9: 15471

Campodónico PB, Bal de Kier Joffé ED, Urtreger AJ, Lauria LS, Lastiri JM, Puricelli LI, Todaro LB. The neural cell adhesion molecule is involved in the metastatic capacity in a murine model of lung cancer. *Mol Carcinog* 2010; 49: 386–397

Capes-Davis A, Reid YA, Kline MC, Storts DR, Strauss E, Dirks WG, Drexler HG, MacLeod RAF, Sykes G, Kohara A, Nakamura Y, Elmore E, Nims RW, Alston-Roberts C, Barallon R, Los GV, Nardone RM, Price PJ, Steuer A, Thomson J, Masters JRW, Kerrigan L. Match criteria for human cell line authentication: where do we draw the line? *Int J Cancer* 2013; 132: 2510–2519

Carrascal MA, Talina C, Borralho P, Mineiro AG, Henriques AR, Pen C, Martins M, Braga S, Sackstein R, Videira PA. Staining of E-selectin ligands on paraffin-embedded sections of tumor tissue. *BMC cancer* 2018; 18: 495

Chen Y, Ren H, Zhang N, Troy FA, Wang B. Biochemical Characterization and Analyses of Polysialic-Acid-Associated Carrier Proteins and Genes in Piglets during Neonatal Development. *Chembiochem* 2017; 18: 1270–1278

Colley KJ, Kitajima K, Sato C. Polysialic acid: biosynthesis, novel functions and applications. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 2014; 49: 498–532

Cox EC, Thornlow DN, Jones MA, Fuller JL, Merritt JH, Paszek MJ, Alabi CA, DeLisa MP. Antibody-Mediated Endocytosis of Polysialic Acid Enables Intracellular Delivery and Cytotoxicity of a Glycan-Directed Antibody-Drug Conjugate. *Cancer Res* 2019; 79: 1810–1821

Curreli S, Arany Z, Gerardy-Schahn R, Mann D, Stamatou NM. Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions. *J Biol Chem* 2007; 282: 30346–30356

Dallas NA, Gray MJ, Xia L, Fan F, van Buren G, Gaur P, Samuel S, Lim SJ, Arumugam T, Ramachandran V, Wang H, Ellis LM. Neuropilin-2-mediated tumor growth and angiogenesis in pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 8052–8060

Daniel L, Durbec P, Gautherot E, Rouvier E, Rougon G, Figarella-Branger D. A nude mice model of human rhabdomyosarcoma lung metastases for evaluating the role of polysialic acids in the metastatic process. *Oncogene* 2001; 20: 997–1004

Eckhardt M, Bukalo O, Chazal G, Wang L, Goridis C, Schachner M, Gerardy-Schahn R, Cremer H, Dityatev A. Mice Deficient in the Polysialyltransferase ST8SialIV/PST-1 Allow Discrimination of the Roles of Neural Cell Adhesion Molecule Protein and Polysialic Acid in Neural Development and Synaptic Plasticity. *J Neurosci* 2000; 20: 5234–5244

Falconer RA, Errington RJ, Shnyder SD, Smith PJ, Patterson LH. Polysialyltransferase: a new target in metastatic cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2012; 12: 925–939

Finne J. Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain. *J Biol Chem* 1982; 257: 11966–11970

Finne J, Finne U, Deagostini-Bazin H, Goridis C. Occurrence of alpha 2-8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 112: 482–487

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. Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 10250–10255

Gemmill RM, Nasarre P, Nair-Menon J, Cappuzzo F, Landi L, D’Incecco A, Uramoto H, Yoshida T, Haura EB, Armeson K, Drabkin HA. The neuropilin 2 isoform NRP2b uniquely supports TGF $\beta$ -mediated progression in lung cancer. *Sci Signal* 2017; 10: eaag0528

Giger RJ, Cloutier JF, Sahay A, Prinjha RK, Levensgood DV, Moore SE, Pickering S, Simmons D, Rastan S, Walsh FS, Kolodkin AL, Ginty DD, Geppert M. Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron* 2000; 25: 29–41

Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 871–882

Goel HL, Pursell B, Chang C, Shaw LM, Mao J, Simin K, Kumar P, Vander Kooi CW, Shultz LD, Greiner DL, Norum JH, Toftgard R, Kuperwasser C, Mercurio AM. GLI1 regulates a novel neuropilin-2/ $\alpha$ 6 $\beta$ 1 integrin based autocrine pathway that contributes to breast cancer initiation. *EMBO Mol Med* 2013; 5: 488–508

Gray MJ, van Buren G, Dallas NA, Xia L, Wang X, Yang AD, Somcio RJ, Lin YG, Lim S, Fan F, Mangala LS, Arumugam T, Logsdon CD, Lopez-Berestein G, Sood AK, Ellis LM. Therapeutic targeting of neuropilin-2 on colorectal carcinoma cells implanted in the murine liver. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 109–120

Handa A, Tokunaga T, Tsuchida T, Lee YH, Kijima H, Yamazaki H, Ueyama Y, Fukuda H, Nakamura M. Neuropilin-2 expression affects the increased vascularization and is a prognostic factor in osteosarcoma. *Int J Oncol* 2000; 17: 291–295

Heimburg-Molinaro J, Lum M, Vijay G, Jain M, Almogren A, Rittenhouse-Olson K. Cancer vaccines and carbohydrate epitopes. *Vaccine* 2011; 29: 8802–8826

Hönscheid P, Datta K, Muders MH. Autophagy: detection, regulation and its role in cancer and therapy response. *Int J Radial Biol* 2014; 90: 628–635

James WM, Agnew WS. Multiple oligosaccharide chains in the voltage-sensitive Na channel from *Electrophorus electricus*: evidence for alpha-2,8-linked polysialic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 148: 817–826

Kamoun A, Reyniès A de, Allory Y, Sjö Dahl G, Robertson AG, Seiler R, Hoadley KA, Groeneveld CS, Al-Ahmadie H, Choi W, Castro MAA, Fontugne J, Eriksson P, Mo Q, Kardos J, Zlotta A, Hartmann A, Dinney CP, Bellmunt J, Powles T, Malats N, Chan KS, Kim WY, McConkey DJ, Black PC, Dyrskjø t L, Höglund M, Lerner SP, Real FX, Radvanyi F. A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol* 2020; 77: 420–433

Kawakami T, Tokunaga T, Hatanaka H, Kijima H, Yamazaki H, Abe Y, Osamura Y, Inoue H, Ueyama Y, Nakamura M. Neuropilin 1 and neuropilin 2 co-expression is significantly correlated with increased vascularity and poor prognosis in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2002; 95: 2196–2201

Keck B, Wach S, Taubert H, Zeiler S, Ott OJ, Kunath F, Hartmann A, Bertz S, Weiss C, Hönscheid P, Schellenburg S, Rödel C, Baretton GB, Sauer R, Fietkau R, Wullich B, Krause FS, Datta K, Muders MH. Neuropilin-2 and its ligand VEGF-C predict treatment response after transurethral resection and radiochemotherapy in bladder cancer patients. *Int J Cancer* 2015; 136: 443–451

Kiermaier E, Moussion C, Veldkamp CT, Gerardy-Schahn R, Vries I de, Williams LG, Chaffee GR, Phillips AJ, Freiburger F, Imre R, Taleski D, Payne RJ, Braun A, Förster R, Mechtler K, Mühlenhoff M, Volkman BF, Sixt M. Polysialylation controls dendritic cell trafficking by regulating chemokine recognition. *Science* 2016; 351: 186–190

Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nature reviews. Cancer* 2015; 15: 25–41

Krug LM, Ragupathi G, Hood C, George C, Hong F, Shen R, Abrey L, Jennings HJ, Kris MG, Livingston PO. Immunization with N-propionyl polysialic acid-KLH conjugate in patients with small cell lung cancer is safe and induces IgM antibodies reactive with SCLC cells and bactericidal against group B meningococci. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61: 9–18

Kudo M, Kitajima K, Inoue S, Shiokawa K, Morris HR, Dell A, Inoue Y. 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 Biochem* 1996; 271: 32667

Läubli H, Borsig L. Selectins promote tumor metastasis. *Semin Cancer Biol* 2010; 20: 169–177

Loers G, Saini V, Mishra B, Gul S, Chaudhury S, Wallqvist A, Kaur G, Schachner M. Vinorelbine and epirubicin share common features with polysialic acid and modulate neuronal and glial functions. *J Neurochem* 2016; 136: 48–62

Loers G, Saini V, Mishra B, Papastefanaki F, Lutz D, Chaudhury S, Ripoll DR, Wallqvist A, Gul S, Schachner M, Kaur G. Nonyloxytryptamine mimics polysialic acid and modulates neuronal and glial functions in cell culture. *J Neurochem* 2014; 128: 88–100

Luke MP-S, Brown RE, Clarke DB. Polysialylated - neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) promotes recovery of vision after the critical period. *Mol Cell Neurosci* 2020; 107: 103527

Markovic O, Markovic N. Cell cross-contamination in cell cultures: The silent and neglected danger. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*; 1998; 34: 1–8

Matkar PN, Jong ED, Ariyagunaratnam R, Prud'homme GJ, Singh KK, Leong-Poi H. Jack of many trades: Multifaceted role of neuropilins in pancreatic cancer. *Cancer Med*. 2018; 7: 5036–5046

Mehrabian M, Hildebrandt H, Schmitt-Ulms G. NCAM1 Polysialylation: The Prion Protein's Elusive Reason for Being? *ASN Neuro* 2016; 8: 1759091416679074

Mercurio AM. VEGF/Neuropilin Signaling in Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 490

Mhaweche-Fauceglia P, Ali L, Cheney RT, Groth J, Herrmann FR. Prognostic significance of neuron-associated protein expression in non-muscle-invasive urothelial bladder cancer. *J Clin Pathol* 2009; 62: 710–714

Mori A, Hane M, Niimi Y, Kitajima K, Sato C. Different properties of polysialic acids synthesized by the polysialyltransferases ST8SIA2 and ST8SIA4. *Glycobiology* 2017; 27: 834–846

Muders MH, Baretton GB. Die metastatische Nische. Mechanismen und prognostische Implikationen. *Der Pathologe* 2015; 36: 185–188

Mühlenhoff M, Rollenhagen M, Werneburg S, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. Polysialic acid: versatile modification of NCAM, SynCAM 1 and neuropilin-2. *Neurochem Res* 2013; 38: 1134–1143

Muz B, Abdelghafer A, Markovic M, Yavner J, Melam A, Salama NN, Azab AK. Targeting E-selectin to Tackle Cancer Using Uproleselan. *Cancers* 2021; 13: 335

Ni Q, Sun J, Ma C, Li Y, Ju J, Sun M. The Neuropilins and Their Ligands in Hematogenous Metastasis of Salivary Adenoid Cystic Carcinoma - An Immunohistochemical Study. *Journal of oral and maxillofacial surgery: J Oral Maxillofac Surg* 2018; 76: 569–579

Niland S, Eble JA. Neuropilins in the Context of Tumor Vasculature. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 639

O'Toole CM, Povey S, Hepburn P, Franks LM. Identity of some human bladder cancer cell lines. *Nature* 1983; 301: 429–430

Paulis A de, Prevede N, Fiorentino I, Rossi FW, Staibano S, Montuori N, Ragno P, Longobardi A, Liccardo B, Genovese A, Ribatti D, Walls AF, Marone G. Expression and functions of the vascular endothelial growth factors and their receptors in human basophils. *J Immunol* 177: 7322–7331

Peng K, Bai Y, Zhu Q, Hu B, Xu Y. Targeting VEGF-neuropilin interactions: a promising antitumor strategy. *Drug Discov Today* 2019; 24: 656–664

Prud'homme GJ, Glinka Y. Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* 2012; 3: 921–939

Pshezhetsky AV, Ashmarina M. Keeping it trim: roles of neuraminidases in CNS function. *Glycoconj J* 2018; 35: 375–386

Rey-Gallardo A, Delgado-Martín C, Gerardy-Schahn R, Rodríguez-Fernández JL, Vega MA. Polysialic acid is required for neuropilin-2a/b-mediated control of CCL21-driven chemotaxis of mature dendritic cells and for their migration in vivo. *Glycobiology* 2011; 21: 655–662

Rey-Gallardo A, Escribano C, Delgado-Martín C, Rodríguez-Fernández JL, Gerardy-Schahn R, Rutishauser U, Corbi AL, Vega MA. Polysialylated neuropilin-2 enhances human dendritic cell migration through the basic C-terminal region of CCL21. *Glycobiology* 2010; 20: 1139–1146

Rollenhagen M, Buettner FFR, Reismann M, Jirmo AC, Grove M, Behrens GMN, Gerardy-Schahn R, Hanisch F-G, Mühlhoff M. Polysialic acid on neuropilin-2 is exclusively synthesized by the polysialyltransferase ST8SialIV and attached to mucin-type o-glycans located between the b2 and c domain. *J Biol Chem* 2013; 288: 22880–22892

Roth J, Zuber C, Wagner P, Taatjes DJ, Weisgerber C, Heitz PU, Goridis C, Bitter-Suermann D. Reexpression of poly(sialic acid) units of the neural cell adhesion molecule in Wilms tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 2999–3003

Roy S, Bag AK, Dutta S, Polavaram NS, Islam R, Schellenburg S, Banwait J, Guda C, Ran S, Hollingsworth MA, Singh RK, Talmadge JE, Muders MH, Batra SK, Datta K. Macrophage-Derived Neuropilin-2 Exhibits Novel Tumor-Promoting Functions. *Cancer Res* 2018; 78: 5600–5617

Saini V, Lutz D, Kataria H, Kaur G, Schachner M, Loers G. The polysialic acid mimetics 5-nonyloxytryptamine and vinorelbine facilitate nervous system repair. *Sci Rep* 2016; 6: 26927

Sanli O, Dobruch J, Knowles MA, Burger M, Alemozaffar M, Nielsen ME, Lotan Y. Bladder cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 3: 17022

Sato C, Hane M, Kitajima K. Relationship between ST8SIA2, polysialic acid and its binding molecules, and psychiatric disorders. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1860: 1739–1752

Sato C, Kitajima K. Polysialylation and disease. *Mol Aspects Med* 2020; 79: 100892

Schellenburg S, Schulz A, Poitz DM, Muders MH. Role of neuropilin-2 in the immune system. *Mol Immunol* 2017; 90: 239–244

Schulz A, Gorodetska I, Behrendt R, Fuessel S, Erdmann K, Foerster S, Datta K, Mayr T, Dubrovskaja A, Muders MH. Linking NRP2 With EMT and Chemoradioresistance in Bladder Cancer. *Front Oncol* 2019; 9: 1461

Shah JB, McConkey DJ, Dinney CPN. New strategies in muscle-invasive bladder cancer: on the road to personalized medicine. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 2608–2612

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, *CA Cancer J Clin* 2020; 70: 7–30

Stamatos NM, Zhang L, Jokilammi A, Finne J, Chen WH, El-Maarouf A, Cross AS, Hankey KG. Changes in polysialic acid expression on myeloid cells during differentiation and recruitment to sites of inflammation: role in phagocytosis. *Glycobiology* 2014; 24: 864–879

Stanton MJ, Dutta S, Polavaram NS, Roy S, Muders MH, Datta K. Angiogenic growth factor axis in autophagy regulation. *Autophagy* 2013a; 9: 789–790

Stanton MJ, Dutta S, Zhang H, Polavaram NS, Leontovich AA, Hönscheid P, Sinicrope FA, Tindall DJ, Muders MH, Datta K. Autophagy control by the VEGF-C/NRP-2 axis in cancer and its implication for treatment resistance. *Cancer Res* 2013b; 73: 160–171

Stein DM, Robbins J, Miller MA, Lin F-YC, Schneerson R. Are antibodies to the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* group B and *Escherichia coli* K1 associated with immunopathology? *Vaccine* 2006; 24: 221–228

Stummeyer K, Dickmanns A, Mühlenhoff M, Gerardy-Schahn R, Ficner R. Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12: 90–96

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71: 209-249

Suzuki M, Suzuki M, Nakayama J, Suzuki A, Angata K, Chen S, Sakai K, Hagihara K, Yamaguchi Y, Fukuda M. Polysialic acid facilitates tumor invasion by glioma cells. *Glycobiology* 2005; 15: 887–894

Tanaka F, Otake Y, Nakagawa T, Kawano Y, Miyahara R, Li M, Yanagihara K, Nakayama J, Fujimoto I, Ikenaka K, Wada H. Expression of polysialic acid and STX, a human polysialyltransferase, is correlated with tumor progression in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 3072–3080

Valentiner U, Mühlhoff M, Lehmann U, Hildebrandt H, Schumacher U. Expression of the neural cell adhesion molecule and polysialic acid in human neuroblastoma cell lines. *Int J Oncol* 2011; 39: 417–424

Vasquez E, Cristofaro V, Lukianov S, Burkhard FC, Gheinani AH, Monastyrskaya K, Bielenberg DR, Sullivan MP, Adam RM. Deletion of neuropilin 2 enhances detrusor contractility following bladder outlet obstruction. *JCI insight* 2017; 2: e90617

Wang X, Li X, Zeng Y-N, He F, Yang X-M, Guan F. Enhanced expression of polysialic acid correlates with malignant phenotype in breast cancer cell lines and clinical tissue samples. *Int J Mol Med* 2016; 37: 197–206

Weinhold B, Seidenfaden R, Röckle I, Mühlhoff M, Schertzinger F, Conzelmann S, Marth JD, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 2005; 280: 42971–42977

Werneburg S, Buettner FFR, Erben L, Mathews M, Neumann H, Mühlenhoff M, Hildebrandt H. Polysialylation and lipopolysaccharide-induced shedding of E-selectin ligand-1 and neuropilin-2 by microglia and THP-1 macrophages. *Glia* 2016; 64: 1314–1330

Werneburg S, Mühlenhoff M, Stangel M, Hildebrandt H. Polysialic acid on SynCAM 1 in NG2 cells and on neuropilin-2 in microglia is confined to intracellular pools that are rapidly depleted upon stimulation. *Glia* 2015; 63: 1240–1255

Willmroth F, Beaudet AL. Structure of the murine E-selectin ligand 1 (ESL-1) gene and assignment to Chromosome 8. *Mammalian genome: Mamm Genome* 1999; 10: 1085–1088

Wu J, Zhan X, Liu L, Xia X. Bioproduction, purification, and application of polysialic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018; 102: 9403–9409

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

Yasmin-Karim S, King MR, Messing EM, Lee Y-F. E-selectin ligand-1 controls circulating prostate cancer cell rolling/adhesion and metastasis. *Oncotarget* 2014; 5: 12097–12110

Zhang Y, Ghadiri-Sani M, Zhang X, Richardson PM, Yeh J, Bo X. Induced expression of polysialic acid in the spinal cord promotes regeneration of sensory axons. *Mol Cell Neurosci* 2007; 35: 109–119

Zhu X, Chen Y, Zhang N, Zheng Z, Zhao F, Liu N, Lv C, Troy FA, Wang B. Molecular characterization and expression analyses of ST8Sia II and IV in piglets during postnatal development: lack of correlation between transcription and posttranslational levels. *Glycoconj J* 2015; 32: 715–728

Zuiverloon TCM, Jong FC de, Costello JC, Theodorescu D. Systematic Review: Characteristics and Preclinical Uses of Bladder Cancer Cell Lines. *Bladder cancer* 2018; 4: 169–183

Zuiverloon TCM, Tjin SS, Busstra M, Bangma CH, Boevé ER, Zwarthoff EC. Optimization of nonmuscle invasive bladder cancer recurrence detection using a urine based FGFR3 mutation assay. *J Urol* 2011; 186: 707–712

## 10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Michael Muders für die Überlassung des Themas der Arbeit, die hilfreichen Diskussionen und konstruktiven Ratschläge sowie die Expertise und Geduld in der Umsetzung.

Zudem richte ich meinen außerordentlichen Dank an Dr. Sarah Förster und Dr. Thomas Mayr, die mich eingearbeitet und mich nicht nur während der 10 Monate Laborarbeit hervorragend betreut und kompetent unterstützt haben. Sie standen mir immer ermutigend und beratend zur Seite und sorgten für eine familiäre Atmosphäre und Freude an der Arbeit.

Ich danke Fr. Steiner aus dem pathologischen Institut des Uniklinikums Bonn für die Anfertigung der Schnittpräparate und deren Färbung.

Mein Dank gilt meinem Partner Fabian, meinen Eltern sowie meinen Geschwistern Sarah, Yasmin, Juliana, Maxim und Leon, die mich fortwährend unterstützt und mich für meinen beruflichen Werdegang motiviert haben.

Von Herzen danke ich meiner Tante Marion, die mich immer wieder aufgemuntert und angespornt hat, bevor sie am Morgen der Abgabe dieser Dissertation plötzlich verstarb. Sie ist und bleibt ein Vorbild für mich und hat durch positive Worte wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen.