

# **Analyse der Bindungsspezifität zwischen humanen Sialinsäure-bindenden Lektin Rezeptoren und Polysialinsäuren**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Philippe Johann Kruse**

aus Ratingen

2024

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Harald Neumann
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Schweizer

Tag der Mündlichen Prüfung: 24.06.2024

Aus dem Institut für Rekonstruktive Neurobiologie  
Direktor: Prof. Dr. Oliver Brüstle

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>11</b>
1.1 Das Immunsystem des zentralen Nervensystems.....	11
1.1.1 Besonderheiten des zentralen Nervensystems .....	11
1.1.2 Mikrogliazellen – Hauptvertreter des Immunsystems im zentralen Nervensystem. 13	
1.1.3 Inflammaging – Veränderungen des Immunsystems im Alter .....	15
1.1.4 Altersbedingte Entzündungsreaktionen bei neurodegenerativen Erkrankungen ....	16
1.2 Sialinsäure-bindende Immunglobulin-ähnliche Lektine .....	17
1.2.1 Evolutionäre Entwicklung der Sialinsäure-bindenden Immunglobulin-ähnlichen Lektine.....	17
1.2.2 Struktureller Aufbau der Sialinsäure-bindenden Immunglobulin-ähnlichen Lektine	19
1.2.3 Signalkaskade der Sialinsäure-bindenden Immunglobulin-ähnlichen Lektine .....	22
1.2.4 SIGLEC-11 – Ein besonderes Mitglied der Sialinsäure-bindenden Immunglobulin-ähnlichen Lektine .....	23
1.2.5 Sialinsäure – Der Ligand von Sialinsäure-bindenden Immunglobulin-ähnlichen Lektinen.....	25
1.2.6 Sialinsäure als Bestandteil der Glykokalyx.....	28
1.2.7 Das Sialom – Die Gesamtheit der Sialinsäuren.....	29
1.3 Sialinsäure-SIGLEC Achse .....	30
1.3.1 Funktion der Sialinsäure-SIGLEC Achse im ZNS.....	30
1.3.2 Rolle der Sialinsäure-SIGLEC Achse bei der Entstehung von ZNS-Erkrankungen	31
1.3.3 Sialinsäure-SIGLEC Achse als Therapieansatz .....	32

1.3.4	Weitere immunologische Signalwege der Sialinsäure .....	34
1.4	Fragestellung.....	36
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>38</b>
2.1	Klonierung des SIGLEC Fc-Fusionsplasmids.....	38
2.1.1	Planung .....	38
2.1.2	Restriktion und Ligation .....	40
2.1.3	Selektion und Überprüfung auf Mutationen .....	44
2.1.4	Amplifikation.....	46
2.2	Proteinbiosynthese der SIGLEC Fc-Fusionsproteine .....	47
2.2.1	Einführung in das Freestyle™ 293 Expressionssystem .....	47
2.2.2	Kultivierung der Freestyle™ 293-F Zellen .....	47
2.2.3	Transfektion der Freestyle™ 293-F Zellen .....	48
2.2.4	Nachweis der Synthese und Sezernierung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine.....	49
2.2.5	Aufreinigung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine .....	52
2.2.6	Aufbewahrung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine .....	55
2.2.7	Konzentrationsbestimmung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine .....	56
2.3	Messung der Bindungsspezifität von kurzkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11	57
2.3.1	Antigen-ELISA.....	58
2.3.2	Kompetitiver ELISA .....	60
2.3.3	Auswertung der ELISA .....	63
2.4	Herstellung von Polysialinsäure unterschiedlicher Polymerisierungsgrade .....	63
2.5	Materialien.....	63
2.5.1	Medium.....	63
2.5.2	Primer, Antikörper, Enzyme und Zellkultur .....	65

2.5.3	Chemikalien und Reagenzien.....	66
2.5.4	Software .....	68
2.5.5	Weiteres .....	68
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>70</b>
3.1	Klonierung der SIGLEC Fc-Fusionsplasmide.....	70
3.2	Proteinbiosynthese der SIGLEC Fc-Fusionsproteine .....	73
3.2.1	Verifizierung der Proteinbiosynthese der SIGLEC Fc-Fusionsproteine .....	73
3.2.2	Verifizierung der Sekretion der SIGLEC Fc-Fusionsproteine .....	74
3.3	Aufreinigung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine aus dem Zellkulturüberstand .....	75
3.3.1	Aufreinigung des SIGLEC-11 Fc-Fusionsproteins.....	75
3.3.2	Aufreinigung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine von SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10.....	78
3.4	Bindungsspezifität von Polysialinsäure zu SIGLEC-11 .....	82
3.4.1	Avidität zwischen SIGLEC-11 und langkettiger Polysialinsäure .....	82
3.4.2	Avidität zwischen SIGLEC-3, SIGLEC-5 sowie SIGLEC-10 und langkettiger Polysialinsäure .....	84
3.4.3	Bindungsstärke von kurzkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11 .....	86
3.4.4	Bindungsstärke von kurzkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10.....	88
3.4.5	Bindungsstärke von langkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11 .....	91
3.4.6	Bindungsstärke von langkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10.....	92
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>95</b>
4.1	Etablierung eines Protokolls zur Proteinbiosynthese von SIGLEC Fc-Fusionsproteinen.....	97

4.1.1	Klonierung des SIGLEC Fc-Fusionsplasmids zur Proteinbiosynthese der SIGLEC Fc-Fusionsproteine.....	97
4.1.2	HEK 293-F Zellen können SIGLEC Fc-Fusionsproteine synthetisieren und sezernieren.....	99
4.1.3	Etablierung eines Protokolls zur Aufreinigung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine ..	101
4.2	Analyse der Bindungsspezifität von SIGLEC-11 zu kurzkettiger Polysialinsäure .	102
4.2.1	Etablierung eines kompetitiven ELISA zur Analyse der Bindungsstärke .....	103
4.2.2	SIGLEC-11 bindet spezifisch an kurzkettige Polysialinsäure .....	104
4.2.3	Langkettige Polysialinsäure bindet unspezifisch an SIGLEC-11 .....	105
4.2.4	Bindungsspezifität von Polysialinsäure zu SIGLEC-11 in Abhängigkeit des Polymerisierungsgrads von Polysialinsäure .....	107
4.3	Limitationen bei der Untersuchung der Bindungsstärke .....	108
4.4	Ausblick: Kurzkettige Polysialinsäure - Ein Medikament für neurodegenerative Erkrankungen? .....	112
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>115</b>
<b>6.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>117</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>120</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>122</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>150</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A $\beta$	Amyloid- $\beta$
BCA-Assay	Bicinchoninsäure-Assay
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
CD33	Oberflächenmerkmal 33
CMAH	Cytidin-Monophospho-N-Acetylneuraminsäure-Hydroxylase
CMP-Neu5Ac	Cytosin-5'-Monophosphat-N-Acetylneuraminsäure
CMP-Neu5Ac-Synthetase	Cytosin-5'-Monophosphat-N-Acetylneuraminsäure-Synthetase
CMP-Neu5Gc	Cytosin-5'-Monophosphat-N-Glycolylneuraminsäure
CR3	Komplement Rezeptor 3
C2-Set Ig-Domäne	C2-Set Immunglobulin Domäne
DAMP	Schaden-assoziierte molekulare Muster
DAP10	DNAX-Aktivierungsprotein 10
DAP12	DNAX-Aktivierungsprotein 12
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung
ELISA	Enzymimmunoassay
GNE	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase
hEF1	Humaner Elongationsfaktors-1 $\alpha$

HEK 293 Zellen	Humane embryonale Nierenzellen
HEK 293-F fectin	293fectin™ Transfektionsreagenz für Freestyle™ HEK 293-F Zellen
HEK 293-F Medium	GIBCO® FreeStyle™ 293 Expressionsmedium zur Kultivierung von Freestyle™ HEK 293-F Zellen
HEK 293-F Zellen	Freestyle™ HEK 293-F Zellen
hIgG1-Fc	Fc-Region mit der CH2-Domäne und CH3-Domäne der humanen schweren Kette des Immunglobulin G1
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettich Peroxidase
HTLV	Humaner T-Zell-Leukämie-Virus
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G
IL2-Signalsequenz	Interleukin 2-Signalsequenz
ITAM	Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivatorsequenz
ITIM	Immunrezeptor-Tyrosin-Inhibitorsequenz
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
KDN	Deaminoneuraminsäure
ManNAc	N-Acetylmannosamin
ManNAc-6-P	N-Acetylmannosamin-6-Phosphat
NADPH-Oxidase	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül



Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Ac-9-Phosphat	N-Acetylneuraminsäure-9-Phosphat
Neu5Gc	N-Glycolylneuraminsäure
OD-Wert	Optische Dichte
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pIC <sub>50</sub>	Logarithmischer Wert der mittleren inhibitorischen Konzentration
polySia avDP20	Sialinsäure mit einer durchschnittlichen Polymerisierung von 20
rpm	Umdrehungen pro Minute
RIPA-Puffer	Radio-Immunpräzipitations-Assay-Puffer
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SAMP	Selbst-assoziierte molekulare Muster
SH2	Src-Homologie-Region-2-Domäne
SHP-1	SH2-Domäne enthaltende Tyrosinphosphatase-1
SHP-2	SH2-Domäne enthaltende Tyrosinphosphatase-2
SIGLEC	Sialinsäure-bindende Immunglobulin-ähnliche Lektine
SIRPβ1	Signal Regulator Protein-β1
SYK	Milztyrosinkinase
TBS-T	Trisgepufferte Saline mit Tween 20
TCC	Terminaler Komplementkomplex

TMB-Substrat	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substrat
TREM2	Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2
TRIS	Trometamol
TYROBP	Tyrosinkinase-bindendes Protein
UDP	Uridindiphosphat
UDP-GlcNAc	UDP-N-Acetylglucosamin
V-Set Ig-Domäne	V-Set Immunglobulin Domäne
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

Zur Einführung in die Thematik wird im ersten Abschnitt von diesem Kapitel das Immunsystem des zentralen Nervensystems (ZNS) näher betrachtet. Dabei wird auf die Besonderheiten und auf die Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen eingegangen. Ebenfalls wird das Konzept des Inflammaging vorgestellt. Die beiden folgenden Abschnitte geben einen Überblick zum einem über die Familie der Sialinsäure-bindende Immunglobulin-ähnliche Lektine (SIGLEC) und zum anderen über Sialinsäure, wobei das Hauptaugenmerk auf SIGLEC-11 und kurzkettige Sialinsäure liegen wird. Darauf aufbauend wird auf die Rolle der Sialinsäure-SIGLEC Achse bei der Pathogenese von altersbedingten Erkrankungen eingegangen. Weiterführend werden weitere immunologische Signalprozesse beschrieben, bei denen Sialinsäure einen anti-inflammatorischen Effekt zeigt. Abschließend wird die wissenschaftliche Fragestellung meiner Dissertation formuliert.

### 1.1 Das Immunsystem des zentralen Nervensystems

#### 1.1.1 Besonderheiten des zentralen Nervensystems

Das zentrale Nervensystem, dessen Funktionsfähigkeit vom störungsfreien Zusammenspiel der Neuronen abhängt, ist ein essenzielles Integrationsorgan des Menschen zur Steuerung von wesentlichen physiologischen Funktionen. Die Informationsübertragung zwischen den Neuronen erfolgt über Synapsen, die eine einzigartige biologische Kommunikationsmethode darstellt (Engelhardt und Coisne, 2011). Zur Sicherstellung einer störungsfreien Kommunikation der Neuronen ist die Aufrechterhaltung von definierten intra- sowie extrazellulären Umgebungsbedingungen erforderlich. Zum Erhalt der Integrität des neuronalen Systems ist die Mikroumgebung des ZNS durch eine Vielzahl an Mechanismen streng reguliert (Abbott et al., 2006). Ein relevanter Mechanismus ist die Blut-Hirn-Schranke (BHS), die eine regulierbare Barriere zwischen dem extravasalen Raum des ZNS und dem Blut darstellt. Neben der Gewährleistung der Homöostase im neuronalen Gewebe durch die Regulierung des Austauschs von Ionen, Molekülen und Zellen, verhindert die BHS auch das Übertreten von

schädigenden Plasmakomponenten effektiv (Abbott et al., 2006; Gloor et al., 2001; Rubin und Staddon, 1999). Die Grenze zwischen der Blutstrombahn und dem neuralen Gewebe bilden die neuralen Endothelzellen und tragen durch zwei wesentliche Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Homöostase bei. Zum einem sind diese über Tight Junctions, die eine besondere Form der Zell-Zell-Verbindung darstellen und auch Zonula occludens genannt werden, miteinander verbunden. Hierbei handelt es sich um gürtelförmig angeordnete Transmembranproteine, die als Diffusionsbarriere den unkontrollierten parazellulären Transport verhindern (Wolburg und Lippoldt, 2002). Zum anderen regulieren die neuralen Endothelzellen durch spezifische Transportsysteme und intrazelluläre sowie extrazelluläre Enzyme den transzellulären Transport von Molekülen und Botenstoffen. Voraussetzung für diese präzise gesteuerte Transzytose ist die aus dem komplexen Proteinnetzwerk der Tight Junctions gebildete Diffusionsbarriere (Abbott et al., 2006). Dieser besondere strukturelle Aufbau der BHS ist neben der Aufrechterhaltung der Homöostase auch für das Immunprivileg des neuralen Gewebes mitverantwortlich. Unter dem Begriff des neuralen Immunprivilegs wird verstanden, dass sich das ZNS insbesondere durch die strukturellen Besonderheiten der BHS von der Überwachung durch das Immunsystem abschirmen kann (Barker und Billingham, 1978; Ransohoff und Engelhardt, 2012; Neumann und Wekerle, 2013). Im ZNS wird die Immunüberwachung deshalb von Mikrogliazellen, die zu den ortsständigen Makrophagen zählen, übernommen (Nimmerjahn et al., 2005). Die Mikrogliazellen ermöglichen eine effektive Immunantwort gegen Krankheitserreger und Infektionen. Gleichzeitig halten sie durch eine gezielte Aktivierung der angeborenen und adaptiven Immunantwort die neurale Homöostase aufrecht (Ransohoff und Engelhardt, 2012; Neumann und Wekerle, 2013). Bei einer Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson ist die Funktion der BHS gestört, infolge dessen es zu einer relevanten Störungen der Mikroumgebung des ZNS und einem Verlust des Immunprivilegs kommt (Yamazaki und Kanekiyo, 2017; Chung et al., 2010). Das unkontrollierte Übertreten von Serumproteinen wie Immunglobulinen und anderen inflammatorischen Mediatoren in das neurale Gewebe bedingt infolge der Störung der Homöostase eine kontinuierliche Degeneration des neuralen Gewebes (Daneman, 2012). Eine Störung der BHS ist auch bei systemischen Erkrankungen wie dem Leberversagen, die in ausgeprägten Formen mit einer hepatischen Enzephalopathie

vergesellschaftet sein kann, oder bei Insulinresistenz bekannt (Daneman, 2012; Rhea und Banks, 2019).

### 1.1.2 Mikrogliazellen – Hauptvertreter des Immunsystems im zentralen Nervensystem

Die Vorläuferzellen der Mikrogliazellen stammen von primitiven myeloischen Progenitorzellen ab, die aus der embryonalen Hämatopoese stammen und in einem frühen Stadium der Embryonalentwicklung in das Primordium des Gehirns einwandern (Ginhoux et al., 2010; Neumann und Wekerle, 2013; Kierdorf et al., 2013). Nach der dauerhaften Ansiedlung arbeiten und vermehren sich diese als Vertreter der angeborenen Immunantwort während des gesamten Erwachsenenalters autonom (Neumann und Wekerle, 2013; Heneka et al., 2015; Baufeld et al., 2018). Mikrogliazellen gehören zur Gruppe der ortsansässigen Phagozyten und sind als Immunzellen der ersten Abwehrreihe ubiquitär im ZNS verteilt (Baufeld et al., 2018). Zu den vornehmlichen Aufgaben der Mikrogliazellen gehören der Erhalt der neuronalen Plastizität und neuralen Homöostase, die Verteidigung vor Pathogenen sowie dem Abtragen von extrazellulären Detritus (Sierra et al., 2013; Neumann et al., 2009; Hickman et al., 2018). Diesen Aufgaben kommen Mikrogliazellen durch eine kontinuierliche Überwachung der unmittelbaren Umgebung mit Hilfe von mobilen Zellfortsätzen und der Fähigkeit zu diesen Orten zu migrieren nach (Hickman et al., 2013; Zhan et al., 2014). Zum Erkennen von Veränderungen der Mikroumgebung besitzen Mikrogliazellen ein breites Repertoire an zellulären Rezeptoren auf ihren Zellfortsätzen, die bereits minimale Störungen der neuralen Homöostase detektieren können. Hierzu gehören beispielsweise molekulare Strukturen wie Schaden-assoziierte molekulare Muster (DAMP) als Zeichen für eine Gewebeverletzung oder Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP) als Hinweis auf eine Infektion (Stephenson et al., 2018). Das Erkennen von derartigen molekularen Stimuli aktiviert die Mikrogliazellen, wodurch pro-inflammatorische Zytokine produziert und eine immunologische Antwort initiiert werden (Hickman et al., 2018). Wenn gleich inflammatorische Prozesse im ZNS auf Grund der neuroprotektiven Wirkung gewünscht sind, begünstigt eine chronische Entzündungsreaktion die Pathogenese unterschiedlicher Erkrankungen. Insbesondere Menschen im höheren Lebensalter sind von

einer chronischen Entzündungsreaktion betroffen, weil Mikrogliazellen auf Grund von altersbedingten molekularen und genetischen Veränderungen ein gesteigertes Inflammationslevel zeigen. Diese sterile Inflammation wird auch als Inflammaging bezeichnet (Niraula et al., 2016). In diesem Kontext sind beispielsweise neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson zu erwähnen (Hickman et al., 2018).

Neben der Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen führt die Stimulierung von Mikrogliazellen ebenfalls zur Aktivierung von Signalwegen der Phagozytose. Während der Evolution sind die zellulären Signalwege der neuralen Phagozytose über verschiedene Spezies hinweg konserviert geblieben. Den Säugetieren gemeinsam ist, dass Rezeptoren zur Phagozytose häufig mit einem Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivatorsequenz (ITAM) enthaltenden Adapterprotein, wie DNAX-Aktivierungsprotein 12 (DAP12)/Tyrosinkinase-bindendes Protein (TYROBP), assoziiert sind. Bei Mikrogliazellen wird die Signalkaskade durch aktivierende Rezeptoren wie Komplement Rezeptor 3 (CR3), Signal Regulator Protein- $\beta$ 1 (SIRP $\beta$ 1) und Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 (TREM2) initiiert (Linnartz et al., 2012; Takahashi et al., 2005; Gaikwad et al., 2009). Die infolge der Bindung ausgelösten Signalkaskaden führen durch eine Aktivierung der Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen. So ist die Produktion von neurotoxischen Sauerstoffradikalen über DAP12 mit der späteinsetzenden Form des Morbus Alzheimers assoziiert. In Tiermodellen führt die Aktivierung von CR3 infolge von axonalen Schäden zu einer Autoimmun-Enzephalomyelitis (Davalos et al., 2012; Zhang et al., 2013). Die durch ITAM ausgelösten Signalkaskaden werden durch Immunrezeptor-Tyrosin-Inhibitorsequenz (ITIM) moduliert. Einige Vertreter der SIGLEC-Familie gehören zu den ITIM-tragenden Rezeptoren. So besitzt SIGLEC-11 in seinem zytoplasmatischen Teil ein ITIM und ITIM-ähnliches Motiv (Angata et al., 2002). In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von SIGLEC-E, das zur Gruppe der murinen SIGLEC gehört und ähnlich wie SIGLEC-11 ein ITIM im zytoplasmatischen Rezeptorabschnitt enthält, die Produktion von Radikalen und pro-inflammatorischen Zytokinen reduziert (Claude et al., 2013). Durch das

gegenseitige Wechselspiel zwischen ITIM und ITAM kann der Übergang von einer überschießenden hin zu einer ausbalancierten Immunaktivität erzielt werden.

### 1.1.3 Inflammaging – Veränderungen des Immunsystems im Alter

Ein steigendes Lebensalter geht mit einer Vielzahl von biologischen Veränderungen einher. So kommt es im höheren Lebensalter zu einer Abschwächung des adaptiven Immunsystems bei gleichzeitiger Stärkung des angeborenen Immunsystems (Schmauck-Medina et al., 2022; Thomas et al., 2020; Serrano-López und Martín-Antonio, 2021; Franceschi et al., 2018a). Dieser Prozess findet durch eine Umprogrammierung von Immunzellen auf epigenetischer Ebene statt. Gleichzeitig nimmt im peripheren Blut der Anteil von naiven Lymphozyten ab, während der Anteil von Gedächtniszellen ansteigt (Franceschi et al., 2018a). Zusammen mit weiteren altersbedingten biologischen Prozessen, wie der zellulären Seneszenz, der Akkumulation von Schäden in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder der Verkürzung von Telomeren, führen diese Veränderungen in ihrer Gesamtheit zu einer chronischen, sterilen Entzündungsreaktion, die als Inflammaging bezeichnet wird. Der Begriff „Inflammaging“ setzt sich aus den beiden englischen Wörtern „inflammation“ (Entzündung) und „aging“ (Alter) zusammen und ist als geringgradige, chronische sterile Entzündung ohne das Vorhandensein einer akuten Infektion definiert (Franceschi und Campisi, 2014; Thomas et al., 2020).

Die chronische, sterile Entzündung führt zu einer dauerhaft erhöhten Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen sowie einer anhaltenden Aktivierung des Immunsystems. Schlussendlich begünstigen diese Veränderungen die Pathogenese von altersbedingten Krankheiten wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Multiple Sklerose (López-Otín et al., 2013; Schmauck-Medina et al., 2022). Neben den neurodegenerativen Erkrankungen führen diese immunologischen Veränderungen im fortgeschrittenen Alter auch zu einer erhöhten Prävalenz von unter anderem Tumoren, Diabetes Mellitus Typ II sowie kardiovaskulären Erkrankungen (Lu et al., 2022).

#### 1.1.4 Altersbedingte Entzündungsreaktionen bei neurodegenerativen Erkrankungen

In den kommenden Jahren wird der weltweite Anteil an älteren Personen auf Grund der steigenden Lebenserwartung weiter zunehmen (Kontis et al., 2017). Dabei ist ein hohes Lebensalter eins der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen (Culig et al., 2022; Hou et al., 2019; Lu et al., 2022). Infolgedessen und nur wenigen verfügbaren bis hin zu fehlenden Behandlungsmöglichkeiten wird die Inzidenz von neurodegenerativen Erkrankungen weiter zunehmen. Diese Entwicklung wird mit großen sozioökonomischen Kosten verbunden sein (Cova et al., 2017). Die Klassifizierung von neurodegenerativen Erkrankungen erfolgt meistens nach genetischen Mutationen, nach der Konfiguration von Proteinfehlfaltungen oder nach der Art von Proteinablagerungen (Golde und Miller, 2009; Dugger und Dickson, 2017). Die Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Multiple Sklerose sowie Amyotrophe Lateral Sklerose ist durch inflammatorische Prozesse im ZNS gekennzeichnet (Zhang et al., 2023). Beim Morbus Alzheimer kommt es mit zunehmendem Alter zu einer vermehrten pathologischen Peptidablagerung von Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) und Tau-Proteinen. Über unterschiedliche Signalwege bedingen diese Proteinablagerungen eine Störung der BHS, wodurch Immunzellen das ZNS infiltrieren und die neurale Homöostase aufgehoben wird. Diese immunologischen Veränderungen bedingen einen sterilen, chronischen Entzündungsprozess, der das Krankheitsbild weiterverstärkt (Zenaro et al., 2017). Unter physiologischen Bedingungen ist eine derartige Immunreaktion ein gewünschter Effekt, um Zellschäden zu reparieren oder einen Schutzmechanismus gegen Pathogene zu bilden. Die Persistenz einer neuralen Immunreaktion verhindert jedoch eine Regeneration des Gewebes und führt langfristig zu einer zunehmenden Dysfunktion bis hin zum programmierten Zelltod von Neuronen, wodurch es zum Fortschritt der Erkrankungen kommt (Glass et al., 2010; Russo und McGavern, 2016; Wyss-Coray und Mucke, 2002). Wenngleich die zu Grunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen multifaktoriell sind, können einige dieser Pathomechanismen bei mehreren neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet werden. Hierzu gehören unter anderem genetische und umweltbezogene Faktoren, aber auch endogene Faktoren wie die mit dem Inflammaging einhergehenden biologischen Veränderungen (Jellinger, 2010; Skovronsky et al., 2006; Checkoway et al., 2011). Neben unterschiedlichen neuralen Zellen wie Astrozyten nehmen



Mikrogliazellen als Hauptregulator der Immunantwort im ZNS eine entscheidende Rolle ein (Glass et al., 2010; Kempuraj et al., 2016; Lu et al., 2022). So konnte in den vergangenen Jahren durch genomweite Assoziationsstudien eine Vielzahl von genetischen Varianten, die mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind, identifiziert werden. Einige dieser Polymorphismen stehen im direkten Zusammenhang mit der Sialinsäure-SIGLEC Achse (Lünnemann et al., 2021). Trotz intensiver Forschungsbemühungen sind bis heute die zu Grunde liegenden pathophysiologischen und molekularen Mechanismen nicht vollständig verstanden (Jellinger, 2010).

## 1.2 Sialinsäure-bindende Immunglobulin-ähnliche Lektine

Unter dem Begriff Sialinsäure werden die Derivate der Neuraminsäure zusammengefasst. Im engeren Sinne werden zur Sialinsäure nur die N- und O-substituierten Derivate der Neuraminsäure gezählt. In der Literatur wird der Begriff „Sialinsäure“ mitunter auch als Synonym für N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) verwendet, weil es die im Menschen am häufigsten vorkommende Sialinsäure darstellt. Wenn nicht anders beschrieben, wird in dieser Dissertation für eine bessere Übersichtlichkeit der Begriff „Sialinsäure“ als Synonym für  $\alpha$ 2,8-verknüpfte Neu5Ac unterschiedlicher Polymerisierungsgrade verwendet.

### 1.2.1 Evolutionäre Entwicklung der Sialinsäure-bindenden Immunglobulin-ähnlichen Lektine

Sialinsäure-bindende Immunglobulin-ähnliche Lektine sind Membranrezeptoren und gehören auf Grund der Ig-Domäne zur Immunglobulin Superfamilie, wo sie die Unterklasse der Immunglobulin-ähnlichen Lektine bilden (Crocker et al., 1998; Angata, 2002). SIGLEC werden vornehmlich auf Zellen des hämatopoetischen Systems, genauer gesagt den Immunzellen, exprimiert (Crocker et al., 2007; Bornhöfft et al., 2018; Pillai et al., 2012). 1986 wurde mit Sialoadhesin, auch SIGLEC-1 oder CD169 genannt, erstmalig ein Familienmitglied der SIGLEC beschrieben (Crocker und Gordon, 1986). Seitdem sind insgesamt 15 humane und 9 murine SIGLEC entdeckt worden (Macauley et al., 2014; Paulson et al., 2012). Zu den

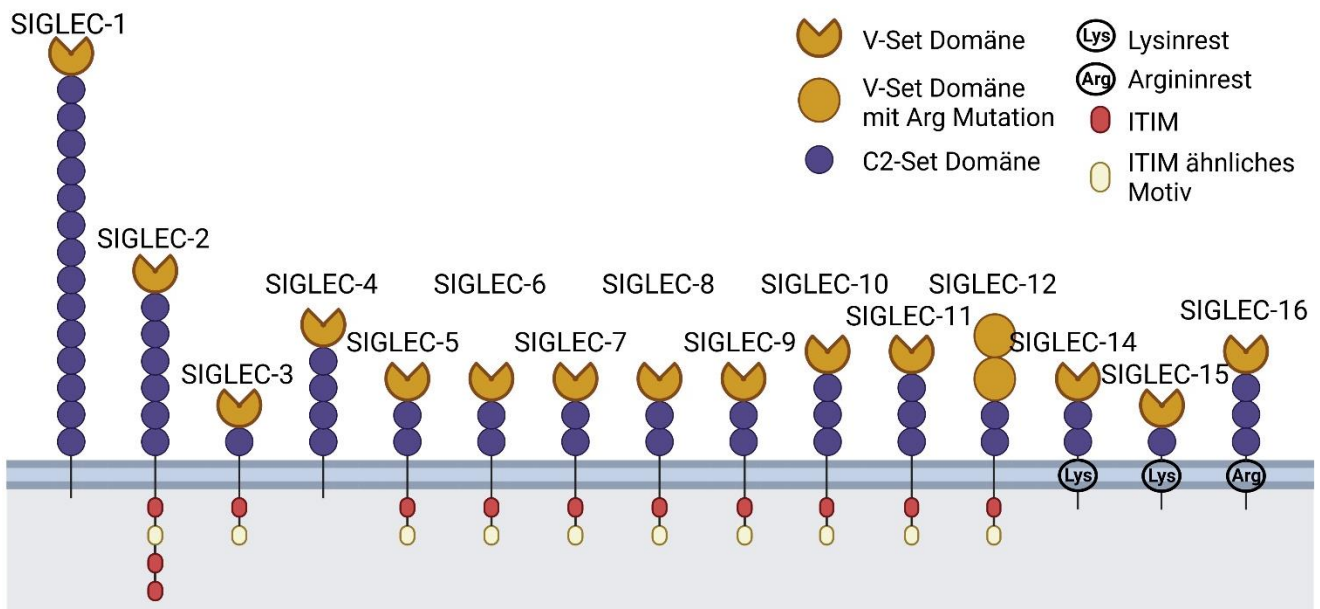
Hauptaufgaben von SIGLEC gehört die Regulation von immunologischen Prozessen durch die Detektion von freier Sialinsäure und sialinsäurehaltigen Glykanen (Daëron et al., 2008). Neben dem Expressionsmuster unterscheiden sich SIGLEC in ihren Bindungscharakteristika. Im Allgemeinen zeigen SIGLEC eine Bindungsspezifität zu Sialinsäure, jedoch besitzt jeder SIGLEC ein spezifisches Affinitätsprofil zu Sialinsäuren unterschiedlicher Konfiguration (Büll et al., 2021; Duan und Paulson, 2020).

Anhand der DNA-Sequenz werden SIGLEC in zwei Untergruppen geteilt. Eine Untergruppe bilden die konservierten SIGLEC, wozu SIGLEC-1, SIGLEC-2, SIGLEC-4 und SIGLEC-15 gehören (Lehmann et al., 2004; Angata et al., 2007; Cao et al., 2009; Bornhöfft et al., 2018). Auf Grund der phylogenetischen Distanz zeigen die konservierten SIGLEC in ihrer DNA-Sequenz nur eine Übereinstimmung von 25-30 % (Angata et al., 2004). Infolge der evolutionsgeschichtlichen Distanz sind sowohl strukturelle als auch funktionelle Orthologe über die verschiedenen Zweige der fünf Wirbeltierklassen konserviert (Angata, 2006; Crocker et al., 2007; Bornhöfft et al., 2018). Mit der evolutionären Entwicklung der frühesten Säugetiere entstand vor über 200 Millionen Jahren innerhalb der Klasse der Säugetiere die zweite Untergruppe (Bornhöfft et al., 2018). Diese Untergruppe wird als Oberflächenmerkmal 33 (CD33) ähnliche SIGLEC bezeichnet, wobei CD33 als Synonym für SIGLEC-3 verwendet wird. Der Name dieser Untergruppe leitet sich von der hohen Sequenzhomologie der einzelnen Gruppenmitglieder zu SIGLEC-3 ab. Zu den elf Gruppenmitgliedern gehören SIGLEC-3, SIGLEC-5 bis SIGLEC-12 und SIGLEC-14 bis SIGLEC-16 (Pillai et al., 2012; Crocker und Varki, 2001b; Duan und Paulson, 2020). Durch die enge evolutionäre Verwandtschaftsbeziehung innerhalb dieser Untergruppe konnten Genexpressionen bisher nur zwischen verschiedenen Säugetierarten, insbesondere dem Menschen und den verwandten Menschenaffen, nachgewiesen werden (Crocker et al., 2007; Angata, 2006). Als Ursache für die schnelle Entwicklung der humanen CD33-ähnlichen SIGLEC werden unterschiedliche Selektionsdrücke in Betracht gezogen (Bornhöfft et al., 2018). Eine weitreichende evolutionäre Veränderung für den Menschen war die Loss-of-Function Mutation des Enzyms zur Synthese der Sialinsäure N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) (Angata, 2018). Darüber hinaus könnte die evolutionäre Entwicklung der CD-33 ähnlichen SIGLEC einerseits durch Krankheitserreger,

die Sialinsäure zum molekularen Mimikry genutzt haben, und andererseits durch Krankheitserreger, die sich die Red-Queen-Hypothese zunutze gemacht haben, beschleunigt worden sein (Varki, 2006). Ein weiterer Selektionsdruck könnte die Einführung der Laktation innerhalb der Klasse der Säugetiere gewesen sein (Bornhöfft et al., 2018).

### 1.2.2 Struktureller Aufbau der Sialinsäure-bindenden Immunglobulin-ähnlichen Lektine

SIGLEC ist ein Typ-1-Transmembranprotein, dessen  $\text{NH}_3^+$ -Ende im extrazellulären Raum und dessen  $\text{COO}^-$ -Ende im zytoplasmatischen Raum liegt (Crocker et al., 2007). Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Antikörpern gehören SIGLEC zur Immunglobulin-Superfamilie (Jandus et al., 2011). Als Transmembranrezeptoren erkennen SIGLEC sialinsäurehaltige Strukturen von Glykoproteinen und Glykolipiden sowie freie Sialinsäure. Dabei zeigt jeder SIGLEC eine Bindungsspezifität zu Sialinsäure, die vom Polymerisierungsgrad und der Konfiguration der Sialinsäure abhängig ist (Blixt et al., 2003; Lenza et al., 2020). Die Bindungsstelle für Sialinsäure besteht aus einem positiv geladenem Arginin, das sich auf dem F-Strang der V-Set Immunglobulin Domäne (V-Set Ig-Domäne) befindet (Angata, 2002; Varki und Angata, 2006). Die V-Set Ig-Domäne, welche strukturelle Ähnlichkeiten zu der variablen Domäne von Antikörpern aufweist, befindet sich am n-terminalen Ende des SIGLEC und ist ein gemeinsames strukturelles Merkmal der 15 humanen SIGLEC (Jandus et al., 2011). SIGLEC-12 weist eine Besonderheit auf, da es zwei V-Set Ig-Domänen besitzt. Jedoch haben beide V-Set Ig-Domänen auf Grund einer Mutation ihre Bindungsfähigkeiten verloren (Siddiqui et al., 2019; Duan und Paulson, 2020). Eine schematische Darstellung der 15 humanen SIGLEC ist in Abbildung 1 zu sehen.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Familie der humanen SIGLEC, welche aus 15 Rezeptoren besteht. Jeder von diesen trägt eine extrazelluläre V-Set Ig-Domäne, welche eine Bindungsstelle für Sialinsäure enthält. Auf die V-Set-Domäne folgt eine definierte Anzahl an C2-Set Immunglobulin Domänen (C2-Set Ig-Domänen), die für jeden SIGLEC spezifisch ist. Eine Ausnahme stellt SIGLEC-12 dar. Auf Grund einer Mutation hat dieser Rezeptor seine Fähigkeit Sialinsäure zu binden verloren, weswegen dieser nicht in jeder Literatur zu den humanen SIGLEC gezählt wird. Im zytoplasmatischen Teil besitzt die Mehrzahl der SIGLEC ein ITIM sowie eine ITIM-ähnliche Domäne. Siglec-14, SIGLEC-15 und SIGLEC-16, die durch Rekrutierung von DAP12 und anschließender Phosphorylierung zur Aktivierung des Immunsystems führen, fungieren als Gegenspieler (Siddiqui et al., 2019; Duan und Paulson, 2020; Lenza et al., 2020). Innerhalb der SIGLEC-Familie stellen SIGLEC-1, der keine Domäne in seinem zytoplasmatischen Teil enthält, sondern den Liganden nach Bindung internalisiert, sowie SIGLEC-4, das eine Bindungsstelle für die Tyrosinkinase Fyn besitzt, eine weitere funktionelle Ausnahme dar (Yamauchi et al., 2012; Macauley et al., 2014; Lübbers et al., 2018). (Erstellt mit BioRender.com)

Kristallstrukturanalysen unterschiedlicher SIGLEC zeigten, dass die Bindungsstelle in einer flachen Tasche liegt (Duan und Paulson, 2020). Im Bereich des physiologischen pH-Werts ist das Arginin positiv geladen, sodass es eine ionische Bindung mit der Carboxylgruppe der Sialinsäure ausbildet (Varki und Angata, 2006; Hartnell et al., 2001). Für gewöhnlich ist die Bindungsstelle unter anderem durch cis-Interaktionen, welche ubiquitär in der Glykokalyx von Zellen ausgebildet werden, maskiert (Razi und Varki, 1998). Die Demaskierung der

Bindungsstelle auf der V-Set Ig-Domäne kann durch trans-Interaktionen mit hochaffinen Liganden aufgehoben werden (Collins et al., 2006). Zwei weitere Mechanismen zur Freilegung der Bindungsstelle stellen die Behandlung mit Sialidasen sowie eine immunologische Aktivierung der Zelle dar (Razi und Varki, 1998, 1999). Für die Projektion der Bindungsstelle in den extrazellulären Raum besitzen die Rezeptoren eine variable Anzahl an C2-Set Immunglobulin Domänen (C2-Set Ig-Domänen), die auf die V-Set Ig-Domäne folgen (Duan und Paulson, 2020). Die C2-Set Ig-Domäne ähnelt strukturell der konstanten Region eines Antikörpers (O'Reilly und Paulson, 2009).

In Abhängigkeit vom jeweiligen SIGLEC führt die Bindung von Sialinsäuren oder sialinsäurehaltigen Glykokonjugaten zur Aktivierung oder Inhibierung des Immunsystems. Dabei zeigen alle SIGLEC ein charakteristisches Affinitätsprofil zu Sialinsäure, das sich in einem bevorzugten Polymerisationsgrad und einer bevorzugten Bindungskonfiguration unterscheidet (Blixt et al., 2003; Duan und Paulson, 2020). Neben den Bindungscharakteristika können SIGLEC auch anhand der Sequenzhomologie unterschieden werden. Wie bereits im vorherigen Kapitel beschreiben wird zwischen der Gruppe der CD33-ähnlichen SIGLEC und der Gruppe der konservierten SIGLEC unterschieden (Angata et al., 2004; Bornhöfft et al., 2018). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal von SIGLEC ist das Tyrosin enthaltende Signalmotiv auf der zytoplasmatischen Seite, das nach Bindung von Sialinsäure unterschiedliche das Immunsystem betreffende Signalkaskaden der Zelle reguliert. Die Tyrosin enthaltenden Signalmotive können in inhibitorische Motive, sogenannte ITIM, und aktivierende Motive, sogenannte ITAM, unterteilt werden (Duan und Paulson, 2020; Crocker und Varki, 2001a; Crocker et al., 2007; Schwarz et al., 2017). Mit Ausnahme von SIGLEC-1 und SIGLEC-4 sowie SIGLEC-14, SIGLEC-15 und SIGLEC-16 besitzen SIGLEC ein ITIM sowie in der Regel ein zusätzliches ITIM-ähnliches Motiv (Crocker et al., 2007). SIGLEC-1 ist vornehmlich an der Phagozytose von Pathogenen, welche Sialinsäure exprimieren, beteiligt (Chang und Nizet, 2014). Die Hauptaufgabe von SIGLEC-4 ist die Myelinisierung sowie die Stabilisierung des Zell-Zell-Kontakts (Schwardt et al., 2015; Bornhöfft et al., 2018). SIGLEC-14, SIGLEC-15 und SIGLEC-16 besitzen eine positiv geladene Aminosäure in der Transmembrandomäne. Diese positiv geladene Aminosäure werden von den Ko-Rezeptoren DNAX-Aktivierungsprotein 10

(DAP10) und DAP12, welche ein ITAM tragen, zur nicht-kovalenten Bindung genutzt (Bornhöfft et al., 2018). Innerhalb der SIGLEC-Familie werden SIGLEC-14 als aktivierender und SIGLEC-5 als inhibierender Rezeptor sowie SIGLEC-16 mit dem inhibitorisch wirkendem SIGLEC-11 als gepaarte Rezeptoren exprimiert. Zu den primären Aufgaben von gepaarten Rezeptoren, die definitionsgemäß eine hohe Ähnlichkeit in ihrer DNA-Sequenz teilen, gehört es extrazelluläre Informationen durch entgegengesetzte intrazelluläre Signalkaskaden moduliert weiterzuleiten (Martinet und Smyth, 2015; Akkaya und Barclay, 2013; Kuroki et al., 2012). Die paarweise Expression von Rezeptoren, die eine gegensätzliche Signalkaskade besitzen, hat sich während der Evolution als immunologischer Selektionsvorteil zur Bekämpfung von Krankheitserregern erwiesen, weil eine durch Pathogene verursachte fehlgeleitete Immunreaktion effektiv verhindert werden kann (Ali et al., 2014; Schwarz et al., 2017; Angata, 2006; Angata et al., 2006; Wielgat et al., 2021; Akkaya und Barclay, 2013). Im Fall von SIGLEC-14 und SIGLEC-16 richten sich die Rezeptoren gegen Pathogene, die Sialinsäure oder sialinsäurehaltige Glykane nutzen, um das Immunsystem des Wirts durch die Aktivierung der inhibitorischen SIGLEC-5 und SIGLEC-11 zu unterdrücken. Diese Interaktion zwischen Host und Pathogen wird als Red-Queen-Hypothese, die ein evolutionärer Treiber für das Immunsystem war, bezeichnet (Angata, 2018; Pillai et al., 2012; Liow et al., 2011).

### 1.2.3 Signalkaskade der Sialinsäure-bindenden Immunglobulin-ähnlichen Lektine

SIGLEC, die in ihrem intrazellulären Teil ein ITIM oder ITIM-ähnliches Motiv tragen, bewirken am Ende der Signalkaskade eine Dephosphorylierung von Signalproteinen und Rezeptoren. Am Anfang der Signalkaskade steht die Bindung von Sialinsäure an SIGLEC, wodurch es zur Phosphorylierung des intrazellulär liegenden ITIM und ITIM-ähnlichen Motivs durch Kinasen der Src-Familie kommt. In Folge der Phosphorylierung kommt es zur Rekrutierung der beiden Tyrosinphosphatasen SH2-Domäne enthaltende Tyrosinphosphatase-1 (SHP-1) und SH2-Domäne enthaltende Tyrosinphosphatase-2 (SHP-2), wobei die Src-Homologie-Region-2-Domäne (SH2) für die Erkennung der phosphorylierten Tyrosine verantwortlich ist (Bornhöfft et al., 2018). In der aktivierten Form spalten SHP-1 und SHP-2 nach Identifikation eines phosphorylierten Tyrosins das Phosphat ab, wodurch es sich bei ITIM oder ITIM-

ähnliche Motive um effektive Gegenspieler von phosphorylierenden Signalwegen handelt. Zu den phosphorylierenden Signalwegen gehören beispielsweise ITAM, die zu einer durch die Milztyrosinkinase (Syk) vermittelten Aktivierung des Immunsystems führen. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben sind ITAM Bestandteil der Signalmoleküle DAP10 und DAP12, die an die positiv geladene Aminosäure der aktivierenden SIGLEC binden (Ravetch und Lanier, 2000; Daëron et al., 2008). Damit schwächen inhibitorische SIGLEC über SHP-1 und SHP-2 die immunaktivierende Wirkung der ITAM-tragenden SIGLEC ab (Angata, 2002; Zhao et al., 2006; Horvat et al., 2001). Dieser inhibitorische Effekt konnte durch artifizielle Vernetzung von SIGLEC-11, der in Makrophagen eines Mausmodells transfiziert wurde und durch die Rekrutierung von SHP-1 und SHP-2 zu einer Inhibition des Immunsystems führte, bestätigt werden (Angata et al., 2002). Diese Gegenregulation von aktivierenden Signalkaskaden ist zum Verhindern einer überschießenden Immunreaktion von Bedeutung, weswegen inhibitorische SIGLEC mit einem ITIM oder ITIM-ähnlichen Motiv einen wichtigen Kontrollmechanismus im Immunsystem repräsentieren (Schwarz et al., 2017; Bornhöfft et al., 2018; Lünemann et al., 2021). SHP-1 ist ebenfalls an der Modulation weiterer anti-inflammatorischer Signalwege von Mikrogliazellen beteiligt (Zhao et al., 2006; Horvat et al., 2001). So führt die Bindung von Sialinsäure an SIGLEC durch ITIM oder ITIM-ähnlichen Motive vermittelt zur Unterdrückung der Immunreaktionen von Mikroglia, die sich in einer verringerten Phagozytose, einer Reduzierung des oxidativen Bursts, einer herabgesetzten Migrationsfähigkeit und einer verminderten Proliferation widerspiegeln (Linnartz et al., 2010). Die unterschiedliche Bindungsspezifitäten von den jeweiligen SIGLEC zu Sialinsäure unterschiedlicher Konfigurationen ermöglicht damit eine präzise Steuerung und Kontrolle der Immunantwort (Crocker et al., 2007; Ravetch und Lanier, 2000).

#### 1.2.4 SIGLEC-11 – Ein besonderes Mitglied der Sialinsäure-bindenden Immunglobulin-ähnlichen Lektine

Bei SIGLEC-11 handelt es sich um einen spezifischen Rezeptor innerhalb der humanen Abstammungslinie, der kein Homolog in anderen Spezies aufweist (Hayakawa et al., 2005; Wang und Neumann, 2010). Bisher konnte die Expression von SIGLEC-11 auf humanen

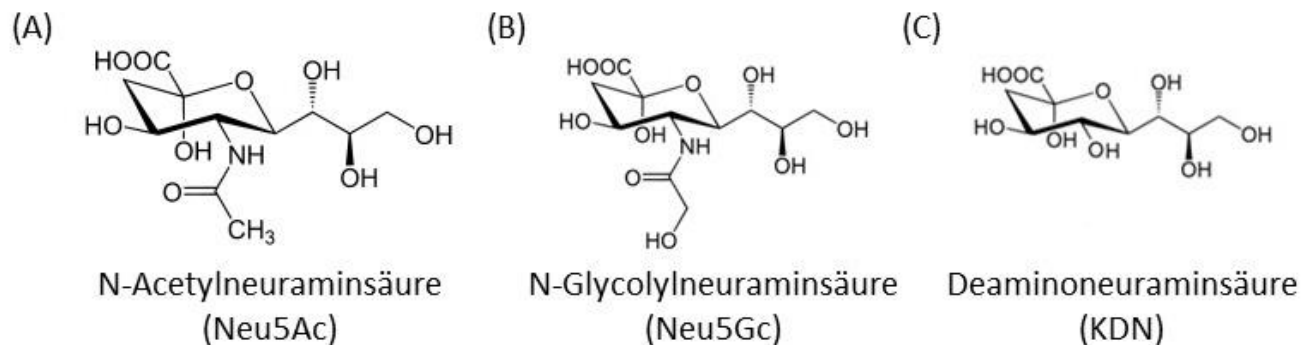
Gewebsmakrophagen wie den Leber-Kupferzellen, Mikrogliazellen und den Ovarien nachgewiesen werden (Hayakawa et al., 2005). SIGLEC-11 bindet bevorzugt kurzkettige  $\alpha$ 2,8-verknüpfte Sialinsäure. Damit besitzt SIGLEC-11 im Vergleich zu anderen SIGLEC spezifische Eigenschaften (Angata et al., 2002; Crocker et al., 2007; Varki, 2009b). So wird SIGLEC-3, der in dieser Dissertation gemeinsam mit SIGLEC-5 und SIGLEC-10 als Referenzen zur Untersuchung der Bindungsspezifität von SIGLEC-11 ausgewählt wurde, vornehmlich auf myeloischen Vorläuferzellen des Knochenmarks und auf im Blut zirkulierende peripheren Monozyten exprimiert (Brinkman-Van der Linden et al., 2003). Ebenfalls ist SIGLEC-3 auf Gewebemakrophagen zu finden (Brinkman-Van der Linden und Varki, 2000; Freeman et al., 1995). Des Weiteren wird  $\alpha$ 2,3- und  $\alpha$ 2,6-verknüpfte Sialinsäure, das als Bestandteile der Glykokalyx vornehmlich an den nicht-reduzierten Enden gebunden ist, bevorzugt von SIGLEC-3 gebunden (Angata und Varki, 2002; Varki, 1992; Padler-Karavani et al., 2014). SIGLEC-5, der vornehmlich auf Monozyten exprimiert wird, und SIGLEC-10, der primär von NK-ähnlichen Zellen exprimiert wird, binden ebenfalls bevorzugt  $\alpha$ 2,3- und  $\alpha$ 2,6-verknüpfte Sialinsäure (Brinkman-Van der Linden und Varki, 2000; Cornish et al., 1998; Munday et al., 2001). Jedoch besitzen SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 ebenso wie SIGLEC-11 ein ITIM sowie ein ITIM-ähnliches Motiv im zytoplasmatischen Teil (Angata et al., 2002). In vorherigen Arbeiten konnte die Arbeitsgruppe anhand von murinen Mikrogliazellen, die das humane Siglec-11 Gen enthielten, zeigen, dass die Expression des humanen SIGLEC-11 zu einer reduzierten Gentranskription von pro-inflammatorischen Zytokinen führt. Des Weiteren führte die Expression von SIGLEC-11 zu einer verminderten Phagozytose von apoptotischen Zellmaterial. Weiterführend konnte in einem Zellkultursystem gezeigt werden, dass nach Hinzugabe von LPS die mit SIGLEC-11 transfizierten Mikrogliazellen einen protektiven Effekt auf Neurone besaßen. Dieser neuroprotektive Effekt war aufgehoben nachdem alle Rückstände von Sialinsäuren auf der neuralen Glykokalyx entfernt worden waren (Wang und Neumann, 2010). In weiterführenden Experimenten gelang es der Arbeitsgruppe in humanen Zellkulturen die inflammationsbedingte Neurotoxizität von aktivierter Mikroglia durch Bindung von niedermolekularer  $\alpha$ 2,8-verknüpften Sialinsäure an SIGLEC-11 zu reduzieren (Shahraz et al., 2015). Damit besitzt Siglec-11 einen wichtigen immunmodulierenden Effekt hinsichtlich



der Aktivität von Mikrogliazellen, der durch die Bindung von niedermolekularer  $\alpha$ 2,8-verknüpfter Sialinsäure gesteuert wird.

### 1.2.5 Sialinsäure – Der Ligand von Sialinsäure-bindenden Immunglobulin-ähnlichen Lektinen

Bei Sialinsäure handelt es sich um eine heterogene Gruppe von negativ geladenen, sauren Monosacchariden mit neun Kohlenstoffatomen. Sialinsäure bildet häufig die endständige Gruppe von Glykanen (Bardor et al., 2005; Angata und Varki, 2002). Auf Grundlage ihrer chemischen Struktur können mehr als 50 Sialinsäuren unterschieden werden. Die chemische Vielfalt entsteht durch mannigfaltige Modifikationen wie Methylierung oder Acetylierung am Ende der de-novo Synthese (Varki und Varki, 2007; Angata und Varki, 2002; Deng et al., 2013). Am häufigsten kommt die O-Acetylierung am 4-C-Atom, 7-C-Atom, 8-C-Atom und 9-C-Atom vor und wird durch eine transmembrane Transferase katalysiert (Altheide et al., 2006; Higa et al., 1989). Die drei häufigsten natürlich vorkommenden Formen der Sialinsäuren sind Neu5Ac, Neu5Gc und Deaminoneuraminsäure (KDN), deren chemische Strukturen in Abbildung 2 abgebildet sind (Liao et al., 2020).



**Abb. 2:** Chemische Strukturformel von den drei häufigsten Formen der Sialinsäure in der Sesselkonfiguration. Es handelt sich hierbei um Neu5Ac (A), Neu5Gc (B) und KDN (C).

Neu5Ac ist nicht nur eine häufige Ausgangssubstanz zur Synthese der Derivate von Sialinsäure, sondern in humanen Zellen auch die am häufigsten vorkommende Form der

Sialinsäure. Aus diesem Grund und weil Neu5Ac der bevorzugte Ligand von SIGLEC-11 ist, wird im Folgenden nur die Biosynthese von Neu5Ac näher betrachtet (Varki et al., 2015; Altheide et al., 2006; Chou et al., 1998).

Die de-novo Synthese von Neu5Ac besteht aus einem vierstufigen Syntheseprozess, an dem insgesamt drei Enzyme beteiligt sind. Alle Prozesse der Biosynthese finden im Zytosol statt (Varki et al., 2015). Die ersten beiden Schritte stellen die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion dar und werden von dem bifunktionellen Enzym UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) katalysiert. Dieses Enzym besitzt eine UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase Aktivität und eine N-Acetylmannosamin-Kinase Aktivität (Keppler et al., 1999; Li und Chen, 2012). Zunächst führt GNE unter Abspaltung von Uridindiphosphat (UDP) zur Epimerisierung des Ausgangsmoleküls UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) zu N-Acetylmannosamin (ManNAc). Im zweiten Schritt wird ManNAc durch die Kinaseaktivität von GNE phosphoryliert und es entsteht N-Acetylmannosamin-6-Phosphat (ManNAc-6-P) (Angata und Varki, 2002; Stäsche et al., 1997). Darauf folgend wird ManNAc-6-P mit Phosphoenolpyruvat durch die N-Acetylneuraminsäure-9-Phosphat-Synthase kondensiert (Nakata et al., 2000). Das hieraus resultierende N-Acetylneuraminsäure-9-Phosphat (Neu5Ac-9-Phosphat) wird abschließend durch die N-Acetylneuraminsäurephosphatase de-phosphoryliert, wodurch Neu5Ac entsteht (Varki et al., 2015). Nach Abschluss der Synthese wird Neu5Ac aus dem Zytosol in den Zellkern transportiert, wo es durch die Cytosin-5'-Monophosphat-N-Acetylneuraminsäure-Synthetase (CMP-Neu5Ac-Synthetase) in seine aktive Form Cytosin-5'-Monophosphat-N-Acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac) umgewandelt wird (Altheide et al., 2006; Münster-Kühnel et al., 2004). In seiner aktiven Form kann Neu5Ac entweder in das Golgi-Lumen transportiert werden, wo es als Donor für sialinsäurehaltige Glykane dient, oder als Ausgangssubstanz zur Synthese von Derivaten der Sialinsäure verwendet werden. Beispielsweise katalysiert das Enzym Cytidin-Monophospho-N-Acetylneuraminsäure-Hydroxylase (CMAH) die Reaktion von CMP-Neu5Ac zu Cytosin-5'-Monophosphat-N-Glycolylneuraminsäure (CMP-Neu5Gc) (Altheide et al., 2006; Breimer und Holgersson, 2019). In diesem Zusammenhang ist hervorzuheben, dass der Mensch durch eine Loss-of-Function Mutation im CMAH-Gen, die als Folge eines Rasterschubs auftrat, die

Fähigkeit zur Synthese von Neu5Gc verloren hat (Chou et al., 1998; Chou et al., 2002; Li und Chen, 2012). Aus diesem Grund kann Neu5Gc nur über die Nahrung in humanes Gewebe aufgenommen werden. Die Hauptnahrungsquelle für nicht humanes Neu5Gc ist rotes Fleisch (Li und Chen, 2012; Varki et al., 2011; Padler-Karavani et al., 2008). Interessanterweise exprimieren Menschenaffen als die nächsten lebenden Verwandten des Menschen noch das Enzym CMAH. Damit ist davon auszugehen, dass die Inaktivierung des Gens nach der evolutionären Abspaltung von den gemeinsamen Vorfahren des Menschen geschah und damit ein potenzieller Treiber für die evolutionäre Entwicklung des modernen Menschen gewesen ist (Muchmore et al., 1998; Angata, 2006).

Nicht nur Neu5Ac sondern auch die anderen Derivate der Sialinsäure werden als aktivierte Form ins Golgi-Lumen transportiert (Li und Chen, 2012). Der Transfer einer aktivierten Sialinsäure an eine terminale nicht reduzierende Position wird durch spezifische Sialyltransferasen katalysiert. Sialyltransferasen, die zur Untergruppe der Glykosyltransferasen gehören und Typ-II-Membranproteine sind, erzeugen eine definierte Verknüpfung und besitzen eine Substratspezifität (Chen und Varki, 2010; Harduin-Lepers et al., 2005). Beim Menschen existieren mehr als 20 verschiedene Arten von Sialyltransferasen (Chen und Varki, 2010; Harduin-Lepers et al., 2005). Die Bindung erfolgt in der Regel an N-Acetylgalactosamin oder Galactose. Daneben katalysieren Sialyltransferasen auch die Bindung zwischen gleichartigen Sialinsäuren, wodurch Homopolymere mit unterschiedlichen Polymerisationsgraden entstehen (Li und Chen, 2012). Der Polymerisierungsgrad, welcher neben der Konfiguration von Polysialinsäure eine weitere Klassifizierung der erweiterten Homopolymere von Polysialinsäure darstellt, ist ein wichtiges strukturelles Merkmal, weil es die Interaktion mit dem Bindungspartner beeinflusst (Nakata und Troy, 2005). Anhand des Polymerisierungsgrades werden kurzkettige sowie langkettige Sialinsäuren unterschieden (Villanueva-Cabello et al., 2021). Die Definition von kurzkettiger sowie langkettiger Polysialinsäure ist in der Literatur nicht einheitlich. Im Allgemeinen ist kurzkettige Sialinsäure als erweitertes Homopolymer definiert, wohingegen höhere Polymerisierungsgrade zu den langkettigen Polysialinsäuren gezählt werden (Varki und Schauer, 2009; Shahrzad et al., 2022; Sapoń et al., 2019; Sato und Kitajima, 2013; Janas und Janas, 2011). In dieser Dissertation wird zwischen kurzkettiger

und langkettiger Polysialinsäure analog zu der innerhalb der Forschungsgruppe verwendeten Definition unterschieden. Demnach gehören Oligosialinsäure, das typischerweise aus zwei bis sieben Monomeren besteht und bei Wirbeltieren eine häufige Modifikation für Glykoproteine repräsentiert, sowie Sialinsäure mit einer durchschnittlichen Polymerisierung von 20 (polySia avDP20) zu den kurzkettigen Polysialinsäuren. Höhere Polymerisierungsgrade mit einem Molekulargewicht im Bereich zwischen 20 kDa bis 60 kDa werden zu den langkettigen Polysialinsäuren gezählt. Am Ende der Biosynthese werden die mit Sialinsäure versehenen Glykane sowie die Homopolymere entweder von der Zelle sezerniert oder zur Zelloberfläche als Bestandteil der Glykokalyx transportiert (Angata und Varki, 2002; Li und Chen, 2012). Die Konzentration von Sialinsäuren innerhalb der Glykokalyx eines Lymphozyten wird mit >100 mM angegeben (Varki, 2017a).

Die dritte häufigste Sialinsäure KDN, die 1986 erstmals im Ei der Regenbogenforelle als endständiges Molekül von Polysialinsäuren beschrieben wurde, hat einen unabhängigen Biosyntheseweg (Münster-Kühnel et al., 2004; Song et al., 1991). KDN unterscheidet sich in wesentlichen Eigenschaften von den anderen Derivaten der Sialinsäure, da sie beispielsweise eine Hydroxylgruppe an Position C-5 aufweist. Auf Grund dessen bildet KDN eine eigenständige Gruppe bei den Sialinsäuren (Song et al., 1991; Inoue et al., 1996).

#### 1.2.6 Sialinsäure als Bestandteil der Glykokalyx

Die Glykokalyx bildet einer der äußeren Schichten der Zellmembran von eukaryotischen Zellen und ist eine komplexe Anordnung von Glykokonjugaten wie Glykosphingolipide, Glykolipide und Glykoproteine. Durch ihre hohe Diversität und ihre vielfältige Strukturbeschaffenheit steuert die Glykokalyx unterschiedlichste Zellprozesse (Varki, 2017b; Gagneux et al., 2015; Liao et al., 2020; Varki, 2008). Hierzu gehört die direkte Beteiligung an der Modulation zahlreicher kritischer Prozesse wie der Zell-Zell-Interaktion und der intrazellulären Kommunikation. Damit stellt die Glykokalyx eine essentielle funktionelle Einheit für das Überleben einer Zelle dar (Kelm und Schauer, 1977; Sato, 2004; Ohtsubo und Marth, 2006; Crocker et al., 2007; Varki, 2017b). Eine Unterklasse innerhalb der Glykokalyx repräsentieren

Glykokonjugate mit Sialinsäure. Als Bestandteile der Glykokalyx existiert diese Unterklasse bereits seit mehr als 500 Millionen Jahren (Gagneux et al., 2015). Bei den Wirbeltieren befindet sich Sialinsäure in der Regel an der äußersten Position der Glykane und weist eine hohe Diversität hinsichtlich ihrer Struktur auf (Angata und Varki, 2002; Bardor et al., 2005; Bornhöfft et al., 2018; Hanashima et al., 2013). In ihrer Gesamtheit bilden die in der Glykokalyx exprimierten Sialokonjugate ein komplexes Netzwerk aus (Varki, 2011a, 2017a, 2017b; Gagneux et al., 2015). Zur Detektion von Sialinsäure hat sich während der Evolution ein breites Repertoire an Immunrezeptoren innerhalb der Klasse der Säugetiere entwickelt. Hierzu gehören unter anderem SIGLEC. Durch die Bindung an SIGLEC ist Sialinsäure an der Steuerung immunologischer Prozesse beteiligt (Varki, 2017a, 2017b; Macauley et al., 2014; Varki, 2011b). In diesem Kontext ist hervorzuheben, dass Sialinsäuren als Selbst-assoziierte molekulare Muster (SAMP) eine entscheidende Rolle bei immunologischen Prozessen zur Unterscheidung zwischen körpereigenen Zellen und Krankheitserregern spielt. Die Erkennung von Sialinsäure als SAMP kann in Abhängigkeit vom beteiligten Signalweg zur Aktivierung beziehungsweise Inhibierung einer Immunantwort führen (Varki, 2006, 2009a; Bornhöfft et al., 2018). Gleichzeitig nimmt Sialinsäure nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase von Immunzellen ein, sondern unter anderem auch bei der neuronalen Entwicklung und der Plastizität von Synapsen bei erwachsenen Wirbeltieren (Rutishauser, 2008).

### 1.2.7 Das Sialom – Die Gesamtheit der Sialinsäuren

Die Gesamtheit der Sialinsäuren, die zu einem definierten Zeitpunkt innerhalb der Glykokalyx exprimiert werden, wird unter dem Begriff Sialom zusammengefasst. Dabei exprimiert nicht nur jede Spezies ein charakteristisches Sialom, sondern das Sialom unterscheidet sich im Gegensatz zum Genom zwischen verschiedenen Zelltypen und in Abhängigkeit von Zeit und Umwelteinflüssen (Varki und Angata, 2006). Im Laufe der Evolution führte eine inaktivierende Mutation des Enzyms CMAH zu einer weitreichenden Veränderung des humanen Sialom. Seitdem ist der Mensch durch den Verlust der Hydroxylase-Aktivität von CMAH nicht mehr in der Lage CMP-Neu5Ac in CMP-Neu5Gc umzuwandeln (Chou et al., 1998; Chou et al.,

2002). Diese Veränderungen des Sialom hatte im Laufe der Evolution weitreichende Folge, sodass es unter anderem mit der Entwicklung der CD-33 ähnlichen SIGLEC zu einer Anpassung der humanen SIGLEC kam. Die gesamten biologischen Auswirkungen sind jedoch bis heute noch Gegenstand wissenschaftlicher Arbeiten (Varki und Angata, 2006; Angata, 2018).

### 1.3 Sialinsäure-SIGLEC Achse

#### 1.3.1 Funktion der Sialinsäure-SIGLEC Achse im ZNS

Sialinsäure und SIGLEC-Rezeptoren bilden im ZNS eine funktionelle Einheit, die bei der Steuerung einer Vielzahl von physiologischen Prozessen eine essentielle Funktion einnimmt (Nitschke, 2005; Crocker, 2002; Crocker et al., 2007). Hierzu gehören unter anderem die Regulation der embryonalen Entwicklung sowie von Reparaturmechanismen infolge von Gewebeschäden, aber auch spielt diese Achse eine wichtige Rolle bei der neuronalen Plastizität (Rutishauser, 2008; Liao et al., 2020). Eine weitere Aufgabe der Sialinsäure-SIGLEC Achse liegt in der Aufrechterhaltung einer abgestimmten, effektiven Immunantwort (Crocker, 2005; Giancchetti et al., 2021; Lübbers et al., 2018; Läubli und Varki, 2020). Darüber hinaus können SIGLEC nach Bindung von Polysialinsäure zur Endozytose führen, wodurch beispielsweise Moleküle der Zelloberfläche in intrazelluläre Kompartimente wie dem Endosom transportiert werden (Duan und Paulson, 2020). Die Signalkaskade sowie die physiologische Relevanz der Endozytose durch SIGLEC ist bisher nur unvollständig verstanden (Lünemann et al., 2021). Auf Grund ihrer herausgehobenen Stellung bei der Regulation von vielfältigen Prozessen ist die Sialinsäure-SIGLEC Achse streng reguliert. Störungen bei der Regulation der Sialinsäure-SIGLEC Achse werden mit Erkrankungen und Pathologien unterschiedlicher Ausprägung assoziiert (Schwarzkopf et al., 2002; Bornhöfft et al., 2018; Liao et al., 2020; Lünemann et al., 2021). Zu den wichtigsten Regulationsmechanismen gehören neben dem Expressionsmuster von SIGLEC und Sialinsäure beispielsweise auch die Modifikation der Sialinsäuren sowie der Polymerisierungsgrad der erweiterten Homopolymere der Sialinsäure (Varki und Gagneux, 2012).

### 1.3.2 Rolle der Sialinsäure-SIGLEC Achse bei der Entstehung von ZNS-Erkrankungen

Durch genomweite Assoziationsstudien konnten in den vergangenen Jahren eine Vielzahl an genetische Varianten identifizieren werden, die mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von neurologischen Erkrankungen assoziiert sind. Einige dieser Polymorphismen stehen im direkten Zusammenhang mit der Sialinsäure-SIGLEC Achse (Lünemann et al., 2021). So sind Mutationen in der Sialyltransferase ST8SIA2 mit einer Vielzahl von psychiatrischen Erkrankungen wie der Schizophrenie oder der bipolaren Störung assoziiert (McAuley et al., 2012; Isomura et al., 2011). Damit einhergehend werden bei psychiatrischen Patienten erniedrigte Expressionslevel von polysialisierten neuronalen Zelladhäsionsmolekülen (NCAM) in Blutuntersuchungen gemessen (Gilabert-Juan et al., 2012; Varea et al., 2012). Eine weitere Gruppe stellen die neurodegenerativen Erkrankungen des zentralen Nervensystems, wozu beispielsweise Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer oder Amyotrophe Lateralsklerose gehören, dar. Bei einer Vielzahl dieser Erkrankungen ist ein fortgeschrittenes Lebensalter ein Hauptrisikofaktor (Hou et al., 2019). Auf Grund einer steigenden Inzidenz, die teilweise durch den demographischen Wandel bedingt ist, und der weitreichenden medizinischen sowie gesellschaftlichen Folgen gewinnt diese Gruppe an Erkrankungen seit Jahren an Bedeutung (Deuschl et al., 2020). Dem Morbus Alzheimer, das zu den häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen in den Industrieländern gehört und durch eine pathologisch gesteigerte Proteinablagerungen charakterisiert ist, können verschiedene genetische Prädispositionen innerhalb der Sialinsäure-SIGLEC Achse zugeordnet werden (Neumann et al., 2009). Die beim Morbus Alzheimer bisher gefundenen prädisponierenden genetischen Veränderungen stehen im hohen Ausmaß mit Mikrogliazellen in Verbindung (Bajaj et al., 2018). Hierzu gehört unter anderem SIGLEC-3, der als immunmodulierender Rezeptor auf Mikrogliazellen exprimiert wird (Eskandari-Sedighi et al., 2023). SIGLEC-3 wirkt auf Grund seiner inhibierenden Wirkung aktivierenden Rezeptoren wie TREM2 und CR3 entgegen, wodurch eine Homöostase des Immunsystems erzielt wird. Hingegen führt eine fehlende Inhibition durch SIGLEC-3 beispielsweise durch Mutationen zu einer Dysbalance innerhalb der Sialinsäure-SIGLEC Achse, die eine dauerhafte Aktivierung des Immunsystems mit eine daraus resultierende überschießenden Immunreaktion bedingt. Umgekehrt führt auch eine aktivitätssteigernde Mutation der immunstimulierenden Rezeptoren wie TREM2 oder CR3 zu einer

Dysbalance. Dabei stellt die daraus resultierende fehlregulierte Immunantwort nicht nur einen Risikofaktor für Morbus Alzheimer dar, sondern auch für andere neurodegenerative Erkrankungen (Lewcock et al., 2020). Des Weiteren ist SIGLEC-3, der in zwei Isoformen unterteilt wird, an der Endozytose von kleinen Molekülen wie A $\beta$  beteiligt. Von den beiden Isoformen geht CD33M, welche die vollständige Isoform darstellt, mit einem erhöhten Risiko für Morbus Alzheimer einher (Malik et al., 2013). Das gesteigerte Risiko beruht auf einer gestörten Endozytose von A $\beta$ , wodurch es zu einer verstärkten, extrazellulären Bildung der toxischen A $\beta$ -Plaques kommt (Butler et al., 2021). Innerhalb der Familie der SIGLEC stehen jedoch nicht nur Polymorphismen von SIGLEC-3 in Verbindung mit einem erhöhten Risiko für Morbus Alzheimer, sondern auch genetische Varianten von SIGLEC-11 (Bellenguez et al., 2020). Dabei ist die Rolle von SIGLEC-11 bei der Pathogenese von neurologischen Erkrankungen bisher noch nicht ausreichend untersucht (Siddiqui et al., 2019).

Die Sialinsäure-SIGLEC Achse wird nicht allein mit Erkrankungen des zentralen Nervensystems in Verbindung gebracht, sondern auch mit Autoimmunerkrankungen und Erkrankungen anderer Organsysteme assoziiert (Mahajan und Pillai, 2016; Gianhecchi et al., 2021). So können genetische Veränderungen, die einen gestörten Metabolismus von Sialinsäure im Muskelgewebe zu Folge haben, zu Muskelerkrankungen wie der hereditären „inclusion-body myopathy“, zu lysosomalen Speichererkrankungen wie Sialidose oder zu chronischen Entzündungen wie Xenosialitis führen (Broccolini und Mirabella, 2015; Khan und Sergi, 2018; Li und Chen, 2012). Xenosialitis ist vermutlich durch eine Entzündungsreaktion bedingt, welche als Folge von zirkulierenden anti-Neu5Gc Antikörper auftritt. Die Synthese von anti-Neu5Gc ist am ehesten auf in das Gewebe inkorporierte Neu5Gc, das der Mensch durch den Verzehr von rotem Fleisch aufgenommen wird, zurückzuführen (Li und Chen, 2012).

### 1.3.3 Sialinsäure-SIGLEC Achse als Therapieansatz

Die Sialinsäure-SIGLEC Achse spielt wie im vorherigen Abschnitt dargestellt eine Rolle bei der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und stellt als funktionelle Einheit einen potenziellen therapeutischen Ansatzpunkt dar. Trotz intensiver



Forschungsbemühungen stehen beim Morbus Alzheimer bisher fast ausschließlich symptomatische Therapien zur Verfügung. Ein aktueller kausaler Therapieansatz, der jedoch nicht direkt an der Sialinsäure-SIGLEC Achse wirkt, ist ein gegen A $\beta$  gerichteter Antikörper (Alexander et al., 2021; Hoekstra et al., 2018). Für Morbus Alzheimer ist SIGLEC-11 ein potenzieller therapeutischer Ansatzpunkt innerhalb der Sialinsäure-SIGLEC Achse. So verhinderte die Aktivierung von SIGLEC-11 durch die Hinzugabe von niedermolekularer Polysialinsäure eine Stimulation des Immunsystems mit A $\beta$  (Sato und Kitajima, 2013; Janas und Janas, 2011; Wang und Neumann, 2010). Dementsprechend hat die funktionelle Einheit aus Sialinsäure und SIGLEC in den vergangenen Jahren vermehrt Beachtung gefunden hat. Dabei ist SIGLEC-11 auf Grund seiner anti-inflammatorischen Eigenschaften im ZNS und seines Expressionsmusters nicht nur für Morbus Alzheimer ein interessante Zielstruktur und Bestandteil intensiver Forschungsbemühungen, sondern auch für andere neurologische Erkrankungen (Rawal und Zhao, 2021; Liao et al., 2021; Puigdellívol et al., 2020; Lünemann et al., 2021; Hane et al., 2021). Multiple Sklerose geht in der Regel mit einer entzündlichen Restaktivität einher, sodass die Sialinsäure-SIGLEC Achse bei dieser Erkrankung ebenfalls einen innovativen Ansatzpunkt darstellt. Eine bereits zugelassene Therapieoption bei Multipler Sklerose bilden anti-CD20 Therapien, die zu einer gezielten Zerstörung von B-Zellpopulationen führen und damit die inflammatorischen Aktivität reduzieren (Comi et al., 2021). Dementsprechend sind innerhalb der Sialinsäure-SIGLEC Achse SIGLEC-2 und SIGLEC-10, die vornehmlich auf B-Zellen exprimiert werden, von besonderem Interesse. Murine Knockout-Modelle zeigten einen Phänotyp ähnlich zu einer Autoimmunreaktion, sodass diese beiden SIGLEC eine entscheidende bei der Immuntoleranz einnehmen. Folglich könnten Therapiestrategien, die zu einer Steigerung der Immuntoleranz durch die Rekrutierung von SIGLEC-2 und SIGLEC-10 führen, eine innovativen therapeutischen Ansatzpunkt darstellen (Jellusova et al., 2010). Die antiinflammatorische Wirkung der Sialinsäure-SIGLEC Achse könnte als weiterer therapeutischer Ansatzpunkt für die Behandlung der Multiplen Sklerose genutzt werden. In präklinischen Experimenten konnte in murinen Sepsis-Modellen die starke anti-inflammatorische Wirkung der murinen Rezeptoren SIGLEC-E und SIGLEC-G bereits nachgewiesen werden (Chen et al., 2011; Spence et al., 2015). Weiterführend könnten über die Sialinsäure-SIGLEC Achse akute neurale Verletzungen wie beispielsweise der

Spinalkanalnerven therapiert werden. Die Applikation von Polysialinsäure führte zum erneuten Wachstum von Nervenzellen mit anschließender funktioneller Verbindung (El Maarouf et al., 2006; Papastefanaki et al., 2007). Hierfür existieren bereits präklinische Studien, die an der Sialinsäure-SIGLEC Achse ansetzen, sich jedoch noch in der frühen Entwicklungsphase befinden (Lünemann et al., 2021).

Darüber Hinaus ist die Sialinsäure-SIGLEC Achse auch für andere Erkrankungen ein potenzieller therapeutischer Ansatzpunkt. Bei der altersbedingten Makuladegeneration konnte in murinen Tiermodellen durch intravitreale Injektionen von Polysialinsäure der Gewebsschaden reduziert werden (Shahraz et al., 2015; Wang und Neumann, 2010; Karlstetter et al., 2017). Des Weiteren führte die Aktivierung des murinen SIGLEC-G zu einer abgeschwächten T-Zell Immunantwort in murinen Modellen für Graft-versus-Host Erkrankungen (Toubai et al., 2014). Auf Basis dieser Ergebnisse laufen erste klinische Studien mit CD24-Antikörpern für die Zulassung bei akuten Graft-versus-Host Reaktionen, unerwünschten Reaktionen bei Therapien mit Checkpoint-Inhibitoren sowie bei schweren COVID-19 Erkrankungen (Lünemann et al., 2021).

Trotz dieser ersten vielversprechenden Ergebnisse sind noch weitere wissenschaftliche Erkenntnisse beispielsweise hinsichtlich der Bioverfügbarkeit notwendig, damit Therapieansätze, die an der Sialinsäure-SIGLEC Achse ansetzen, aus der präklinischen in die klinische Forschung translatiert werden können. Dabei ist die Bindungsspezifität von Sialinsäure zu SIGLEC von Interesse und wie diese durch Modifikationen oder Nanopartikel erhöht werden kann (Lünemann et al., 2021; Murugesan et al., 2021; Läubli et al., 2022; Lenza et al., 2020).

#### 1.3.4 Weitere immunologische Signalwege der Sialinsäure

Seine anti-inflammatorische Wirkung kann Polysialinsäure nicht nur über SIGLEC vermitteln. In einer aktuellen Studie konnte für niedermolekulare Polysialinsäure ebenfalls eine anti-inflammatorische Wirkung durch Properdin über den alternativen Weg des Komplementsystems gezeigt werden (Shahraz et al., 2022). Als Bestandteil des alternativen Wegs des Komplementsystems gehört Properdin zum angeborenen Immunsystem. Eine wesentliche

Funktion von Properdin liegt in der Stabilisierung der C3-Konvertase, die als Protease eine entscheidende Funktion in der Signalkaskade des Komplementsystems einnimmt. Durch diese Verstärkung des alternativen Wegs des Komplementsystems wird die Formierung des terminalen Komplementkomplex (TCC) an die geschädigte Zelloberfläche begünstigt (Chen et al., 2018). In einer aktuellen Studie der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass niedermolekulare Polysialinsäure an Properdin und die Oberfläche von geschädigten Zellen bindet. Dabei zeigte sich für niedermolekulare Polysialinsäure eine konzentrationsabhängige Unterdrückung der Bildung eines TCC. Der genaue molekulare Wirkmechanismus für die anti-inflammatorische Wirkung von niedermolekularer Polysialinsäure bleibt aber unklar (Shahraz et al., 2022). Die Interaktion zwischen Properdin, bei dem es sich um ein starkes Kation handelt, und Sialinsäure, die ein starkes Anion ist, beruht auf einer Ionenbindung (Kouser et al., 2018; Manzi et al., 1994). Bei einer Bindung zwischen Kohlenhydraten und Proteinen wäre eine Bindungsart mit geringerer Bindungsstärke zu erwarten. Die höhere Bindungsstärke könnte durch die Interaktion mit anderen Molekülen, welche die Bindung begünstigen, bedingt sein (Chen et al., 2018). Grund für diese Annahme ist Faktor H, der ein wichtiger Gegenspieler von Properdin ist. Faktor H inhibiert die C3-Konvertase und führt über Faktor I zur beschleunigten Spaltung von C3b (Kouser et al., 2013; Merle et al., 2015; Pedersen et al., 2019). Bei Faktor H kann die Affinität zu C3b durch membranassoziierte sialysierte Glykokonjugate erhöht werden (Zipfel et al., 2008; Zipfel und Skerka, 2009; Hyvärinen et al., 2016). Hervorzuheben ist, dass Faktor H dabei nicht  $\alpha$ 2,8-verknüpfte niedermolekulare Polysialinsäure bindet, sondern  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäure (Shahraz et al., 2022; Blaum et al., 2015). Dementsprechend existieren mit niedermolekularer Polysialinsäure und mit sialinsäurehaltigen Konjugaten sowie Oligosacchariden innerhalb des Komplementsystems mehrere Regulationsmechanismen, die die Bindungsspezifität von Properdin oder Faktor H modulieren. Die Relevanz von sialinsäurehaltigen Molekülen zur Modulation von Signalprozessen innerhalb des Komplementsystems wurde in der jüngeren Vergangenheit bereits mehrmals beschrieben (Abeln et al., 2019; Klaus et al., 2020; Linnartz et al., 2012).

Neben einer anti-inflammatorischen Wirkung, die über das Komplementsystem und der Sialinsäure-SIGLEC Achse vermittelt wird, werden in der Literatur auch noch weitere

modulatorische Effekte von Sialinsäure, insbesondere in seiner löslichen Form, auf die unmittelbare Umgebung beschrieben. Die lösliche Form von Sialinsäure entsteht durch die enzymatische Abspaltung von den Trägermolekülen (Hildebrandt et al., 2007; Shahrzad et al., 2015; Shahrzad et al., 2022). So ist die Bindung von gelöster Polysialinsäure an diverse Wachstumsfaktoren beschrieben, wodurch diese vor Proteolyse geschützt, in Vesikeln gespeichert oder die Bindung an Rezeptoren beeinflusst werden (Kanato et al., 2008; Strubl et al., 2018). Andere Daten zeigen, dass im Serum gelöste Sialinsäure die Zytotoxizität gegenüber Histone verringern kann (Zlatina et al., 2018).

#### 1.4 Fragestellung

Die Zelloberfläche ist mit einer dichten Schicht von vielfältigen Glykanen überzogen, die in ihrer Gesamtheit die Glykokalyx bilden und an Proteine sowie Lipide gebunden sind (Varki et al., 2015). Ein häufig vorkommendes Glykan ist die heterogene Gruppe der Sialinsäure (Angata und Varki, 2002). Zusammen mit SIGLEC bildet Sialinsäure eine funktionelle Einheit, die als sogenannte Sialinsäure-SIGLEC Achse eine entscheidende Rolle bei der Steuerung von Signalwegen der angeborenen Immunabwehr besitzt (Zeng et al., 2018; Zeng, 2017; Varki et al., 2015; Formosa-Dague et al., 2018).

Mit zunehmendem Lebensalter erhält die angeborene Immunantwort eine wachsende immunologische Bedeutung, weil die Leistungsfähigkeit des adaptiven Immunsystems kontinuierlich abnimmt. Damit einhergehend gewinnt auch die Sialinsäure-SIGLEC Achse mit zunehmenden Alter an Relevanz (Franceschi et al., 2018a; Serrano-López und Martín-Antonio, 2021). Im Zusammenspiel mit weiteren altersbedingten Veränderungen wie der Akkumulation von Schäden der DNA und Telomerverkürzungen kommt es zu einer chronischen sterilen Inflammation (Franceschi und Campisi, 2014; Thomas et al., 2020; Schmauck-Medina et al., 2022). Diese immunologischen Veränderungen stehen im Zusammenhang mit der Pathogenese von altersbedingten Erkrankungen. Hierzu zählen beispielsweise neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson (Barbé-Tuana et al., 2020; Franceschi et al., 2018b). Dementsprechend ist die Sialinsäure-SIGLEC Achse auf Grund

der immunmodulierenden Wirkung ein potenzieller therapeutischer Ansatzpunkt bei den neurodegenerativen Erkrankungen. Innerhalb der Sialinsäure-SIGLEC Achse stellt SIGLEC-11 eine vielversprechende Zielstruktur dar, da dieser Rezeptor vornehmlich im ZNS, genauer gesagt auf Mikrogliazellen, exprimiert wird (Lünemann et al., 2021). Es ist bekannt, dass kurzkettige Sialinsäure sowohl in in-vivo als auch in in-vitro einen anti-inflammatorischen Effekt zeigt (Shahraz et al., 2015; Gretenkort et al., 2023). Langkettige Polysialinsäure zeigte in Vorarbeiten ebenfalls einen anti-inflammatorischen Effekt, jedoch wirkte es sich negativ auf die metabolische Aktivität aus (Shahraz, 2016; Shahraz et al., 2015). Für eine zukünftige Zulassung müssen neben den biologischen Signalwegen der Sialinsäure-SIGLEC Achse, auch die Bindungsinteraktion zwischen SIGLEC-11 und Sialinsäure besser verstanden werden. In dieser Dissertation wird die Bindungsspezifität von Sialinsäure unterschiedlicher Polymerisierungsgrade zu SIGLEC-11 in Relation zu SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 analysiert, um kurzkettige Polysialinsäure als Wirkstoffkandidat weitergehend zu evaluieren. Gleichzeitig können die gewonnenen Erkenntnisse Grundlage für weitergehende Experimente zur Erforschung der zellulären Signalwege der Sialinsäure-SIGLEC Achse sein. Dabei kann ein verbessertes Verständnis der Sialinsäure-SIGLEC Achse auch Ausgangspunkt für Therapieansätze von weiteren altersbedingten Erkrankungen sein.

Zusammenfassend soll in dieser Dissertation der Fragestellung nachgegangen werden, ob SIGLEC-11, der Bestandteil der Sialinsäure-SIGLEC Achse ist und beim Menschen vornehmlich auf Mikroglia exprimiert wird, einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt bei neurodegenerativen Erkrankungen darstellt. Zur Evaluation des Potenzials als therapeutischen Ansatzpunkt wird in dieser Dissertation die Bindungsspezifität zwischen kurzkettiger Polysialinsäure und SIGLEC-11 analysiert.

## 2. Material und Methoden

Nachfolgend sind die Materialien und Methoden näher beschrieben, die zur Untersuchung der Bindungsspezifität zwischen Polysialinsäure und SIGLEC-11 verwendet wurden. Die Charakterisierung der Bindungsspezifität von Polysialinsäure zu SIGLEC-11 erfolgte anhand eines Enzymimmunoassay (ELISA). Als Referenz dienten SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10. Im ersten Schritt wurden die SIGLEC Fc-Fusionsplasmide kloniert. Für die Zellkultur wurden modifizierte humane embryonale Nierenzellen (HEK 293 Zellen) verwendet. Bei den modifizierten HEK 293 Zellen handelt es sich um die Zelllinie Freestyle™ HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] (HEK 293-F Zellen), die mit den jeweiligen SIGLEC Fc-Fusionsplasmiden transfiziert wurde. Anschließend wurden die durch die transfizierten HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] synthetisierten SIGLEC Fc-Fusionsproteine aus dem Zellkulturüberstand mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgereinigt. Im letzten Schritt wurde die Bindungsspezifität zwischen Polysialinsäure und SIGLEC mittels eines ELISA gemessen. Für eine bessere Übersichtlichkeit umfasst der Begriff „SIGLEC“ in dem Kapitel „Material und Methoden“ die Rezeptoren SIGLEC-3, SIGLEC-5, SIGLEC-10 und SIGLEC-11.

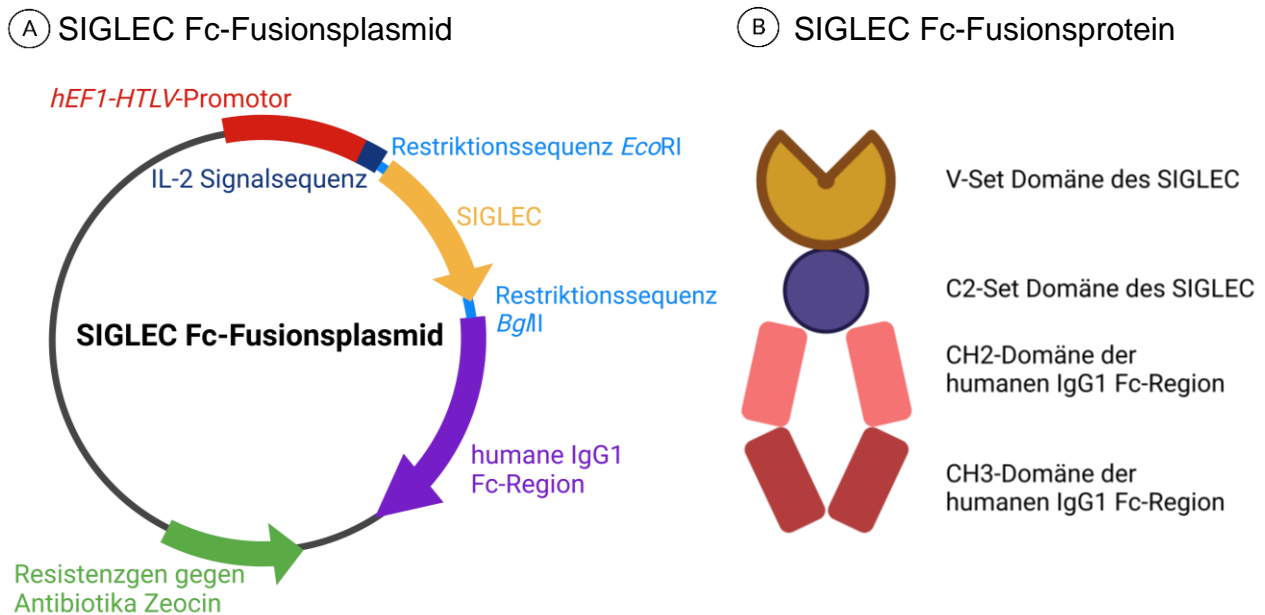
### 2.1 Klonierung des SIGLEC Fc-Fusionsplasmids

#### 2.1.1 Planung

Zur Klonierung des SIGLEC Fc-Fusionsplasmid wurde der pFuse-hlgG1-Fc2-Vektor [InvivoGen] ausgewählt. Die im Namen des Vektors enthaltene Abkürzung hlgG1-Fc2 steht für Fc-Region mit der CH2-Domäne und CH3-Domäne der humanen schweren Kette des Immunglobulin G1. Dieses Plasmid ist ein Vektor, der speziell für die Klonierung von Fc-Fusionsplasmiden und die anschließende Proteinbiosynthese von Fc-Fusionsproteinen entwickelt wurde. Für die Fusion des Inserts mit dem pFuse-hlgG1-Fc2-Vektor [InvivoGen] besitzt der Vektor einen Polylinker mit multiplen Bindungsstellen für Restriktionsenzyme. In dieser Dissertation wurden als Schnittstellen die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* [ThermoFisher] und *BglII* [ThermoFisher] ausgewählt. Auf den Polylinker folgend

enthält der Vektor die genetischen Informationen für die humane CH2-Domäne und CH3-Domäne der schweren Kette des Immunglobulin G (IgG). Durch die humane IgG1 Fc-Region kann das SIGLEC Fc-Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie aus dem Überstand eines Zellkultursystems mit einem hohen Reinheitsgrad aufgereinigt werden. Für die Transkription der genetischen Information des Inserts enthält der pFuse-hIgG1-Fc2-Vektor [InvivoGen] einen Promotor, der dem Polylinker vorgeschaltet ist. Hierbei handelte es sich um einen zusammengesetzten Promotor, bei dem das R-Segment und ein Teil der U5-Sequenz des humanen T-Zell-Leukämie-Virus (HTLV) an den Kernpromotor des humanen Elongationsfaktors-1 $\alpha$  (hEF1) gekoppelt ist. Die durch die HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] synthetisierten Fc-Fusionsproteine werden natürlicherweise nicht sezerniert. Daher besitzt der pFuse-hIgG1-Fc2-Vektor [InvivoGen] eine Interleukin 2-Signalsequenz (IL2-Signalsequenz), dessen genetische Information sich zwischen dem *hEF1-HTLV*-Promotor und dem Polylinker befindet. Dieses IL2-Signalpeptid leitet zum Ende der Proteinbiosynthese die Sekretion des SIGLEC Fc-Fusionsprotein in den Überstand eines Zellkultursystems ein. Nach erfolgter Sekretion wird die IL2-Signalsequenz vom SIGLEC Fc-Fusionsprotein abgespalten. Des Weiteren besitzt das pFuse-hIgG1-Fc2-Vektors [InvivoGen] die genetische Information für eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Zeocin. Dieses Resistenzgen, welches vom Bakterium *Streptoalloteichus hindustanus* stammt, ermöglicht die Selektion während des Klonierungsprozesses.

Das Insert umfasste die V-Set Ig-Domäne sowie die erste C2-Set Ig-Domäne der jeweiligen SIGLEC. Die V-Set Ig-Domäne enthält die Bindungsstelle von Sialinsäure. Die Berücksichtigung der ersten C2-Set Ig-Domäne sorgte wie unter physiologischen Bedingungen für die Projektion der Bindungsstelle in den freien Raum. Die DNA-Sequenz von SIGLEC-3, SIGLEC-5, SIGLEC-10 und SIGLEC-11 sowie der dazugehörige strukturelle Aufbau wurde der öffentlichen Datenbank vom National Center for Biotechnology Information über die Software geneious [biomatters] entnommen. Eine schematische Darstellung des SIGLEC Fc-Fusionsplasmids (A) und des SIGLEC Fc-Fusionsprotein (B) sind in Abbildung 3 dargestellt.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung des klonierten SIGLEC Fc-Fusionsplasmids (A) und des SIGLEC Fc-Fusionsproteins (B). Das SIGLEC Fc-Fusionsplasmid setzt sich aus dem pFuse-hIgG1-Fc2 Vektor [InvivoGen], der eine Basenpaarlänge von 4172 Basenpaaren (bp) hat, und dem jeweiligen SIGLEC als Insert zusammen. Die Basenpaarlängen der einzelnen SIGLEC beträgt für SIGLEC-3 748 bp, für SIGLEC-5 697 bp, für SIGLEC-10 685 bp und für SIGLEC-11 768 bp. Ergänzend sind die relevanten Gene des pFuse-hIgG1-Fc2 Vektor [InvivoGen] vermerkt. (Erstellt mit BioRender.com)

### 2.1.2 Restriktion und Ligation

Für die Klonierung der SIGLEC Fc-Fusionsplasmide wurde im nächsten Schritt die Restriktion mit anschließender Ligation durchgeführt. Zuerst wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die DNA vom jeweiligen SIGLEC, das als Insert in den pFuse-hIgG1-Fc2 Vektor [InvivoGen] kloniert wurde, amplifiziert. Der zur Durchführung der PCR verwendete Reaktionsansatz ist Tabelle 1 zu entnehmen.

**Tab. 1:** Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Amplifikation des DNA-Abschnitts der jeweiligen SIGLEC zur Klonierung der SIGLEC Fc-Fusionsplasmide mittels PCR.

Reagenz	Menge	Hersteller
DNA vom jeweiligen SIGLEC	0.5 µl	
Vorwärtsprimer	1 µl	Invitrogen
Rückwärtsprimer	1 µl	Invitrogen
AccuPrime™	22.5 µl	Invitrogen



Die zur Amplifizierung der DNA verwendeten Primer sind mit der Software geneious [Biomatters] geplant und durch ThermoFisher synthetisiert worden. Die entsprechenden Sequenzen sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Im Zuge dessen ist zu erwähnen, dass auf Grund eines herstellerbedingten Designfehlers beim pFuse-hlgG1-Fc2 Vektor [InvivoGen] bei der Nukleotidsequenz von dem Vorwärtsprimer noch eine zusätzliche Base eingefügt werden musste. Unkorrigiert hätte dieses nach erfolgter Ligation zu einem Verschiebung des Leserasters geführt.

**Tab. 2:** Nukleotidsequenzen der jeweiligen Primer zur Amplifikation des DNA-Abschnitts der jeweiligen SIGLEC zur Klonierung der SIGLEC Fc-Fusionsplasmide mittels PCR. Die Primer wurden mit Hilfe der Software geneious [Biomatters] geplant. Im Anschluss wurde diese durch das Unternehmen ThermoFisher synthetisiert.

<b>SIGLEC</b>	<b>Vorwärtsprimer (3'→5')</b>	<b>Rückwärtsprimer (5'→3')</b>
SIGLEC-3	ACAGTGCTTAAGCTAGCTGGGGTT	ATGTGTGAGTTTTGTCAGATCT
SIGLEC-5	ACAGTGCTTAAGCTAGCTCTTCGG	ATGTGTGAGTTTTGTCAGATCT
SIGLEC-10	ACAGTGCTTAAGCTAGTACCTGCC	ATGTGTGAGTTTTGTCAGATCT
SIGLEC-11	ACAGTGCTTAAGCTAGGACTTGTT	ATGTGTGAGTTTTGTCAGATCT

Nach Ansetzen des Reaktionsansatzes für die PCR wurde diese unter den in Tabelle 3 aufgeführten Reaktionsbedingungen in einem Thermocycler T3 [Biometra] durchgeführt.

**Tab. 3:** PCR-Programm zur Amplifikation des DNA-Abschnitts vom jeweiligen SIGLEC zur Klonierung der SIGLEC Fc-Fusionsplasmide.

<b>Prozessschritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zykluswiederholung</b>
Initialisierung	94 °C	180 Sekunden	1x
Denaturierung	94 °C	35 Sekunden	
Primerhybridisierung	60 °C	40 Sekunden	36x
Elongation	68 °C	120 Sekunden	
Finale Elongation	68 °C	600 Sekunden	1x
Lagerung	4 °C	Unbestimmte Zeit	

Das Erhitzen der Reaktionskammer zum Beginn diente der Aktivierung der *Taq*-Polymerase, die Bestandteil des Ansatzes AccuPrime [Invitrogen] ist. Diesem Prozessschritt folgte ein dreiteiliger Zyklus zur Amplifikation der DNA, der mehrfach wiederholt wurde. Zur Lagerung

der amplifizierten DNA wurde die Reaktionskammer am Ende auf 4°C gekühlt. Abschließend wurde die amplifizierte DNA mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits [Qiagen] gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt.

Im nächsten Schritt wurde ein Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* [ThermoFisher] und *BglII* [ThermoFisher] bei 37 °C für 2 Stunden durchgeführt. Es wurde sowohl für den Vektor als auch für die jeweiligen Inserts ein separater Reaktionsansatz angesetzt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist für den Vektor der Tabelle 4 und für das Insert der Tabelle 5 zu entnehmen.

**Tab. 4:** Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den Doppelverdau des pFuse-hlgG1-Fc1 Vektors [InvivoGen] mit *EcoRI* [ThermoFisher] und *BglII* [ThermoFisher].

Reagenz	Menge	Hersteller
Restriktionsenzym <i>EcoRI</i>	1 µl	ThermoFisher
Restriktionsenzym <i>BglII</i>	1 µl	ThermoFisher
Restriktionsenzym Buffer B	2 µl	ThermoFisher
pFuse-hlgG1-Fc1	0.5 µl	Invitrogen
DEPC-behandeltes Wasser	Auffüllen auf 20 µl	ThermoFisher

**Tab. 5:** Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den Doppelverdau des Inserts, dem DNA-Abschnitts der jeweiligen SIGLEC, mit *EcoRI* [ThermoFisher] und *BglII* [ThermoFisher].

Reagenz	Menge	Hersteller
Restriktionsenzym <i>EcoRI</i>	1 µl	ThermoFisher
Restriktionsenzym <i>BglII</i>	1 µl	ThermoFisher
Restriktionsenzym Buffer B	2 µl	ThermoFisher
Amplifizierte DNA vom jeweiligen SIGLEC	8 µl	Invitrogen
DEPC-behandeltes Wasser	Auffüllen auf 20 µl	ThermoFisher

Nach erfolgtem Doppelverdau des Inserts und des pFuse-hlgG1-Fc1-Vektors [InvivoGen] wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, um die Probenqualität zu überprüfen und gleichzeitig die Probenreinheit zu steigern. Hierfür wurde die amplifizierte DNA separat auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde Gel-Star [Lonza] im Verhältnis 1:10.000 hinzugefügt und als Ladefarbstoff wurde DNA-Gel-Ladefarbstoff (6x konzentriert) [ThermoFisher] verwendet. Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte bei 130 Volt für

90 Minuten. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Banden vom Vektor und dem Insert mit Hilfe des Dark Reader Transilluminators [Clare Chemical Research] visualisiert. Die Größe der verdauten SIGLEC-Inserts betrug für SIGLEC-3 748 Basenpaare (bp), für SIGLEC-5 697 bp, für SIGLEC-10 685 bp und für SIGLEC-11 768 bp. Für den pFuse-hlgG1-Fc1-Vektor [InvivoGen] zeigten sich zwei Banden. Hierbei war die Bande mit einer Größe von 4172 bp von Interesse, da es sich um den aufgespalteten Vektor handelte. Bei der anderen Bande handelt es sich um den durch die Restriktionsenzyme ausgeschnitten Teil des Polylinkers mit einer Größe von 22 bp. Die Banden von Interesse wurden gemäß den Herstellerangaben mit dem QIAquick Gel Extraction Kit [Qiagen] aus dem Agarosegel aufgereinigt. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration mittels NanoDrop 2000 [ThermoFisher]. Anschließend erfolgte die Ligase des pFuse-hlgG1-Fc1-Vektor [InvivoGen] mit dem Insert durch die T4-DNA-Ligase [ThermoFisher] im T3-Thermocycler [Biometra]. Die Ligation wurde über Nacht bei 16 °C durchgeführt. Für eine optimale Effizienz der Ligation wurde ein molares Konzentrationsverhältnis von Insert zu Vektor von 3:1 genutzt. In Tabelle 6 ist der Reaktionsansatz für die Ligation aufgeführt.

**Tab. 6:** Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Ligation des verdauten pFuse-hlgG1-Fc1 Vektors [InvivoGen] mit dem verdauten Insert jeweiligen SIGLEC zur Klonierung der SIGLEC Fc-Fusionsplasmide.

<b>Reagenz</b>	<b>Menge</b>	<b>Hersteller</b>
T4-DNA-Ligase	1 µl	ThermoFisher
Verdauter pFuse-hlgG1-Fc1 Vektor	1 µl	Invitrogen
Verdaute DNA vom jeweiligen SIGLEC	Volumen für Konzentrationsverhältnis 3:1 (Insert zu Vektor)	
T4-DNA-Ligasebuffer	0.5 µl	ThermoFisher
DEPC-behandeltes Wasser	Auffüllen auf 5 µl	ThermoFisher

### 2.1.3 Selektion und Überprüfung auf Mutationen

Im nächsten Schritt wurden die erfolgreich klonierten SIGLEC Fc-Fusionsplasmide selektiert. Hierfür wurden kompetente *E. coli* Bakterien mit den jeweiligen SIGLEC Fc-Fusionsplasmide transfiziert. Für die Transfektion wurden 100 µl One Shot TOP10 chemisch kompetente *E. coli* Bakterien [ThermoFisher] für 20 Minuten langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 5 µl des jeweiligen SIGLEC Fc-Fusionsplasmids zu den kompetenten *E. coli* Bakterien [ThermoFisher] hinzugegeben und in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde das 1,5 ml Eppendorf-Tube für 30 Sekunden in einem Thermoblock [ThermoFisher] auf 42 °C erhitzt, damit das SIGLEC Fc-Fusionsplasmid die Zellwand der kompetenten *E. coli* Bakterien penetrieren kann. Nach der Inkubation über 30 Sekunden wurde das Eppendorf-Tube zum Abkühlen für fünf Minuten erneut auf Eis gestellt.

Im Anschluss wurde zu den *E. coli* Bakterien 900 µl LB-Medium hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde in einem Thermoblock [ThermoFisher] für eine Stunde bei 300 Umdrehungen pro Minute (rpm) und 37 °C inkubiert. Nach der initialen Vermehrung wurde die Zellsuspension für zwei Minuten bei 7.000 rpm in einer Heraeus™ Zentrifuge [ThermoFisher] zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agarplatten, welchen das Antibiotikum Zeocin in einer Konzentration von 100 µg/ml hinzugefügt worden war, aufgetragen und über Nacht bebrütet. Dieser Schritt diente dazu *E. coli* Bakterien zu selektieren, die erfolgreich mit dem SIGLEC Fc-Fusionsplasmid transfiziert worden waren und sich auf Grund der Antibiotikaresistenz gegen Zeocin während der Inkubation auf den LB-Agarplatten vermehren konnten [InvivoGen]. Nach der Bebrütung wurden zehn Kolonien für die Aufbereitung der SIGLEC Fc-Fusionsplasmide ausgewählt. Die isolierten Kolonien wurden in separate Röhrchen mit 3 ml LB-Medium, dem Zeocin in einer Konzentration von 1:1.000 hinzugefügt war, gegeben und im Thermoblock [ThermoFisher] für weitere sechs Stunden bei 250 rpm und 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das SIGLEC Fc-Fusionsplasmid mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit [Qiagen] gemäß den Herstellerangaben aus der Zellsuspension isoliert.

Nach der Isolierung von den SIGLEC Fc-Fusionsplasmiden wurde die Klonierung in einem zweistufigen Prozess überprüft. Im ersten Schritt wurde die erfolgreiche Ligation mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Für den Nachweis der erfolgreichen Ligation wurde ein Doppelverdau von den aufgereinigten SIGLEC Fc-Fusionsplasmiden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* [ThermoFisher] und *BglII* [ThermoFisher] für zwei Stunden bei 37 °C durchgeführt. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tab. 7:** Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den Doppelverdau des klonierten SIGLEC Fc-Fusionsplasmids mit *EcoRI* [ThermoFisher] und *BglII* [ThermoFisher].

Reagenz	Menge	Hersteller
Restriktionsenzym <i>EcoRI</i>	0.5 µl	ThermoFisher
Restriktionsenzym <i>BglII</i>	0.5 µl	ThermoFisher
Restriktionsenzym Buffer	2 µl	ThermoFisher
SIGLEC Fc-Fusionsplasmid	10 µl	
DEPC-behandeltes Wasser	7 µl	ThermoFisher

Die verdauten SIGLEC Fc-Fusionsplasmide wurden auf 1 % Agarosegel mit Gel-Star [Lonza] als Fluoreszenzfarbstoff, das in einem Verhältnis von 1:10.000 hinzugefügt wurde, geladen. Als Ladefarbstoff wurde DNA-Gel-Ladefarbstoff (6x konzentriert) [ThermoFisher] verwendet. Als Dauer für die Gelelektrophorese wurden 90 Minuten bei 130 Volt festgelegt.

Abschließend erfolgte der Ausschluss von Mutationen mittels einer direkten Gensequenzierung durch das Unternehmen Sequence Laboratories Göttingen GmbH. Die zur direkten Sequenzierung verwendeten Primer sind in Tabelle 8 aufgeführt. Sowohl für den Vorwärtsprimer als auch für den Rückwärtsprimer wurde jeweils ein Reaktionsansatz, der Tabelle 9 zu entnehmen ist, erstellt.

**Tab. 8:** Nukleotidsequenzen der jeweiligen Primer zur direkten Sequenzierung des SIGLEC Fc-Fusionsprotein durch das Unternehmen Sequence Laboratories Göttingen GmbH.

Primer	Nukleotidsequenz
Vorwärtsprimer (3'→5')	CCCCGAGCGTAGAGAGGAAG
Rückwärtsprimer (5'→3')	CACGGGAGGCGTGGTCTTGT

**Tab. 9:** Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die direkte Sequenzierung der SIGLEC Fc-Fusionsplasmide durch das Unternehmen Sequence Laboratories Göttingen GmbH. Für den Vorwärtsprimer sowie für den Rückwärtsprimer wurde jeweils ein separater Reaktionsansatz verwendet.

<b>Reagenz</b>	<b>Menge</b>	<b>Hersteller</b>
SIGLEC Fc-Fusionsplasmid	> 600 ng	
Primer	2 $\mu$ l	ThermoFisher
DEPC-behandeltes Wasser	Auffüllen auf 20 $\mu$ l	ThermoFisher

Durch diesen mehrstufigen Selektionsprozess konnten Mutationen, die während der Klonierung entstanden sind, innerhalb der SIGLEC Fc-Fusionsplasmide von SIGLEC-3, SIGLEC-5, SIGLEC-10 und SIGLEC-11 ausgeschlossen werden. Die selektierten SIGLEC Fc-Fusionsplasmide wurden bei -20 °C gelagert. Zusätzlich wurde eine Probe der korrespondierenden *E. coli* Zellsuspensionen für zukünftige Amplifikationen in Glycerin bei -80 °C gelagert.

#### 2.1.4 Amplifikation

Nach Selektion der jeweiligen SIGLEC Fc-Fusionsplasmide wurden diese für die Transfektion von HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] amplifiziert. Dazu wurde ein Aliquot der *E. coli* Zellsuspension, die wie im vorherigen Abschnitt beschrieben am Ende der Selektion aufbewahrt worden waren, in einen Erlenmeyerkolben [VWR] überführt. Als Medium wurde LB-Medium, dem Zeocin als Antibiotikum im Verhältnis 1:1.000 hinzugefügt wurde, verwendet. Die *E. coli* Zellsuspension wurde über Nacht in einem Thermoblock [ThermoFischer] bei 300 rpm und 37 °C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die *E. coli* Zellsuspension 10 Minuten lang bei 4.000 rpm zentrifugiert. Die Aufreinigung der amplifizierten SIGLEC Fc-Fusionsplasmide aus den *E. coli* erfolgte mit Hilfe des NucleoBond™ Xtra Maxi Kits [Macherey-Nagel] gemäß den Spezifikationen des Herstellers. Das aufgereinigte SIGLEC Fc-Fusionsplasmid wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

## 2.2 Proteinbiosynthese der SIGLEC Fc-Fusionsproteine

### 2.2.1 Einführung in das Freestyle™ 293 Expressionssystem

Das FreeStyle™ 293 Expressionssystem [ThermoFisher] ist speziell für die Synthese von Antikörpern sowie Proteinen in hohen Konzentrationen entwickelt worden und nutzt HEK 293-F Zellen [ThermoFisher], die von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293 Zellen) abstammen. Die HEK 293-F Zelllinie wurden entsprechend den Herstellerangaben bei -180°C gelagert und zur Kultivierung für 1 Minute bei 37 °C im Thermoblock [ThermoFisher] aufgetaut. Zur Zellkultivierung wurde das speziell für das FreeStyle™ HEK 293 Expressionssystem [ThermoFisher] entwickelte Medium GIBCO® FreeStyle™ 293 Expressionsmedium (HEK 293-F Medium) [ThermoFisher] verwendet. Die Kultivierung der HEK 293-F Zelllinie erfolgte im Heracell™ Inkubator [ThermoFisher] auf einem CO<sub>2</sub>-resistenten Schüttler [ThermoFisher] bei 125 rpm, 37 °C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 8 %. Während der Kultivierung wurde den Herstellerangaben entsprechend eine Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml nicht überschritten. Zur Kultivierung der HEK 293-F Zelllinie wurden Nalgene™ Einweg-PETG-Erlenmeyerkolben mit Schikaneboden [ThermoFisher] verwendet.

### 2.2.2 Kultivierung der Freestyle™ 293-F Zellen

Mit Erreichen einer Dichte von  $1,0 \times 10^6$  Zellen/ml wurde entsprechend den Herstellerspezifikationen eine Verdünnung der Zellkultur auf eine Dichte von  $0,2 \times 10^6$  Zellen/ml vorgenommen. Unter optimalen Bedingungen verdoppelte sich die Zellzahl der HEK 293-F Zelllinie jeden Tag, sodass für gewöhnlich die Zellkulturen jeden dritten Tag geteilt wurden. Um jederzeit eine sterile Arbeitsumgebung zu gewährleisten und eine akzidentielle Kontamination zu vermeiden, wurden alle Schritte unter einer Sicherheitswerkbank [ThermoFisher] durchgeführt.

Zur Verdünnung der Zellkultur der HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] wurde im ersten Schritt 5 ml der Zellkultur in ein 15 ml Falcon Röhrchen [Merck] überführt und die Zelldichte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer [Marienfeld] bestimmt. Anschließend wurde die Zellsuspension in einer Heraeus™ Zentrifuge [ThermoFisher] für 3 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Das

entstandene Zellpellet wurde in 1 ml HEK 293-F Zell Medium resuspendiert. Anschließend wurde die benötigte Zellzahl in eine neue sterile Nalgene™ Einweg-PETG-Erlenmeyerkolben mit Schikaneboden [ThermoFisher], die vorab bereits mit dem gewünschten Volumen an HEK 293-F Medium befüllt worden waren, um eine Zelldichte von  $0,2 \times 10^6$  Zellen/ml zu erreichen überführt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] unter den bereits genannten Spezifikationen.

### 2.2.3 Transfektion der Freestyle™ 293-F Zellen

Zur Biosynthese der gewünschten SIGLEC Fc-Fusionsproteine wurde eine Transfektion der HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] mit dem korrespondierenden SIGLEC Fc-Fusionsplasmid durchgeführt. Für optimale Voraussetzungen, während der Transfektion war eine Dichte von  $1,0 \times 10^6$  Zellen/ml erforderlich. Hierfür wurden die HEK 293-F Zelllinie [ThermoFisher] am Tag vor der Transfektion auf eine Dichte von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml verdünnt. Des Weiteren wurden die HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] in frisches HEK 293-F Medium sowie in einen neuen Nalgene™ Einweg-PETG-Erlenmeyerkolben mit Schikaneboden [ThermoFisher] überführt. Zur Durchführung der Transfektion wurden zwei Reaktionsansätze in 15 ml Falcon Röhren [Merck] angesetzt. Für den ersten Ansatz wurde 1 µg des SIGLEC Fc-Fusionsplasmids pro ml HEK 293-F Medium mit 33 µl Opti-MEM® I [ThermoFisher] pro ml HEK 293-F Medium gemischt. Für den zweiten Reaktionsansatz wurde 2 µl 293fectin™ Transfektionsreagenz (HEK 293-F lectin) [ThermoFisher] pro ml HEK 293-F Medium mit 33 µl Opti-MEM® I pro ml HEK 293-F Medium vermischt. Bei beiden Reaktionsansätzen bezieht sich die Volumenangabe ‚pro ml HEK 293-F Medium‘ auf das Gesamtvolumen von der Zellkultur der transfizierten HEK 293-F Zellen. Es folgte eine Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die beiden Reaktionsansätze miteinander vermischt, damit das HEK 293-F lectin einen Komplex mit dem SIGLEC Fc-Fusionsplasmid bildet. Die zweite Inkubation erfolgte für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz tröpfchenweise zu den HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] hinzugegeben. Unmittelbar nach der Transfektion wurden die HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] bei 37 °C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 8 % auf einem CO<sub>2</sub>-resistenten Schüttler [ThermoFisher] bei 250 rpm inkubiert.



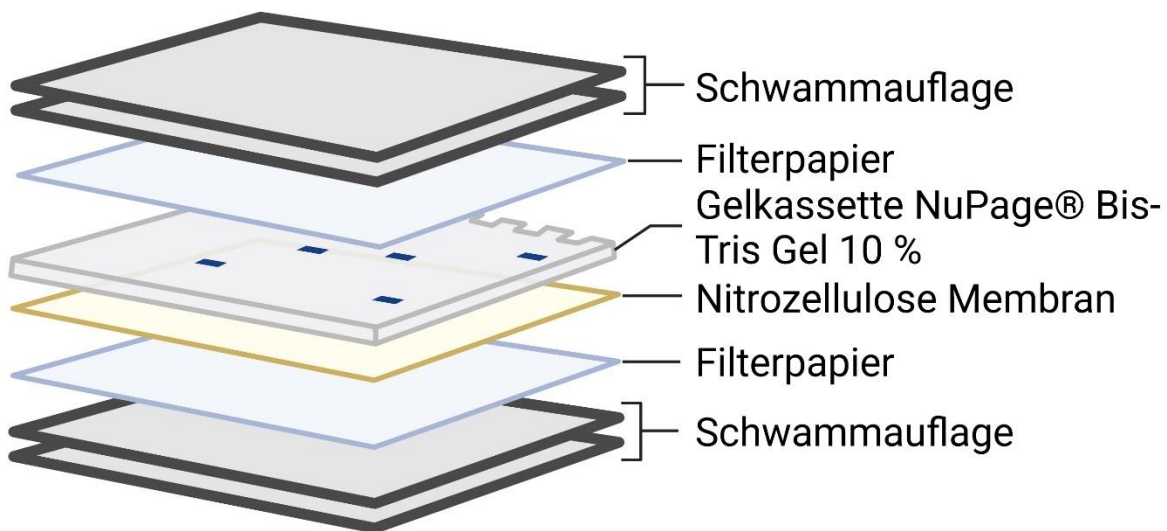
Das SIGLEC Fc-Fusionsprotein wurde auf Grund des IL2-Signalpeptid, welches Bestandteil des pFuse-hlgG1-Fc1-Vektor [InvivoGen] ist, in den Zellkulturüberstand sezerniert. Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen wurde der Überstand abgetragen. Die Vorbereitung zur Aufreinigung des SIGLEC Fc-Fusionsproteins aus dem Überstand erfolgte durch ein zweistufiges Verfahren. In der ersten Stufe wurde der Überstand in einer Heraeus™ Zentrifuge [ThermoFisher] für 5 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Für zukünftige Qualitätskontrollen wurde ein Aliquot vom Zellpalet entnommen und in ein 0,5 ml Eppendorf-Tube, welches mit einem Reaktionsansatz aus 100 µl Radio-Immunpräzipitations-Assay Puffer (RIPA-Puffer) [SIGMA] und 2 µl Halt™ Protease Inhibitor Cocktail [ThermoScientific] befüllt war, hinzugegeben. Im Anschluss erfolgte die unmittelbare Lagerung des Zelllysats bei -80 °C. Im zweiten Schritt wurde der Überstand mittels eines sterilen Corning® Spritzenfilters mit einer 0,45 µm Porenmembran [Merck] filtriert. Für die weitere Aufreinigung des SIGLEC Fc-Fusionsproteins wurde der Durchfluss bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.4 Nachweis der Synthese und Sezernierung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine

Die Fähigkeit der transfizierten HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] die SIGLEC Fc-Fusionsproteine zu synthetisieren und anschließend in den Zellkulturüberstand zu sezernieren wurde mit einem Western Blot überprüft. Zum Nachweis der Proteinbiosynthese wurde Zelllysate von transfizierten HEK 293-F Zellen, das wie im vorherigen Abschnitt beschrieben bei -80 °C gelagert wurde, verwendet. Zuerst wurde das Zelllysate eine Stunde lang auf Eis aufgetaut. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C. Währenddessen wurde die Apparatur zur Durchführung einer Gelelektrophorese, das den ersten Schritt eines Western Blot darstellt, vorbereitet. Als Gelmatrix wurde die vorgefertigte Gelkassette Nu-Page® Bis-Tris Gel 10% [Invitrogen] genutzt. Diese Gelkassette wurde gemeinsam mit dem Pufferkern mit Elektroden für XCell [Invitrogen] in das Blotmodul XCell SureLock® Mini-Zelle [Invitrogen] gestellt und mit Hilfe einer Gel-Spannungshalterung verriegelt. Danach wurde das Blotmodul sowie der Pufferkern mit Elektroden für Xcell [Invitrogen] mit NuPage® MES SDS Running Buffer [Invitrogen] gefüllt. Nach der Zentrifugation wurden vom Probenüberstand 20 µl in ein Eppendorf-Tube, das mit 5 µl NuPage® Probenbuffer (4x konzentriert)

[Invitrogen] als Ladefarbstoff vorbefüllt war, gegeben. Von diesem Reaktionsansatz wurden anschließend 20 µl in die Geltaschen der Gelkassette gegeben. Als Marker für das Molekulargewicht wurde PageRuler™ Plus [ThermoFisher] verwendet. Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte auf Eis bei 130 V für 90 Minuten.

Im nächsten Schritt des Western Blot wurden die durch die Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinbanden auf eine Nitrozellulosemembran 0,45 µm [ThermoScientific] als feste Trägermembran übertragen. Als Transfermethode wurde ein nasses Transfersystem, bei dem das NuPage® Bis-Tris Gel 10% [Invitrogen] zu Kathode und die Transfermembran zur Anode ausgerichtet war, verwendet. Der schematische Aufbau des Western Blots ist in Abbildung 4 dargestellt.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung des Western Blots zum Nachweis der Biosynthese der SIGLEC Fc-Fusionsproteine und deren Sezernierung in den Zellkulturüberstand. Es wurde ein nasses Transfersystem verwendet. Hierfür wurde die Gelkassette NuPage® Bis-Tris Gel 10% [Invitrogen] der Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulose Membran [ThermoScientific] platziert. Diese Konstruktion wurde sowohl von unten als auch von oben mit Filterpapier sowie Schwammauflagen umgeben und anschließend in das XCell II Blot Module [ThermoFisher] platziert. Das Blotmodul wurde daraufhin in die XCell SureLock® Mini-Zelle eingespannt und mit NuPage® MES SDS Transferpuffer [Invitrogen] befüllt. Anschließend erfolgte der Proteintransfer. (Erstellt mit BioRender.com)

Der Blotsandwich wurde in das XCell II™ Blot Modul [Invitrogen], welches im Anschluss vertikal in die XCell SureLock® Mini-Zelle [Invitrogen] eingesetzt wurde, platziert. Anschließend wurden die Kassette und das XCell II™ Blot Modul [Invitrogen] mit NuPage® MES SDS Transferpuffer [Invitrogen] befüllt. Der Transfer erfolgte auf Eis bei 380 mA für eine Stunde.

Im letzten Schritt erfolgte die Visualisierung der auf die Nitrozellulosemembran [ThermoScientific] übertragenen SIGLEC Fc-Fusionsproteine mittels Immundetektion. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran [ThermoScientific] in ein 50 ml Falcon Röhrchen [Merck], in dem alle nun folgenden Schritte durchgeführt wurden, überführt. Hierbei wurde die Nitrozellulosemembran [ThermoScientific] so platziert, dass die Membranseite, auf deren Oberfläche sich die SIGLEC Fc-Fusionsproteine befanden, in den Hohlraum des Röhrchens zeigte. Um freie Bindungsstellen abzusättigen, erfolgte zuerst auf einem Rotator für Probenröhrchen [VWR] eine Inkubation in 20 ml trisgepufferte Saline mit Tween 20 (TBS-T) mit 5% Milchpulver [Roth] für eine Stunde bei Raumtemperatur. Als primärer Antikörper wurde Biotin-SP AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fc $\gamma$ -Fragment spezifisch [Jackson] verwendet, der in 20 ml TBS-T mit 5 % Milchpulver [Roth] im Verhältnis 1:1.000 verdünnt wurde. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C auf dem Rotator für Probenröhrchen [VWR]. Am nächsten Tag wurde die Membran insgesamt dreimal für jeweils fünf Minuten mit 20 ml TBS-T gewaschen. Anschließend wurde Streptavidin, Meerrettich Peroxidase (HRP) [Merck], das in 20 ml TBS-T mit 5 % Milchpulver im Verhältnis 1:1.000 verdünnt wurde, als sekundärer Antikörper in das Falcon Röhrchen [Merck] hinzugegeben. Die Nitrozellulosemembran wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rotator für Probenröhrchen [VWR] mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal mit 20 ml TBS-T für jeweils fünf Minuten gewaschen. Die Visualisierung erfolgte gemäß den Herstellerangaben mit dem SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent [ThermoFisher]. Zur Visualisierung der Banden wurde das Gerät ChemiDoc [BioRadiations] verwendet. Für die abschließende Auswertung wurde die Software Image Lab™ [BioRadiations] verwendet.

Zur Überprüfung der Fähigkeit von transfizierten HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] das synthetisierte SIGLEC Fc-Fusionsprotein in den Zellkulturüberstand zu sezernieren, wurde analog zum Zellysate ein Western Blot mit dem Überstand durchgeführt. Hierfür wurde eine Probe

des Überstands, das wie im vorherigen Abschnitt beschrieben nach einer fünftägigen Inkubation der transfizierten HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] aufbereitet und gelagert wurde, verwendet. Für die Durchführung der Gelelektrophorese, des nassen Transfersystems sowie der Immundetektion wurden dieselben Geräteeinstellungen und Spezifikationen wie für den Western Blot des Zelllysats verwendet.

#### 2.2.5 Aufreinigung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine

Die Aufreinigung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine aus dem Zellkulturüberstand von vorher transfizierten HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] erfolgte mittels HPLC. Zur Aufreinigung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine wurde Überstand verwendet, der wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben gewonnen, vorbehandelt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde. Der gesamte Prozess der Aufreinigung lässt sich in die vier Schritte Äquilibration, Beladung, Waschen und Elution unterteilen. Bei der verwendeten HPLC handelte es sich um das Modell ÄKTA [GE Healthcare] mit einem Zweipumpensystem, an das ein photometrischer UV-Detektor mit einer Absorption bei 205/280 nm [Pharmacia Biotech] installiert war. Die Prozessüberwachung und Datenauswertung erfolgte mit der Software Unicorn 1.0 [Bioprocess]. Lag das Gesamtvolumen des Zellkulturüberstand unter 50 ml, wurde eine 1 ml HiTrap Protein A Säule [GE Healthcare] mit einer Flussrate von 1 ml/min für die Aufreinigung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine verwendet. Für Volumina größer 50 ml wurde eine 5 ml HiTrap Protein A Säule [GE Healthcare] mit einer Flussrate von 5 ml/min verwendet. Vor Einspannen der Protein A Säule in die HPLC wurde die Pumpe B mit 0,1 M Glycin (pH 3) [Roth] und anschließend die Pumpe A mit phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) (pH 7) [ThermoFisher] vorgefüllt. Nach Einspannen der gewünschten Protein A Säule in die HPLC wurde diese mit PBS äquilibriert. Das Volumen zur Äquilibration betrug das zehnfache Säulenvolumen. Dieser erste Schritt diente dazu, um optimale Bedingungen für die Bindung des SIGLEC Fc-Fusionsproteins an die Matrix der Protein A Säule zu schaffen. Im zweiten Schritt wurde die Protein A Säule mit dem Zellkulturüberstand durch die Pumpe A beladen. Während der Beladung band das SIGLEC Fc-Fusionsprotein an die Protein A Matrix der Säule, sodass es im Gegensatz zu den anderen Bestandteilen des Überstands in dieser verblieb. Auf diesen Schritt folgte das

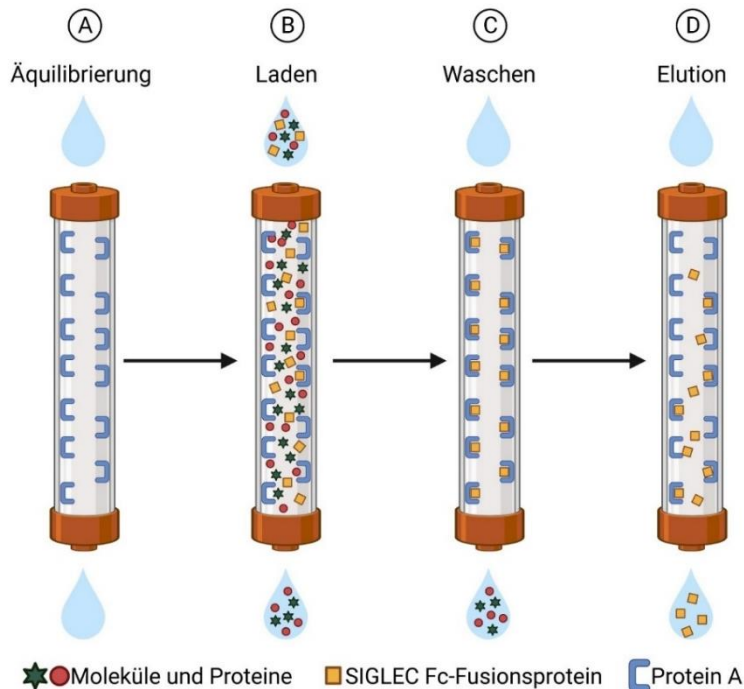
Waschen, um Proteine und Moleküle, die nicht an die Protein A Matrix gebunden hatte, jedoch noch in der Säulenmatrix zurückgeblieben waren, auszuwaschen. Am Ende von diesem Schritt verblieb nur noch das an die Protein A Matrix gebundene SIGLEC Fc-Fusionsprotein innerhalb der Säule. Während der Elution, das den letzten Schritt der Aufreinigung darstellte, wurde die nicht-kovalente Bindung zwischen dem SIGLEC Fc-Fusionsprotein und dem Protein A durch die Hinzugabe von 0,1 M Glycin (pH 3) [Roth] gelöst. Zur Effizienzsteigerung der Elution wurde ein linearer Gradient eingesetzt. Dementsprechend nahm der prozentuale Anteil von PBS (pH 7) [ThermoFisher] in der mobilen Phase stetig ab, während der Anteil von 0,1 M Glycin (pH 3) [Roth] anstieg. Das Gesamtvolumen für die Elution entsprach dem zehnfachen des Säulenvolums. Der Ausfluss wurde diesmal nicht, wie es bei den vorherigen Schritten der Fall gewesen war, verworfen, sondern wurde durch den Rotationssammler FH-930 [GE Healthcare] in 15 ml Falcon Röhrchen [Merck] fraktioniert gesammelt. Zur Pufferung wurden diese vorab mit 20 µl 1 M Trometamol (TRIS) (pH 9) [Roth] befüllt. Bei der Säule mit einem Fassungsvermögen von 1 ml wurde eine Fraktionsgröße von 1 ml und für die Säule mit einem Fassungsvermögen von 5 ml eine Fraktionsgröße von 5 ml gewählt. Die Falcon Röhrchen [Merck], bei denen in der Echtzeitanalyse durch den UV-Detektor [Pharmacia Biotech] ein Anstieg der UV-Absorption detektierte, wurden ausgewählt. Bei diesen Falcon Röhrchen [Merck] wurde der pH-Wert direkt auf 7 eingestellt. Anschließend wurden die Proben wie im folgenden Abschnitt beschrieben aufbereitet und gelagert. Die Programmspezifikationen für die einzelnen Prozessschritte der HPLC sind in der Tabelle 10 für die 1 ml HiTrap Protein A Säule [GE Healthcare] und in der Tabelle 11 für die 5 ml HiTrap Protein A Säule [GE Healthcare] aufgeführt. Der schematische Ablauf der Aufreinigung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine aus dem Zellkulturüberstand ist in Abbildung 5 dargestellt.

**Tab. 10** HPLC-Programm zur Aufreinigung der synthetisierte SIGLEC Fc-Fusionsproteine aus dem Zellkulturüberstand von transfizierten HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] von Proben mit einem Gesamtvolumen von kleiner 50 ml. Für die Aufreinigung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine wurde eine 1 ml HiTrap Protein A Säule [GE Healthcare] genutzt.

<b>Prozessschritt</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Dauer</b>	<b>Flussrate</b>	<b>Hersteller</b>
Äquilibration	PBS (pH 7)	10 Säulenvolumen	1 ml/min	ThermoFisher
Laden	Zellkulturüberstand	Abhängig von Volumen des Zellkulturüberstands	1 ml/min	
Waschen	PBS (pH 7)	Bis UV-Wert eine stabile Phase erreicht	1 ml/min	ThermoFisher
Elution	PBS (pH 7) & 0.1 M Glycin (pH 3)	10 Säulenvolumen	1 ml/min	ThermoFisher, Roth

**Tab. 11:** HPLC-Programm zur Aufreinigung der synthetisierte SIGLEC Fc-Fusionsproteine aus dem Zellkulturüberstand von transfizierten HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] von Proben mit einem Gesamtvolumen von größer 50 ml. Für die Aufreinigung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine wurde eine 5 ml HiTrap Protein A Säule [GE Healthcare] genutzt.

<b>Prozessschritt</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Dauer</b>	<b>Flussrate</b>	<b>Hersteller</b>
Äquilibration	PBS (pH 7)	10 Säulenvolumen	5 ml/min	ThermoFisher
Laden	Zellkulturüberstand	Abhängig von Volumen des Zellkulturüberstands	5 ml/min	
Waschen	PBS (pH 7)	Bis UV-Wert eine stabile Phase erreicht	5 ml/min	ThermoFisher
Elution	PBS (pH 7) & 0.1 M Glycin (pH 3)	10 Säulenvolumen	5 ml/min	ThermoFisher, Roth



**Abb. 5:** Schematische Darstellung des Ablaufs der HPLC zur Aufreinigung des SIGLEC Fc-Fusionsproteins aus dem Zellkulturüberstand. Zuerst erfolgte die Äquilibration der HiTrap Protein A Säule [GE Healthcare] (A). Auf diesen Schritt folgte die Beladung der Säule mit dem Überstand, der von mit SIGLEC Fc-Fusionsplasmiden transfizierten HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] stammte (B). Der humane IgG1-Fc-Teil der SIGLEC Fc-Fusionsproteine sorgte für die Bindung an das an die Säulenmatrix gebundene Protein A. Hierdurch verblieben die SIGLEC Fc-Fusionsproteine während des Waschschriffs in der Säule. Die restlichen, nicht gebundenen Proteine sowie Moleküle wurden aus der Säule ausgewaschen (C). Der letzte Schritt war die Elution (D). In diesem Schritt wurde die nicht-kovalente Bindung zwischen dem Protein A und dem SIGLEC Fc-Fusionsprotein durch das Elutionsmedium aufgehoben, sodass das SIGLEC Fc-Fusionsprotein aus der Säule ausgewaschen und mit dem Durchfluss gesammelt werden konnte. (Erstellt mit BioRender.com)

### 2.2.6 Aufbewahrung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine

Nach der erfolgreichen Aufreinigung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine aus dem Zellkulturüberstand wurden die Fraktionen von der Elution, die einen Anstieg der UV-Absorption während der Elution gezeigt hatten und damit das SIGLEC Fc-Fusionsprotein enthielten, für die

Lagerung aufbereitet. Hierzu wurde zuerst eine Zentrifugalfiltration mit Amicon® Ultra 0,5 ml Zentrifugalfilter [Merck], die ein Cut-Off Wert von 3 kDa besaßen, durchgeführt. Die Zentrifugalfiltration diente der Konzentrierung der Proben sowie dem Austausch des Lösungsmediums vom Elutionsmedium zu Ampuwa [Fresenius], um die Lagerungsbedingungen von den SIGLEC Fc-Fusionsproteinen zu optimieren. Zur Vorbereitung der Zentrifugalfiltration wurde der Zentrifugalfilter mit Ampuwa [Fresenius] gemäß den Herstellerangaben äquilibriert. Nach der Äquilibration wurde das aufgereinigte SIGLEC Fc-Fusionsprotein in das Reservoir des Zentrifugalfilters gegeben und bei 12.300 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Proben, die auf Grund eines zu großen Volums nicht in einem Schritt auf den Zentrifugalfilter geladen werden konnten, wurden fraktioniert auf den Zentrifugalfilter gegeben. Bei dem fraktionierten Beladen des Zentrifugalfilters wurde eine erneute Zentrifugation unter den oben genannten Spezifikationen durchgeführt. Das während der Zentrifugalfiltration anfallende Filtrat wurde verworfen. Nachdem die Probe vollständig filtriert worden war, wurde der Zentrifugalfilter dreimal mit Ampuwa [Fresenius] bei 12.300 rpm für 10 Minute gewaschen. Dieser Schritt diente der vollständigen Entfernung des Elutionsmediums der HPLC. Im letzten Schritt wurde der Zentrifugalfilter um 180° gedreht und in ein Eppendorf-Tube platziert. Die Zentrifugation erfolgte bei 3.000 rpm für 2 Minuten. Das bei der Zentrifugation entstandene Filtrat enthielt das nun in Ampuwa [Fresenius] gelöste und aufgereinigte SIGLEC Fc-Fusionsprotein und wurde bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.7 Konzentrationsbestimmung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen von den SIGLEC Fc-Fusionsproteinen wurde ein Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) mit dem Pierce™ BCA-Protein-Assay-Kit [Thermo-Fisher] durchgeführt. Zuerst wurde gemäß den Herstellerangaben eine Verdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin hergestellt, um eine Standardkurve zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen von Proben zu erzeugen. Parallel wurden die Proben der SIGLEC Fc-Fusionsproteine ebenfalls entsprechend der Herstellerangaben vorbereitet. Hierzu wurden die Proben für die Standardkurve sowie der SIGLEC Fc-Fusionsproteine in einem Verhältnis von 1:20 mit dem Arbeitsreagenz, das aus BCA-Reagenz A und BCA-Reagenz B im Verhältnis



50:1 bestand, in einem Eppendorf-Tube vermischt. Anschließend wurde das Eppendorf-Tube in einem Thermoblock [ThermoFisher] bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Eppendorf-Tubes unverzüglich auf Raumtemperatur abgekühlt, um weitere chemische Reaktionen zu unterbinden. Innerhalb von 5 Minuten wurde die Absorption jeder Probe mit dem Spektralphotometer NanoDrop 2000 [ThermoFisher] bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Zur Eichung des Spektralphotometers wurde Ampuwa [Fresenius] genutzt, weil das SIGLEC Fc-Fusionsprotein nach der Aufbereitung ebenfalls in Ampuwa [Fresenius] gelöst war. Zur Erzeugung der Standardkurve wurde die gemessene Absorption der Standardproben gegen die Konzentration in mg/ml aufgetragen. Danach konnten die gemessenen Absorptionswerte für die SIGLEC Fc-Fusionsproteine mittels der zuvor erstellten Standardkurve in eine Proteinkonzentration umgerechnet werden.

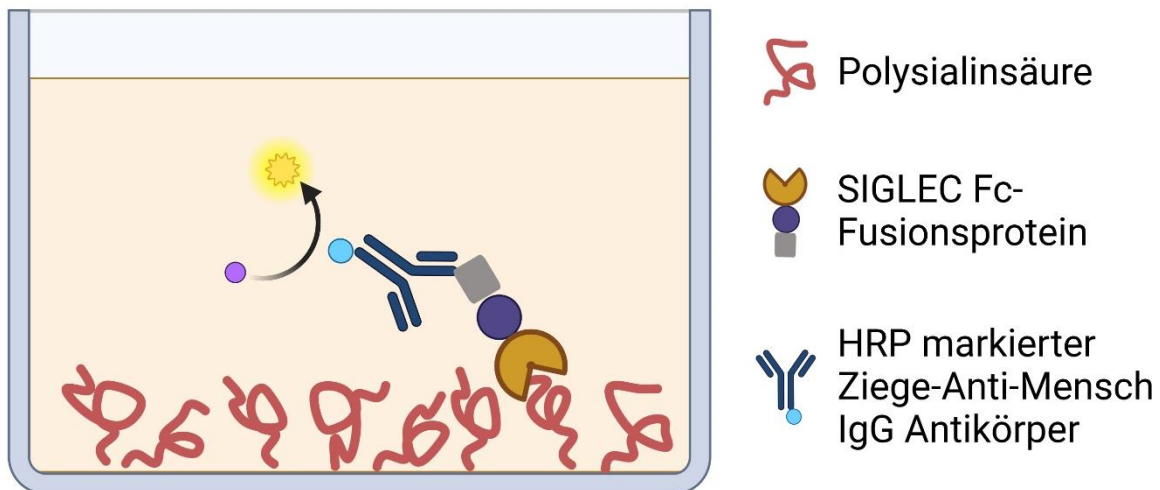
### 2.3 Messung der Bindungsspezifität von kurzkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11

Zur Untersuchung der Bindungsspezifität zwischen Polysialinsäure unterschiedlicher Polymerisierungsgrade und SIGLEC-11 wurde die in einem kompetitiven ELISA gemessene Bindungsstärke in Relation zu den Bindungsstärken von den SIGLEC Fc-Fusionsproteinen SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 gesetzt. Beim ELISA handelt es sich um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren von Proteinen, aber auch anderer niedermolekularer Verbindungen. Für den Nachweis dieser sogenannten Antigene werden sich die spezifischen Bindungseigenschaften von Antikörpern zunutze gemacht, wobei die Visualisierung der Bindung auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Als Polymerisierungsgrade wurden kurzkettige Polysialinsäure und langkettige Polysialinsäure untersucht. Bevor die Bindungsspezifität mit Hilfe des kompetitiven ELISA bestimmt werden konnte, wurde die Avidität mit einem Antigen-ELISA untersucht. Hiermit wurde überprüft, ob SIGLEC-3, SIGLEC-5, SIGLEC-10 und SIGLEC-11 auch an langkettige Polysialinsäure binden. Des Weiteren wurde durch den Antigen-ELISA die ideale Konzentration der SIGLEC Fc-Fusionsproteine für den kompetitiven ELISA ermittelt, um eine ausgewogene Signalintensität zu erreichen. Für die beiden ELISA wurde die Mikrotiterplatte Nunc MultiSorp flat-bottom [ThermoFisher] verwendet. Die

Auswertung erfolgte mittels des Multimode-Platten-Reader Infinite® 200 PRO [TECAN]. Für die statistische Auswertung wurde das Programm PRISM [GraphPad Software] verwendet.

### 2.3.1 Antigen-ELISA

Für einen Antigen-ELISA werden gewöhnlich zwei Antikörper benötigt die spezifisch an unterschiedliche Epitope des Antigens binden. Bei diesem Antigen-ELISA repräsentierte das SIGLEC Fc-Fusionsprotein das Antigen. Als erster Antikörper wurde langkettige Polysialinsäure verwendet, das an die Mikrotiterplatte gebunden wurde und damit die feste Phase repräsentiert. Die langkettige Polysialinsäure band an die V-Set Ig-Domäne des SIGLEC Fc-Fusionsprotein. Als zweiter Antikörper ist ein mit HRP markierter Ziege-Anti-Mensch IgG Antikörper [Dianova] verwendet worden, der nach Zugabe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substrat (TMB-Substrat) durch eine enzymatische Farbreaktion die Bindung von dem SIGLEC Fc-Fusionsprotein an langkettige Polysialinsäure anzeigte. Der schematische Aufbau des Antigen-ELISA ist in Abbildung 6 dargestellt.



**Abb. 6:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des Antigen-ELISAs zur Analyse der Avidität zwischen langkettiger Polysialinsäure und den SIGLEC Fc-Fusionsproteinen. Die Avidität wurde sowohl für SIGLEC-11 als auch für SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 bestimmt. (Erstellt mit BioRender.com)

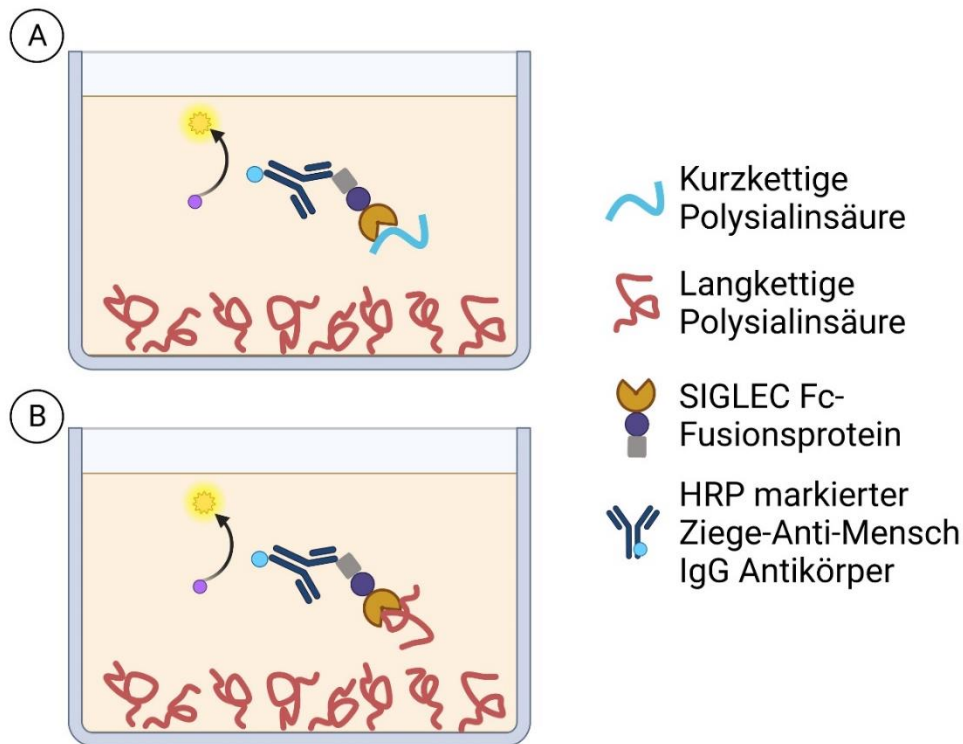
Im ersten Schritt wurden in die Mulde der Mikrotiterplatte 100 µl langkettige Polysialinsäure pipettiert. Die langkettige Polysialinsäure war in 75 % Ethanol mit einer Konzentration von 100 µg/ml gelöst. Im Anschluss erfolgte über Nacht eine Inkubation bei Raumtemperatur. Am nächsten Morgen wurde die Mikrotiterplatte mittels GIBCO™ Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS) [ThermoFisher] gewaschen. Hierfür wurde in die Mulde 200 µl GIBCO™ DPBS [ThermoFisher] hinzugegeben und die Mikrotiterplatte für 3 Minuten auf einem Schüttler [Edmund Buhler] platziert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Anschließend wurden 300 µl 0,5 % Fischgelatine [Sigma] zur Absättigung von freien Bindungsstellen hinzugegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Fischgelatine verworfen. Parallel dazu wurde der Antikörper HRP-konjugierte Ziege-Anti-Mensch IgG [Dianova] mit dem zu untersuchendem SIGLEC-Fc-Fusionsprotein, für das eine Verdünnungsreihe angesetzt worden war, in einem Verhältnis von 1:5.000 vermischt. Die hergestellten Lösungsansätze wurden lichtgeschützt abgedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100 µl des Lösungsansatzes in die Mulde der Mikrotiterplatte pipettiert. Es folgte eine Inkubation für weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur. Mit Ablauf der Inkubationszeit wurde die Lösung aus der Mikrotiterplatte entfernt und die Platte wie bereits beschrieben dreimal mit 200 µl GIBCO™ DPBS [ThermoFisher] gewaschen. Anschließend wurde mit Hilfe einer Mehrkanalpipette 100 µl TMB-Substrat [ThermoFisher] in die Mulde gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend in den Multimode-Platten-Reader Infinite® 200 PRO [TECAN] gelegt, wo eine weitere Inkubation über 15 Minuten erfolgt. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die erste Messung bei einer Wellenlänge von 650 nm. Zum Stoppen der Reaktion wurde anschließend mit Hilfe einer Mehrkanalpipette 100 µl Salzsäure [Carl Roth] in die Mulde gegeben und vorsichtig vermischt. Unmittelbar danach wurde die Mikrotiterplatte bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgelesen. Das Versuchsprotokoll zur Verwendung des Mikrotiterplattenlesers ist detailliert in Tabelle 12 dargestellt.

**Tab. 12:** Reaktionsansatz und Programmeinstellungen zum Auswerten des Antigen-ELISA mit Hilfe des Mikrotiterplattenleser Infinite F200 PRO [TECAN].

<b>Prozessschritt</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Inkubationsdauer</b>	<b>Wellenlänge</b>
Inkubation	100 µl TMB	15 min	---
1. Auslesung	---	---	650 nm
Reaktionsstopp	100 µl Salzsäure	So schnell wie möglich	---
2. Auslesung	---		450 nm

### 2.3.2 Kompetitiver ELISA

Beim kompetitiven ELISA wurde langkettige Polysialinsäure als Referenzantigen an die Mikrotiterplatte gebunden. Als Antigen wurden separate Ansätze von SIGLEC Fc-Fusionsproteinen mit langkettiger Polysialinsäure und mit kurzkettiger Polysialinsäure hergestellt. Diese Ansätze wurden auf die Mikrotiterplatte gegeben, sodass das Referenzantigen mit dem Antigen, um die Bindungsstelle in der V-Set Ig-Domäne des SIGLEC Fc-Fusionsprotein konkurrierte. Die Bindung des SIGLEC Fc-Fusionsprotein an das Referenzantigen wurde durch die enzymatische Farbreaktion eines mit HRP markierten Ziege-Anti-Mensch IgG Antikörper [Dianova] angezeigt. Der experimentelle Aufbau ist schematisch in Abbildung 7 visualisiert.



**Abb. 7:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des kompetitiven ELISAs zur Analyse der Bindungsstärke zwischen kurzketziger Polysialinsäure und den SIGLEC Fc-Fusionsproteinen (A). Ebenfalls wurde die Bindungsstärke zwischen langkettiger Polysialinsäure und dem SIGLEC Fc-Fusionsprotein untersucht (B). Die Bindungsstärke wurde sowohl für SIGLEC-11 als auch für SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 bestimmt. Mit den gemessenen Bindungsstärken wurde die Bindungsspezifität zwischen kurzketziger Polysialinsäure und SIGLEC-11 sowie zwischen langkettiger Polysialinsäure und SIGLEC-11 bestimmt. (Erstellt mit BioRender.com)

Als Erstes wurde 100 µl langkettiger Polysialinsäure mit einer Konzentration von 100 µg/ml, das in 75 % Ethanol gelöst war, in die Mulde der Mikrotiterplatte gegeben und über Nacht inkubiert. Parallel dazu wurden Verdünnungsreihen von kurzketziger Polysialinsäure sowie langkettiger Polysialinsäure in 1,5 ml Eppendorf-Tube angesetzt. Zu der Verdünnungsreihe wurde der mit HRP markierte Ziege-Anti-Mensch IgG Antikörper [Dianova] in einem Verhältnis von 1:5.000 und das jeweilige SIGLEC Fc-Fusionsprotein hinzugegeben. Für die SIGLEC Fc-Fusionsproteine wurde die Konzentration ausgewählt, die im Antigen-ELISA eine ausgewogene Signalintensität gezeigt hatte. Für SIGLEC-3 lag die Konzentration bei 30 µg/ml und

für SIGLEC-5, SIGLEC-10 sowie SIGLEC-11 bei 3 µg/ml. Dieser Reaktionsansatz wurde lichtgeschützt über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Mulden der Mikrotiterplatte mit 200 µl GIBCO™ DPBS [ThermoFisher] gewaschen. Hierfür wurde die Mikrotiterplatte für 3 Minuten auf einen Schüttler [Edmund Buhler] platziert. Dieser Waschvorgänge wurde insgesamt dreimal wiederholt. Im Anschluss wurde 300 µl 0,5 % Fischgelatine [Sigma] hinzugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um die freien Bindungsstellen der Mikrotiterplatte abzusättigen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte erneut dreimal mit 200 µl GIBCO™ DPBS [ThermoFisher] gewaschen. Parallel dazu wurde der Reaktionsansatz der Proben für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden 100 µl des Lösungsansatzes in die jeweilige Mulde pipettiert. Es folgte eine Inkubation für weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler [Edmund Buhler]. Danach wurde Mikrotiterplatte wie bereits beschrieben mit 200 µl GIBCO™ DPBS [ThermoFisher] insgesamt dreimal gewaschen. Die Auswertung des kompetitiven ELISA mittels des Multimode-Platten-Reader Infinite® 200 PRO [TECAN] erfolgte zur Auswertung des Antigen-ELISA gemäß den Herstellerangaben. Zuerst werden 100 µl TMB-Substrat [ThermoFisher] in die Mulde gegeben und die Mikrotiterplatte anschließend in den Multimode-Platten-Reader Infinite® 200 PRO [TECAN] gelegt. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit erfolgte die erste Messung bei einer Wellenlänge von 650 nm. Danach wurde zum Stopp der enzymatischen Farbreaktion 100 µl Salzsäure [Carl Roth] hinzugegeben. Unmittelbar danach wurde die Mikrotiterplatte mit einer Wellenlänge von 450 nm ausgelesen. Die Programmspezifikationen für den Mikrotiterplattenleser sind detailliert in Tabelle 13 dargestellt.

**Tab. 13:** Reaktionsansatz und Programmeinstellungen zum Auswerten des kompetitiven ELISA mit Hilfe des Mikrotiterplattenleser Infinite F200 PRO [TECAN].

<b>Prozessschritt</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Inkubationsdauer</b>	<b>Wellenlänge</b>
Inkubation	100 µl TMB	15 min	---
1. Auslesung	---	---	650 nm
Reaktionsstopp	100 µl Salzsäure	So schnell wie möglich	---
2. Auslesung	---		450 nm

### 2.3.3 Auswertung der ELISA

Die statistische und graphische Auswertung der Ergebnisse sowohl vom Antigen-ELISA als auch vom kompetitiven ELISA erfolgten mittels der Software PRISM [GraphPad Software]. Für die Auswertung des Antigen-ELISA wurde zusätzlich die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) berechnet. Beim kompetitiven ELISA wurde noch die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) sowie der logarithmischer Wert der mittleren inhibitorischen Konzentration ( $pIC_{50}$ ) bestimmt.

### 2.4 Herstellung von Polysialinsäure unterschiedlicher Polymerisierungsgrade

Sowohl die langkettige Polysialinsäure als auch die kurzkettige Polysialinsäure zur Untersuchung der Bindungsspezifität zu den SIGLEC Fc-Fusionsproteinen wurde freundlicherweise von Dr. Winkler aus der eigenen Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Der Herstellungsprozess wurde bereits von der Arbeitsgruppe publiziert (Vries et al., 2017). Die Fragmentierung der Polysialinsäure und die anschließende Auftrennung nach der Größe erfolgten ebenfalls in unserem Labor durch Dr. Winkler. Dieser Aufbereitungsprozess ist ebenfalls bereits durch die Arbeitsgruppe publiziert worden (Shahraz et al., 2022). Die Lagerung der Polysialinsäure unterschiedlicher Polymerisierungsgrade erfolgte bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.5 Materialien

#### 2.5.1 Medium

##### LB-Medium

Zweifach destilliertes $H_2O$	1 L
LB Broth (Miller) [Sigma]	25 g

Abschließende Sterilisation im Autoklav für 15 Minuten bei  $121^{\circ}\text{C}$

## LB-Agar mit Zeocin

Zweifach destilliertes H <sub>2</sub> O	1 L
LB Broth (Lennox) [Sigma]	25 g
zeocin (1:1.000 Verdünnung) [Invitrogen]	500 µl

Sterilisation im Autoklav für 15 Minuten bei 121°C; Anschließend abkühlen lassen bei Raumtemperatur und auf die Agarplatten geben; Lagerung bei 4°C

## Running-Buffer Western Blot

NuPage® MES SDS Running Buffer [Invitrogen]	25 ml
Deionisiertes H <sub>2</sub> O [Sigma]	475 ml

## Transfer Buffer Western Blot

NuPage® Transfer Buffer [Invitrogen]	25 ml
Methanol [Roth]	80 ml
Deionisiertes H <sub>2</sub> O [Sigma]	560 ml

## MEF-Medium mit 10% fetalem Kalb Serum (FCS)

DMEM® mit L-Glutamin, mit D-Glucose, ohne Na-Pyruvat [ThermoFisher]	450 ml
L-Glutamin [ThermoFisher]	5 ml
Nicht-essenzielle Aminosäuren [ThermoFisher]	5 ml
Na-Pyruvat [ThermoFisher]	5 ml
10% fetales Kalbs Serum [ThermoFisher]	50 ml



0,5% Fischgelatine

10% Fischgelatine [Sigma]	2,5 ml
DPBS [ThermoFisher]	47,5 ml

1 % Agarosegel

UltraPure™ Agarose [Invitrogen]	0,7 g
TRIS-Acetat-EDTA-Puffer	70 ml
Deionisiertes Wasser [SIGMA]	70 ml
Ethidiumbromid	6 µl

Nach aufwärmen des Ansatzes in der Mikrowelle wird das Ethidiumbromid hinzugegeben; Anschließend wird der Ansatz in die gewünschte Form gegeben und bei Raumtemperatur für 30 Minuten abkühlen gelassen

MEF-Medium mit niedrigem IgG-Anteil

DMEM® mit L-Glutamin, mit D-Glucose, ohne Na-Pyruvat [ThermoFisher]	450 ml
L-Glutamine [ThermoFisher]	5 ml
Nicht-essenzielle Aminosäuren [ThermoFisher]	5 ml
Na-Pyruvate [ThermoFisher]	5 ml

2.5.2 Primer, Antikörper, Enzyme und Zellkultur

293fectin™ Transfektionsreagenz	ThermoFisher
<i>Bgl</i> I	ThermoFisher
Biotin-SP AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcγ fragment specific	Jackson

<i>EcoRI</i>	ThermoFisher
FreeStyle™ 293 Expressionssystem	ThermoFisher
Freestyle™ 293-F Zellen	ThermoFisher
GIBCO® FreeStyle™ 293 Expressionsmedium	ThermoFisher
Heracell™ Inkubator	ThermoFisher
HRP-konjugiert Ziege-Anti-Mensch IgG	Dianova
Humaner IgG	Sigma-Alderich
Individuell angepasste Primer	ThermoFisher
One Shot® TOP10 chemisch kompetente E. coli	ThermoFisher
Opti-MEM® I	ThermoFisher
pFuse-hlgG1-Fc1-Vektor	InvivoGen
Streptavidin, HRP	Merck
T4-DNA-Ligase	ThermoFisher
 2.5.3 Chemikalien und Reagenzien	
10% fetales Kalbs Serum	ThermoFisher
10% Fischgelatine	Sigma
TMB-Substrat	ThermoFisher
AccuPrime™	Invitrogen
Ampuwa	Fresenius
Deionisiertes Wasser	Sigma
DMEM® mit L-Glutamin, mit D-Glucose, ohne Na-Pyruvat	ThermoFisher

Glycin	Sigma
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail	ThermoFisher
LB Broth (Lennox)	Sigma
LB Broth (Miller)	Sigma
L-Glutamin	ThermoFisher
Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
Na-Pyruvat	ThermoFisher
Nicht-essenzielle Aminosäuren	ThermoFisher
NuPage® Bis-Tris Gel 10%	Invitrogen
NuPage® MES SDS Running Buffer (20x konzentriert)	Invitrogen
NuPage® Probenbuffer (4x konzentriert)	Invitrogen
NuPage® Transfer Buffer (20x konzentriert)	Invitrogen
PageRuler™ Plus vorgefärbte Proteinleiter	ThermoFisher
PBS	ThermoFisher
RIPA-Puffer	Sigma
Salzsäure	Carl Roth
Stains All	Sigma
SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent	ThermoFisher
Zeocin	Invitrogen

## 2.5.4 Software

Geneious	Biomatters
Image Lab™	BioRadiations
PRISM	GraphPad Software

## 2.5.5 Weiteres

18%igen Tris-Glycin-Polyacrylamidgel	Life Technologies
Amicon® Ultra 0,5 ml Zentrifugalfilter	Merck
ChemiDoc	BioRadiations
CO <sub>2</sub> -resistenter Schüttler	ThermoFisher
Corning® 15 ml Zentrifugenröhrchen	Merck
Corning® Spritzenfilters mit einer 0,45 µm Porenmembran	Merck
Dark Reader Transilluminators	Clare Chemical Research
DNA-Gel-Ladefarbstoff (6x konzentriert)	ThermoFisher
DPBS	ThermoFisher
Erlenmeyerkolben	VWR
Heraeus™-Zentrifuge	ThermoFisher
HiTrap Protein A 1ml column	GE-Healthcare
HiTrap Protein A 5ml column	GE-Healthcare
Infinite® 200 PRO	TECAN
Mikrotiterplatte Nunc MultiSorp flat-bottom	ThermoFisher

Nalgene™ Einweg-PETG-Erlenmeyerkolben mit Schikaneboden	ThermoFisher
NanoDrop 2000	ThermoFisher
Nitrozellulosemembran 0,45 µm	ThermoScientific
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
NucleoBond™ Xtra Maxi Kits	Macherey-Nagel
Pierce™ BCA-Protein-Assay-Kit	ThermoFisher
Pufferkern mit Elektroden für XCell	Invitrogen
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Rotationssammler FH-930	GE Healthcare
Rotator für Probenröhrchen	VWR
Sicherheitswerkbank	ThermoFisher
Thermoblock	ThermoFisher
T3-Thermocycler	Biometra
UltraPure™ Agarose	Invitrogen
XCell II™ Blot Modul	Invitrogen
XCell SureLock™ Mini-Zelle	Invitrogen

### 3. Ergebnisse

Zur Bestimmung der Bindungsspezifität von Polysialinsäure zu SIGLEC-11 wurde die Bindungsstärke von SIGLEC-11 in Relation zu den Bindungsstärken der Rezeptoren SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 gesetzt. Dabei wurde die Bindungsstärke sowohl von kurzkettiger Polysialinsäure als auch langkettiger Polysialinsäure mittels ELISA untersucht. Zur Messung der Bindungsstärke wurden SIGLEC Fc-Fusionsproteine, die durch HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] synthetisiert wurden, verwendet. Zur Proteinbiosynthese wurden die HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] mit eigens für diese Dissertation klonierte SIGLEC Fc-Fusionsplasmide transfiziert. Die Qualitätskontrolle der klonierten SIGLEC Fc-Fusionsplasmide erfolgte durch einen zweistufigen Prozess, bei dem eine erfolgreiche Ligation durch einen Doppelverdau nachgewiesen und Mutationen durch eine direkte Sequenzierung ausgeschlossen wurden. Die Proteinbiosynthese der HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] und die anschließende Sezernierung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine in den Zellkulturüberstand wurde durch einen Western Blot verifiziert. Die abschließende Aufreinigung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine aus dem Überstand erfolgte mittels HPLC.

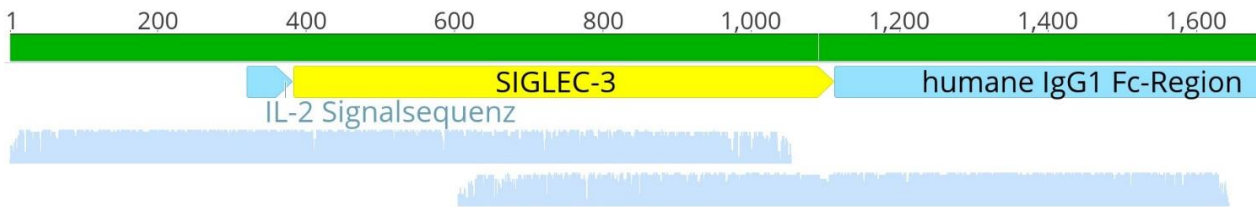
#### 3.1 Klonierung der SIGLEC Fc-Fusionsplasmide

Das SIGLEC Fc-Fusionsplasmid bestand aus dem pFuse-hIgG1-Fc2-Vektor und dem SIGLEC-Insert, das sich aus der V-Set Ig-Domäne sowie aus der ersten C2-Set Ig-Domäne des jeweiligen SIGLEC zusammensetzt. Für die Ligation wurden die Restriktionsschnittstellen *EcoRI*, das sich am Ende der IL-2 Signalsequenz befindet, und *BglII*, das sich innerhalb des Polylinkers befindet, ausgewählt. Um während der Klonierung innerhalb des SIGLEC Fc-Fusionsplasmids entstandene Mutationen auszuschließen, wurden die SIGLEC Fc-Fusionsplasmide einem zweistufigen Überprüfungsprozess unterzogen. Der erste Schritt diente der Überprüfung einer erfolgreichen Ligation mittels Gelelektrophorese. Hierzu wurde ein Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BglII* durchgeführt. Der pFuse-hIgG1-Fc2 Vektor zeigte eine Basenpaarlänge von 4172 bp.

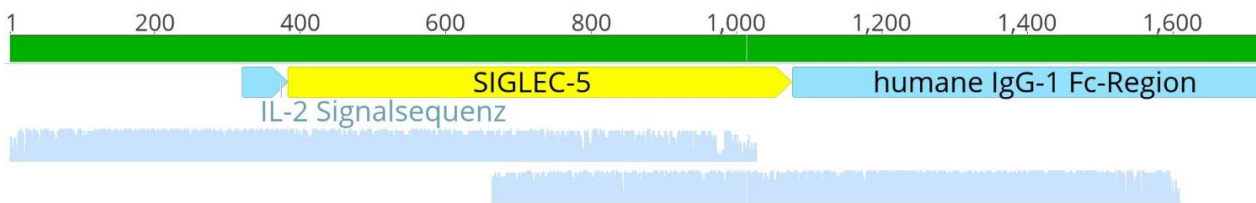
Die Basenpaarlängen des Inserts betrug für SIGLEC-3 748 bp, für SIGLEC-5 697 bp, für SIGLEC-10 685 bp und für SIGLEC-11 768 bp.

Zum Ausschluss von Punktmutationen erfolgte im zweiten Schritt eine DNA-Sequenzierung von den SIGLEC Fc-Fusionsplasmiden, die beim vorher durchgeführten Doppelverdau eine erfolgreiche Ligation gezeigt hatten. Das Alignment der DNA-Sequenzen wurde mit Hilfe der Software geneious [biomatters] durchgeführt und ausgewertet. Die genetischen Informationen für den pFuse-hlgG1-Fc2-Vektor wurden durch den Hersteller zur Verfügung gestellt. Die DNA-Sequenzen der SIGLEC wurden der Datenbank des National Center for Biotechnology Information über die Software geneious [biomatters] entnommen. Für die SIGLEC Fc-Fusionsplasmide von SIGLEC-3, SIGLE-5, SIGLEC-10 und SIGLEC-11 konnte eine vollständige Übereinstimmung in der DNA-Sequenz festgestellt werden. Die Alignments für die klonierten SIGLEC Fc-Fusionsplasmide von SIGLEC-3 (A), SIGLEC-5 (B), SIGLEC-10 (C) und SIGLEC-11 (D) sind in Abbildung 8 abgebildet. Zusammenfassend konnte durch den zweistufigen Kontrollprozess, der sich aus einem Doppelverdau mit *EcoRI* und *BglII* sowie eine direkte DNA-Sequenzierung zusammensetzte, Mutationen bei den SIGLEC Fc-Fusionsplasmiden ausgeschlossen werden.

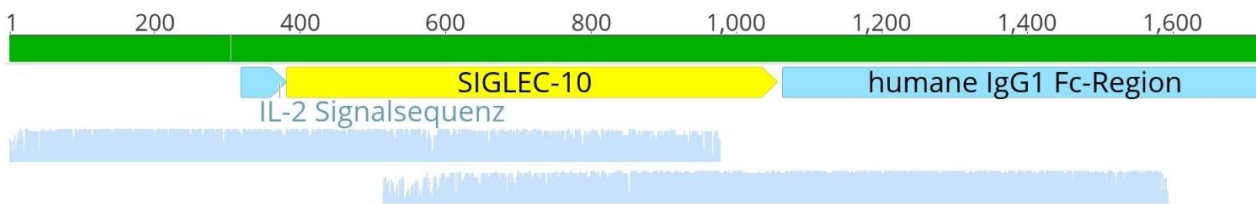
(A) SIGLEC-3 Fc-Fusionsplasmid



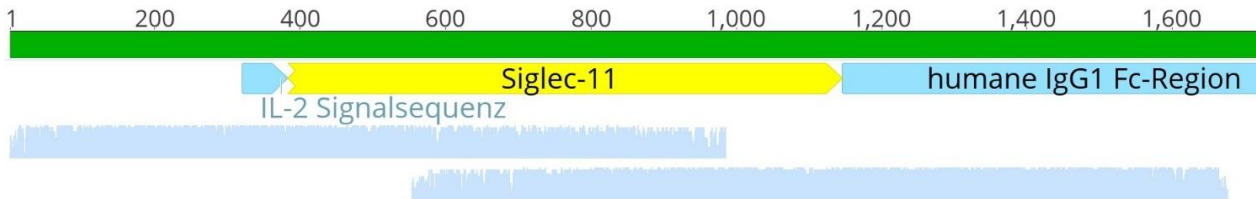
(B) SIGLEC-5 Fc-Fusionsplasmid



(C) SIGLEC-10 Fc-Fusionsplasmid



(D) SIGLEC-11 Fc-Fusionsplasmid



**Abb. 8:** Ergebnisse des Alignments für die klonierten SIGLEC Fc-Fusionsplasmide von SIGLEC-3 (A), SIGLEC-5 (B), SIGLEC-10 (C) und SIGLEC-11 (D). Das Alignment wurde mit Hilfe der Software geneious [Biomatters] durchgeführt. Die DNA-Sequenz der jeweiligen SIGLEC wurde der Datenbank des National Center for Biotechnology Information entnommen. Die genetischen Informationen für den pFuse-hIgG1-Fc2 Vektor wurden durch den Hersteller bereitgestellt.



### 3.2 Proteinbiosynthese der SIGLEC Fc-Fusionsproteine

Für die Proteinbiosynthese von den SIGLEC Fc-Fusionsproteinen wurde das Free-Style™ 293 Expressionssystem verwendet. Dieses Expressionssystem wurde speziell für die Synthese von hohen Proteinmengen entwickelt. Zur Proteinbiosynthese der SIGLEC Fc-Fusionsproteine wurden die HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] mit den jeweiligen SIGLEC Fc-Fusionsplasmiden transfiziert und anschließend in Nalgene Einweg-PETG-Erlenmeyerkolben mit Schikaneboden inkubiert. Das IL2-Signalpeptid des pFuse-hIgG1-Fc1-Vektors bedingte die Sekretion der SIGLEC Fc-Fusionsproteine in den Zellkulturüberstand.

#### 3.2.1 Verifizierung der Proteinbiosynthese der SIGLEC Fc-Fusionsproteine

Zunächst wurde gezeigt, dass die mit den SIGLEC Fc-Fusionsplasmiden transfizierten HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] in der Lage sind, die SIGLEC Fc-Fusionsproteine zu synthetisieren. Um die Synthesefähigkeit der HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] nachzuweisen, wurde ein Western Blot mit Zelllysate von transfizierten HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] durchgeführt. Die Durchführung des Western Blot erfolgte entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 2.2.4. Als Negativkontrolle wurde Zelllysate von nicht transfizierten HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] verwendet. Hier zeigte sich keine Bande im Western Blot. Als Positivkontrolle wurde humanes IgG [Sigma-Aldrich] genommen, für das eine Bande bei einem Molekulargewicht von ~140 kDa detektierbar war. In den Zelllysaten von den transfizierten HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] zeigte sich ebenfalls eine Bande. Für das SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein war im Western Blot ein Molekulargewicht von ~120 kDa abzulesen. Im Vergleich dazu betrug das mit der Software geneious [biomatters] berechnete Molekulargewicht 55,67 kDa. Für das SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein war ein Molekulargewicht von ~130 kDa, für das SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein von ~120 kDa und für das SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein von ~110 kDa im Western Blot abzulesen. Auch bei diesen SIGLEC Fc-Fusionsproteinen unterschied sich das im Western Blot abgelesene Molekulargewicht vom berechneten Molekulargewicht. Das mit der Software geneious [biomatters] berechnete Molekulargewicht betrug für das SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein 54,75 kDa, für das SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein

53,43 kDa und für das SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein 52,71 kDa. Die gemessenen und berechneten Molekulargewichte sind nochmals in Tabelle 14 aufgeführt.

**Tab. 14:** Darstellung der Molekulargewichte der jeweiligen SIGLEC Fc-Fusionsproteine, die zum einem durch die Software geneious [biomatters] kalkuliert und zum anderen vom Western Blot abgelesen wurden.

<b>SIGLEC Fc-Fusionsprotein</b>	<b>Molekulargewicht gemäß der Software geneious</b>	<b>Molekulargewicht gemäß Western Blot (Zelllysate)</b>	<b>Molekulargewicht gemäß Western Blot (Überstand)</b>
SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein	54,75 kDa	~130 kDa	~130 kDa
SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein	53,43 kDa	~120 kDa	~120 kDa
SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein	52,71 kDa	~110 kDa	~110 kDa
SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein	55,67 kDa	~120 kDa	~120 kDa

### 3.2.2 Verifizierung der Sekretion der SIGLEC Fc-Fusionsproteine

Nach der Verifizierung der Proteinbiosynthese von den SIGLEC Fc-Fusionsproteinen durch HEK 293-F Zellen, wurde die Sekretion der SIGLEC Fc-Fusionsproteine in den Überstand der Zellkultur überprüft. Hierfür wurde ein Western Blot mit dem Überstand von transfizierten HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] durchgeführt. Die Sezernierung in den Zellkulturüberstand erfolgte auf Grund des IL2-Signalpeptids, das Bestandteil des pFuse-hIgG1-Fc1 Vektors ist. Der Überstand von nicht transfizierten HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] wurde wieder als Negativkontrolle verwendet und zeigte keine Bande im Western Blot. Als Positivkontrolle wurde erneut humanes IgG [Sigma-Aldrich] verwendet. Bei der Positivkontrolle war auch eine Bande bei einem Molekulargewicht von ~140 kDa detektierbar. In den Überständen von den transfizierten HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] konnte ebenfalls eine Bande, die durch die Detektion SIGLEC Fc-Fusionsproteine entstanden, nachgewiesen werden. Das Molekulargewicht für das SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein lag bei ~120 kDa. Im Vergleich dazu lag das Molekulargewicht für das SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein bei ~130 kDa, für das SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein bei ~120 kDa und für das SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein bei ~110 kDa. Damit war das Molekulargewicht der in den Überstand sezernierten SIGLEC Fc-Fusionsproteine vergleichbar mit dem Molekulargewicht der SIGLEC Fc-Fusionsproteine im Zelllysate.

Dementsprechend waren die Molekulargewichte der SIGLEC Fc-Fusionsproteine, die sich im Überstand befanden, ebenfalls höher als die mit der Software geneious [Biomatters] kalkulierten Molekulargewichte. Die im Western Blot abgelesenen Molekulargewichte für die in den Zellkulturüberstand sezernierten SIGLEC Fc-Fusionsproteine sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

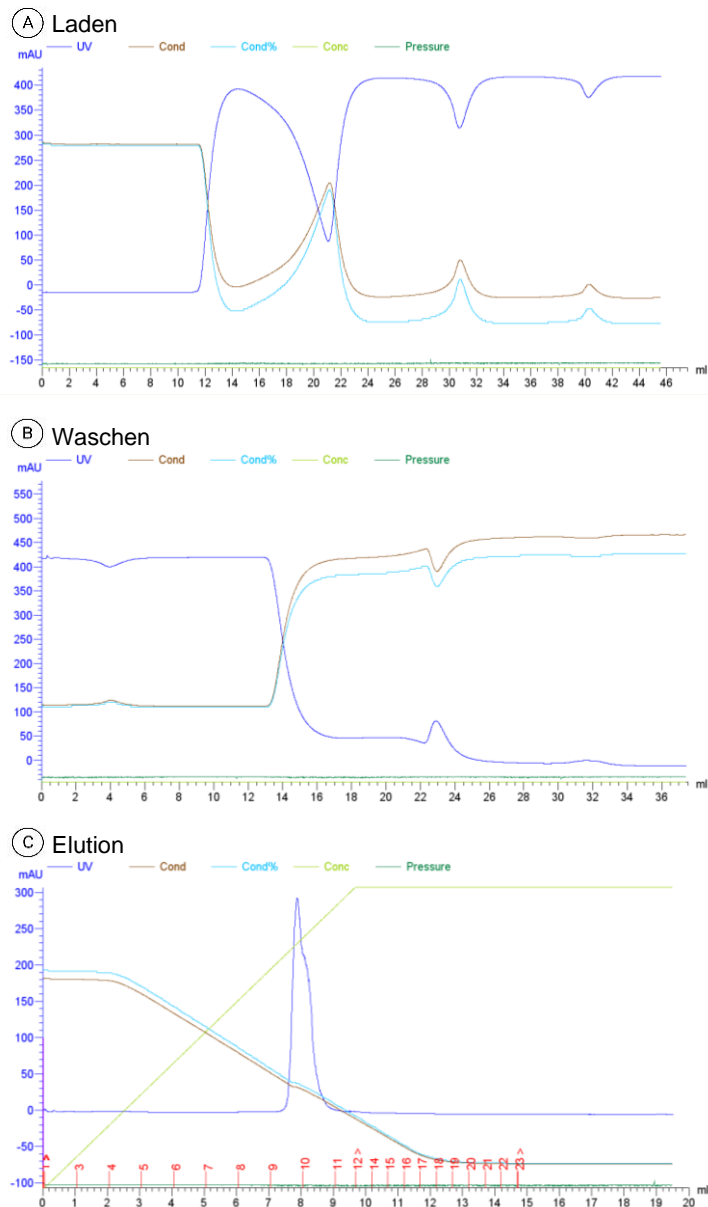
### 3.3 Aufreinigung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine aus dem Zellkulturüberstand

Die Aufreinigung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine aus dem Überstand erfolgte durch eine HPLC. Dieser Prozess der Aufreinigung kann in die vier Schritte Äquilibrierung, Laden, Waschen und Elution unterteilt werden.

#### 3.3.1 Aufreinigung des SIGLEC-11 Fc-Fusionsproteins

Die Gesamtzeit zur Aufarbeitung des SIGLEC Fc-Fusionsprotein mittels HPLC war abhängig vom Volumen des aufzureinigenden Zellüberstands. Damit war von den einzelnen Prozessen die Applizierung des Überstands auf die Protein A Säule der zeitbestimmende Schritt. Hingegen waren die Dauer für die Äquilibrierung, das Waschen und die Elution bei definierter Flussrate und Größe der Säule konstant. Die Durchführung der HPLC erfolgte gemäß den Angaben in Abschnitt 2.2.5. Während des gesamten Prozesses der Aufreinigung wurde der Durchfluss von der HiTrap Protein A Säule [GE Healthcare] kontinuierlich mit einem photometrischen UV-Detektor [Pharmacia Biotech] bei einer Wellenlänge von 205/280 nm auf das Vorhandensein von Proteinen kontrolliert. Die gemessene UV-Extinktion wurde durch die Software Unicorn 1.0 [Bioprocess] digital erfasst und in einem Graphen gegen das Volumen in ml aufgetragen. Abbildung 9 zeigt die gemessene UV-Extinktion während der Aufreinigung des SIGLEC-11 Fc-Fusionsproteins für die Schritte Laden (A), Waschen (B) und Elution (C). Auf die Abbildung der Äquilibrierung, die mit PBS (pH 7) [Roth] durchgeführt wurde, ist zugunsten einer übersichtlicheren Darstellung in dieser Dissertation verzichtet worden. Während der Äquilibrierung wurde keine UV-Absorption gemessen, weil es sich bei PBS um eine proteinfreie Salzlösung handelte. Nach diesem Schritt wurde der Überstand der HEK 293-F

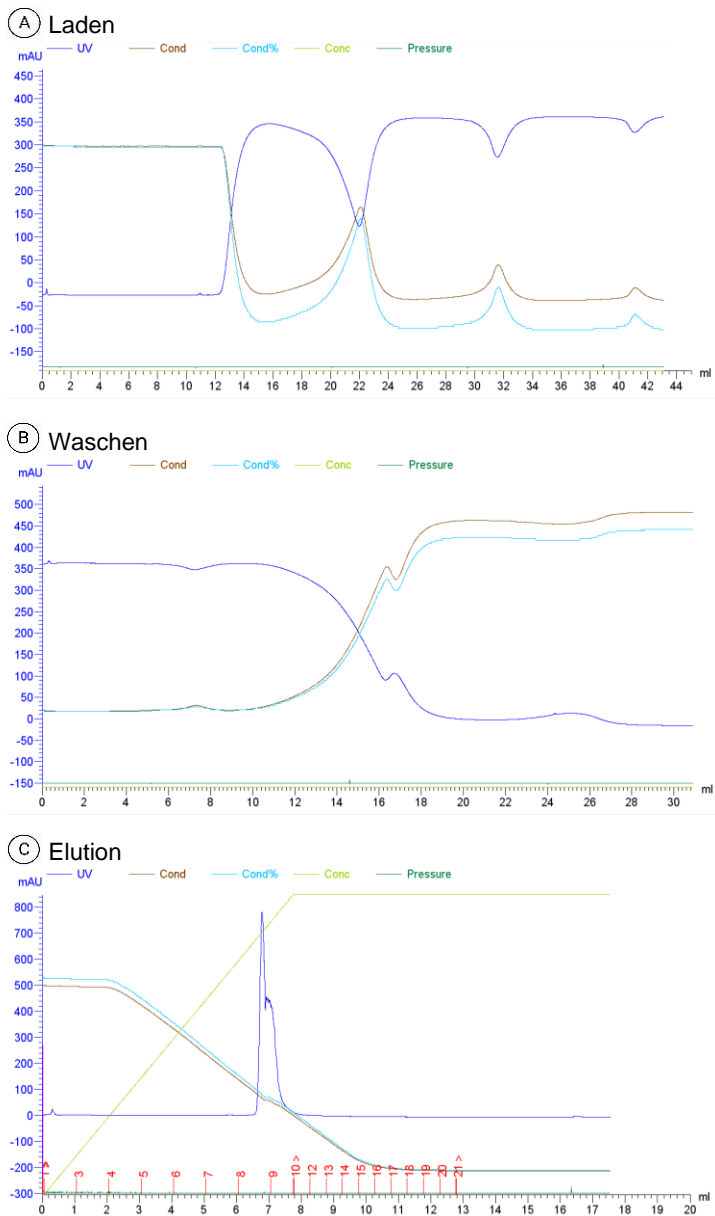
Zellkultur auf die Protein A Säule appliziert (Abbildung 9 (A)). Der Überstand stammte von transfizierten HEK 293 F-Zellen und wurde entsprechend des Abschnitts 2.2.3 aufbereitet und gelagert. Nach einem Beladungsvolumen von 10 ml Zellüberstand kam es zum Anstieg der UV-Extinktion im Durchfluss. Der Anstieg der UV-Absorption spiegelte das Vorhandensein von Proteinen im Durchfluss wider, die keine nicht-kovalente Bindung mit dem Protein A der Säulenmatrix eingegangen waren. Es kam zu einem verzögerten Anstieg der UV-Absorption, da sowohl das Röhrensystem als auch das Pumpensystem der HPLC zunächst mit dem Zellüberstand befüllt werden mussten. Im weiteren Verlauf bildete sich ein Plateau bei ungefähr 400 mAU. Insgesamt wurden 45 ml Zellüberstand auf die Protein A Säule geladen. Während des Waschschrattes (Abbildung 9 (B)) fiel die gemessene UV-Extinktion wieder ab und erreichte nach 35 ml ein konstantes Niveau im Bereich der Nulllinie. Mit Erreichen der Nulllinie waren nicht gebundene Proteine aus der Protein A Säule herausgewaschen, sodass sich nur noch das an die Protein A Matrix gebundene SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein in der Säule befand. Die nicht-kovalente Bindung zwischen dem Protein A und dem SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein wurde während der Elution aufgelöst (Abbildung 9 (C)). Als Elutionsmedium wurde ein linearer Gradient mit Glycin (pH 3) [Roth] und PBS (pH 7) [ThermoFisher] verwendet. Bei einem prozentualen Anteil von ungefähr 65 % Glycin wurde die nicht-kovalente Bindung gelöst, sodass das SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein aus der Protein A Säule gewaschen wurde. Zu diesem Zeitpunkt wurde im Durchfluss ein schneller Anstieg der UV-Extinktion detektiert und das SIGLEC Fc-Fusionsprotein eluierte mit einem Doppelpeak. Anschließend fiel die UV-Absorption wieder auf die Nulllinie zurück. Der Abfall auf die Nulllinie bedeutete, dass das SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein vollständig aus der Protein A Säule ausgewaschen worden war. Die maximale UV-Extinktion für das SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein betrug 290 mAU. Dabei korreliert die Höhe der UV-Absorption mit der Proteinkonzentration im Durchfluss.



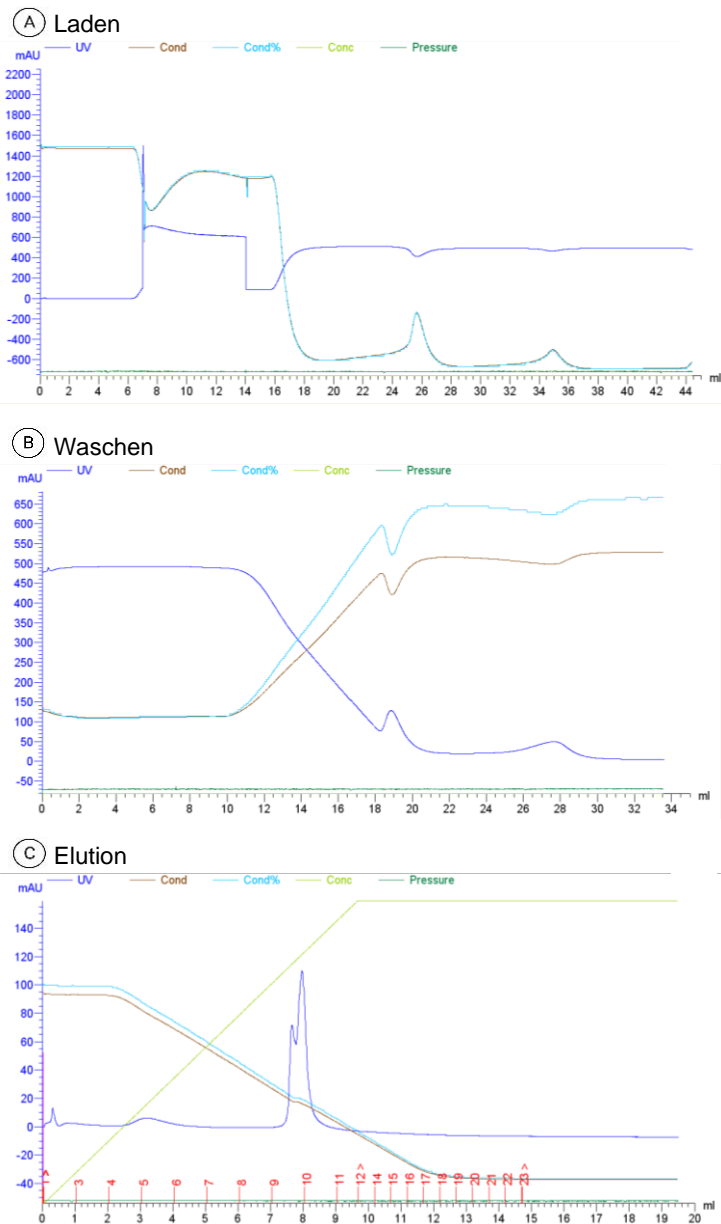
**Abb. 9:** Zeitlicher Verlauf der gemessenen UV-Extinktion bei einer Wellenlänge von 205/280 nm für das Laden (A), Waschen (B) und die Elution (C) während der Aufreinigung vom SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein aus dem Zellkulturüberstand mittels HPLC. Das applizierte Volumen in ml ist auf der x-Achse und die durch das UV-Detektionssystem gemessene Absorption in mAU auf der y-Achse aufgetragen. Die hellgrüne Linie während der Elution (C) zeigt den linearen Gradienten des Elutionsmediums Glycin [Sigma]. Des Weiteren sind noch die Leitfähigkeit, die prozentuale Veränderung der Leitfähigkeit sowie der Druck innerhalb des Pumpensystems der HPLC gegen das applizierte Volumen dargestellt. UV = gemessene UV-Absorption in mAU, Cond = Leitfähigkeit [mS/cm], Cond % = Veränderung der Leitfähigkeit ausgehend von der Nulllinie [%]; Conc = Prozentualer Anteil von Glycin während der Elution [%]; Pressure = Druck im Pumpensystem [MPa]

### 3.3.2 Aufreinigung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine von SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10

Die SIGLEC Fc-Fusionsproteine von SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 wurden ebenfalls mittels HPLC aus dem Zellkulturüberstand von transfizierten HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] aufgereinigt. Die Durchführung der HPLC erfolgte wie für das SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein entsprechend den Angaben in Abschnitt 2.2.5 Das Monitoring der Aufreinigung erfolgte ebenfalls mit Hilfe der Software Unicorn 1.0 [Bioprocess]. Der Graph für das SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein ist in Abbildung 10, für das SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein in Abbildung 11 und für das SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein in Abbildung 12 dargestellt. Wie beim SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein wurde zur besseren Übersichtlichkeit auf die Darstellung der Äquilibrierung verzichtet. Für die SIGLEC Fc-Fusionsproteine lagen die während der Äquilibrierung gemessenen UV-Absorptionswerte um die Nulllinie. Während des Ladens des Zellüberstands auf die Protein A Säule kam es wie beim SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein zum Anstieg der UV-Extinktion nach der Applikation von 10 ml Zellüberstand. Die maximale UV-Extinktion während der Applikation betrug 380 mAU für das SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein (Abbildung 10 (A)), 770 mAU für SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein (Abbildung 11 (A)) und 550 mAU für SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein (Abbildung 12 (A)). Am Ende des sich anschließenden Waschschriffs fiel die UV-Extinktion für die SIGLEC Fc-Fusionsproteine SIGLEC-3 (Abbildung 10 (B)), SIGLEC-5 (Abbildung 11 (B)) und SIGLEC-10 (Abbildung 12 (B)) auf die Nulllinie zurück. Für die Elution wurde ebenfalls ein linearer Gradient mit Glycin (pH 3) [Roth] als Elutionsmedium genutzt. Die nicht-kovalente Bindung zwischen den SIGLEC Fc-Fusionsproteinen und der Protein A Matrix löste sich auch beim prozentualen Anteil von 65 % Glycin. Die maximale UV-Absorption während der Elution unterschied sich jedoch im Vergleich zum SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein. Für das SIGLEC-3 Fc-Fusionsproteins lag das Maximum der gemessenen UV-Extinktion bei 800 mAU (Abbildung 10 (C)) und war damit höher als beim SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein. Die maximale UV-Absorption war für das SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein mit 180 mAU (Abbildung 11 (C)) und für das SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein mit 40 mAU (Abbildung 12 (C)) niedriger als beim SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein. Auch diese SIGLEC Fc-Fusionsproteine eluierten mit einem Doppelpeak. Die präzise Erfassung dieses Doppelpeaks ist für einen hohen Reinheitsgrad und minimale Verluste von Bedeutung.

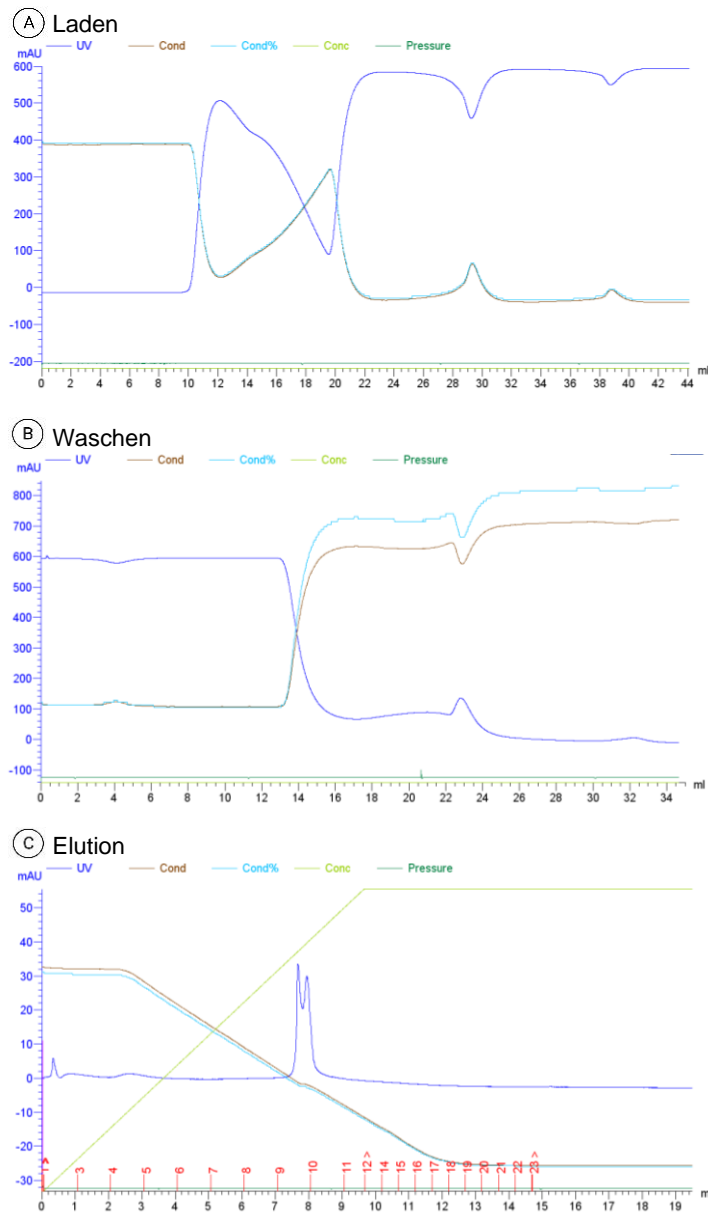


**Abb. 10:** Zeitlicher Verlauf der gemessenen UV-Extinktion bei einer Wellenlänge von 205/280 nm für das Laden (A), Waschen (B) und die Elution (C) während der Aufreinigung vom SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein aus dem Zellkulturüberstand mittels HPLC. Das applizierte Volumen in ml ist auf der x-Achse und die durch das UV-Detektionssystem gemessene Absorption in mAU auf der y-Achse aufgetragen. Die hellgrüne Linie während der Elution (C) zeigt den linearen Gradienten des Elutionsmediums Glycin [Sigma]. Des Weiteren sind noch die Leitfähigkeit, die prozentuale Veränderung der Leitfähigkeit sowie der Druck innerhalb des Pumpensystems der HPLC gegen das applizierte Volumen dargestellt. UV = gemessene UV-Absorption in mAU, Cond = Leitfähigkeit [mS/cm], Cond % = Veränderung der Leitfähigkeit gemessen von der Nulllinie [%]; Conc = Anteil von Glycin während der Elution [%]; Pressure = Druck im Pumpensystem [MPa]



**Abb. 11:** Zeitlicher Verlauf der gemessenen UV-Extinktion bei einer Wellenlänge von 205/280 nm für das Laden (A), Waschen (B) und die Elution (C) während der Aufreinigung vom SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein aus dem Zellkulturüberstand mittels HPLC. Das applizierte Volumen in ml ist auf der x-Achse und die durch das UV-Detektionssystem gemessene Absorption in mAU auf der y-Achse aufgetragen. Die hellgrüne Linie während der Elution (C) zeigt den linearen Gradienten des Elutionsmediums Glycin [Sigma]. Des Weiteren sind noch die Leitfähigkeit, die prozentuale Veränderung der Leitfähigkeit sowie der Druck innerhalb des Pumpensystems der HPLC gegen das applizierte Volumen dargestellt. UV = gemessene UV-Absorption in mAU, Cond = Leitfähigkeit [mS/cm], Cond % = Veränderung der Leitfähigkeit gemessen von der Nulllinie [%]; Conc = Anteil von Glycin während der Elution [%]; Pressure = Druck im Pumpensystem [MPa]





**Abb. 12:** Zeitlicher Verlauf der gemessenen UV-Extinktion bei einer Wellenlänge von 205/280 nm für das Laden (A), Waschen (B) und die Elution (C) während der Aufreinigung vom SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein aus dem Zellkulturüberstand mittels HPLC. Das applizierte Volumen in ml ist auf der x-Achse und die durch das UV-Detektionssystem gemessene Absorption in mAU auf der y-Achse aufgetragen. Die hellgrüne Linie während der Elution (C) repräsentiert den linearen Gradienten des Elutionsmediums Glycin [Sigma]. Des Weiteren sind noch die Leitfähigkeit, die prozentuale Veränderung der Leitfähigkeit sowie der Druck innerhalb des Pumpensystems der HPLC gegen das applizierte Volumen dargestellt. UV = gemessene UV-Absorption in mAU, Cond = Leitfähigkeit [mS/cm], Cond % = Veränderung der Leitfähigkeit gemessen von der Nulllinie [%]; Conc = Anteil von Glycin während der Elution [%]; Pressure = Druck im Pumpensystem [MPa]

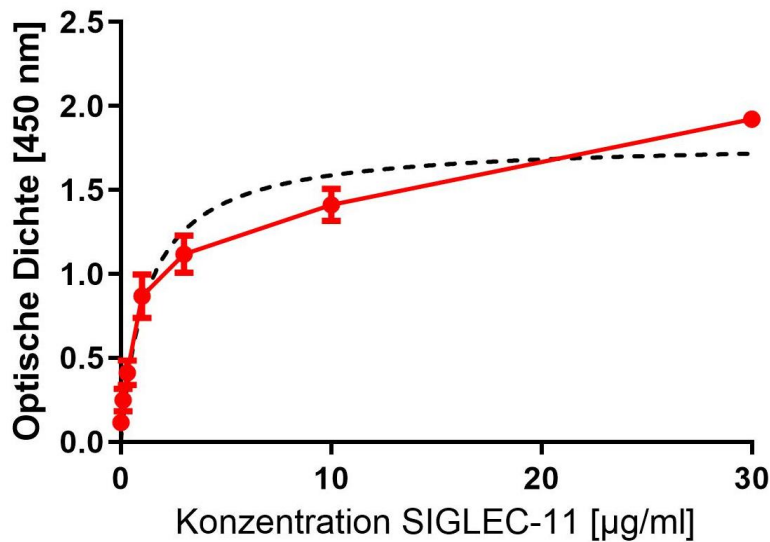
### 3.4 Bindungsspezifität von Polysialinsäure zu SIGLEC-11

Zur nähergehenden Analyse der Bindungsspezifität von Polysialinsäure zu SIGLEC-11 wurde die Bindungsstärke vom SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein in Relation zur Bindungsstärke der SIGLEC Fc-Fusionsproteine von SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 gesetzt. Neben der Bindungsstärke von kurzkettiger Polysialinsäure, das definitionsgemäß zu den niedermolekularen Polysialinsäuren gehört, wurde auch die Bindungsstärke von langkettiger Polysialinsäure zu den SIGLEC Fc-Fusionsproteinen analysiert. Für die Bestimmung der Bindungsstärke wurde ein kompetitiver ELISA, der auf einer mit langkettiger Polysialinsäure beschichteten Mikrotiterplatte basierte, durchgeführt. Zur Etablierung des kompetitiven ELISA wurde mit Hilfe eines Antigen-ELISA die Bindung zwischen langkettiger Polysialinsäure und den SIGLEC Fc-Fusionsproteinen nachgewiesen und die Konzentration von den SIGLEC Fc-Fusionsproteinen ermittelt, um eine ideale Signalintensität zu erreichen. Die Durchführung der beiden verwendeten ELISA-Techniken erfolgte entsprechend der Protokolle in Abschnitt 2.3.

#### 3.4.1 Avidität zwischen SIGLEC-11 und langkettiger Polysialinsäure

Der Antigen-ELISA diente der Untersuchung der Bindungsinteraktion zwischen SIGLEC-11 und langkettiger Polysialinsäure. Hierfür wurde für das SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 0,1 µg/ml, 0,3 µg/ml, 1 µg/ml, 3 µg/ml, 10 µg/ml, und 30 µg/ml angesetzt. Die Visualisierung der Interaktion zwischen dem SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein und langkettiger Polysialinsäure erfolgte durch eine enzymatische Farbreaktion mit einem HRP-konjugierten Antikörper. Es wurden drei Versuchsreihen (n=3) durchgeführt und der Mittelwert aus den bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessenen optischen Dichten (OD-Werten) gebildet. Bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein, das die niedrigste untersuchte Konzentration war, ergab sich ein OD-Wert von 0,249. Bei der Konzentration von 0,3 µg/ml SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein lag die optische Dichte bei 0,412 und bei einer Konzentration von 1 µg/ml SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein bei 0,868. Damit zeigte sich in diesem Konzentrationsbereich der steilste Anstieg für die optische Dichte. Mit

zunehmender Konzentration vom SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein flachte der Anstieg des OD-Werts ab. So lag die Absorption bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein bei 1,411 und bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{g/ml}$  SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein, das die höchste untersuchte Konzentration war, bei 1,921. Damit zeigte sich eine Sättigungskurve für das Bindungsverhalten zwischen dem SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein und langkettiger Polysialinsäure. Die graphischen Darstellungen der gemittelten OD-Werte für das SIGLEC-11 Fc-Fusionsproteine ist Abbildung 13 zu entnehmen.



**Abb. 13:** Graphische Aufbereitung der gemittelten OD-Werte mit der Standardabweichung in Abhängigkeit zu den Konzentrationen des SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein beim Antigen-ELISA. Die gemittelten OD-Werte basieren auf drei Versuchsreihen ( $n=3$ ).

Zur Objektivierung der Bindungsinteraktion wurde zusätzlich die Dissoziationskonstante  $K_D$  mit Hilfe der Software PRISM [GraphPad Software] berechnet. Diese lag für SIGLEC-11 bei 1,27  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3.4.2 Avidität zwischen SIGLEC-3, SIGLEC-5 sowie SIGLEC-10 und langkettiger Polysialinsäure

Zur Überprüfung der Bindungsinteraktion von SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 mit langkettiger Polysialinsäure wurde ebenfalls ein Antigen-ELISA durchgeführt. Analog zum Versuchsaufbau vom SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein wurden die Konzentrationen 0,1 µg/ml, 0,3 µg/ml, 1 µg/ml, 3 µg/ml, 10 µg/ml und 30 µg/ml für die Verdünnungsreihen der SIGLEC Fc-Fusionsprotein von SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 verwendet. Es wurden für die SIGLEC Fc-Fusionsproteine von SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 jeweils drei Versuchsreihen (n=3) durchgeführt und der Mittelwert aus den bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessenen OD-Werten gebildet. Für die SIGLEC Fc-Fusionsproteine von SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 zeigte sich ebenfalls eine Bindungsinteraktion mit langkettiger Polysialinsäure. Für SIGLEC-3 lag der OD-Wert bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein bei 0,14, bei einer Konzentration von 0,3 µg/ml SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein bei 0,23 und bei einer Konzentration von 1 µg/ml SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein bei 0,309. Somit zeigte sich im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 µg/ml SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein und 1,0 µg/ml SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein der stärkste Anstieg bei der optischen Dichte. Im weiteren Verlauf flachte der Anstieg der optischen Dichte zunehmend ab. Bei einer Konzentration von 10 µg/ml SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein war der OD-Wert bei 0,655 und bei einer Konzentration von 30 µg/ml SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein bei 1,127. Damit war die gemessene optische Dichte bei der maximalen Konzentration von 30 µg/ml niedriger als für das SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein, bei dem der OD-Wert bei 1,921 lag.

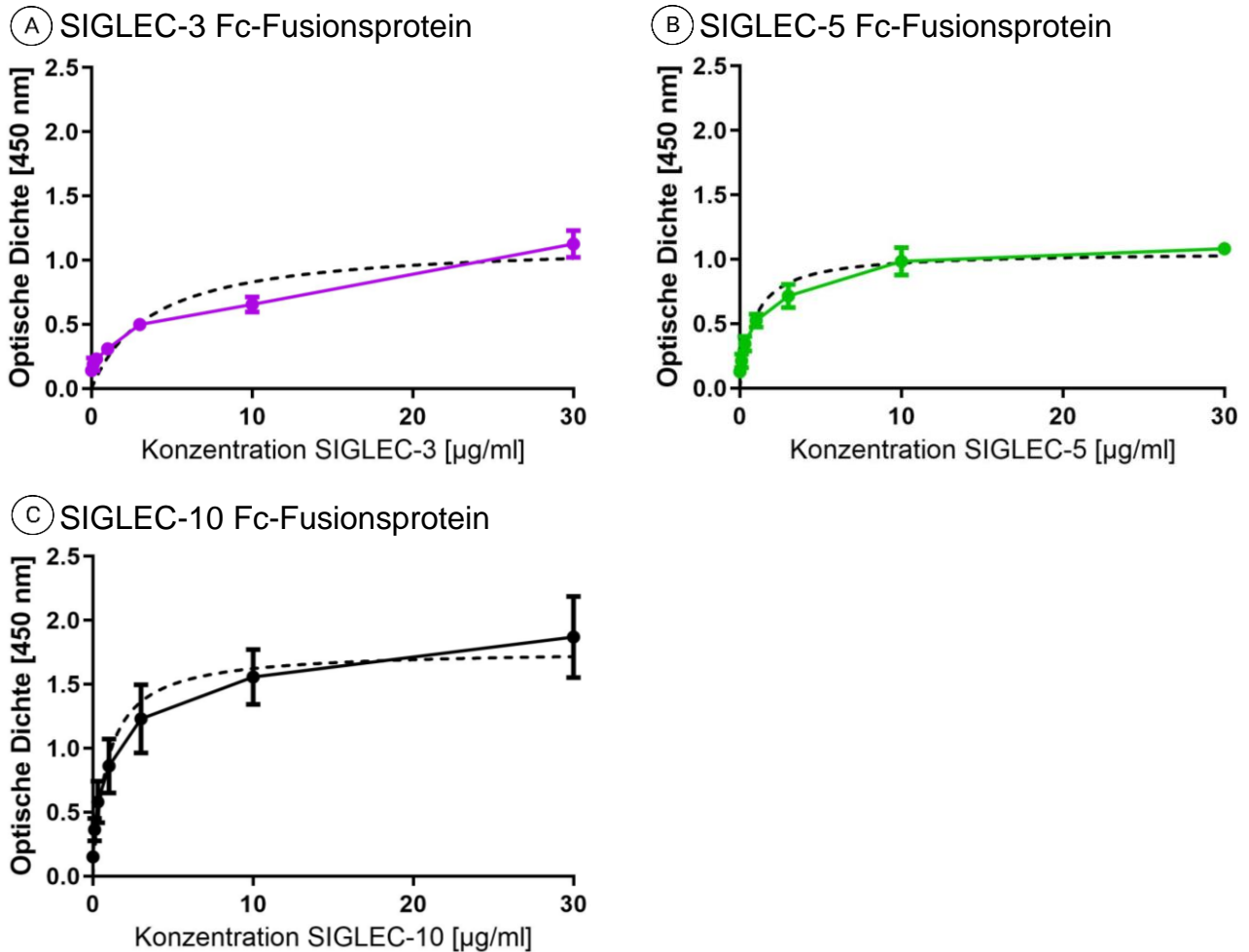
Im Vergleich zum SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein wurden für das SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein höhere OD-Werte gemessen. Eine Ausnahme stellt jedoch die Konzentration von 30 µg/ml SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein dar, bei dem für das SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein eine höhere optische Dichte gemessen werden konnte. Bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein wurde ein OD-Wert von 0,128 gemessen. Der OD-Wert stieg bis zu einer Konzentration von 1 µg/ml SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein auf 0,523 an. Bei der maximalen Konzentration von 30 µg/ml SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein lag der OD-Wert bei 1,082.

Beim SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein konnten im Vergleich zu den SIGLEC Fc-Fusionsproteinen von SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-11 die höchsten OD-Werte gemessen werden. Eine Ausnahme stellte die Konzentration von 30 µg/ml SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein dar, bei der für das SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein der höchste OD-Wert gemessen wurde. Für das SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein ergab sich für die Konzentration von 0,1 µg/ml SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein ein OD-Wert von 0,363. Die optische Dichte stieg bis zur Konzentration von 1 µg/ml SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein auf 0,861 an. Vergleichbar mit den anderen SIGLEC Fc-Fusionsproteinen war auch für das SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 µg/ml SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein und 1 µg/ml SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein der Anstieg des OD-Werts am steilsten. Bei einer Konzentration von 30 µg/ml SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein war der OD-Wert bei 1,869.

In der graphischen Darstellung der OD-Werte zeigt sich für SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 ebenfalls ein konzentrationsabhängiges Bindungsverhalten, wobei mit zunehmender Konzentration eine Rezeptorsättigung erreicht wurde. Damit handelt es sich bei SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 genauso wie bei SIGLEC-11 um eine Sättigungskurve, sodass sich für SIGLEC-3, SIGLEC-5, SIGLEC-10 und SIGLEC-11 eine vergleichbare Bindungsinteraktion mit langkettiger Polysialinsäure als Bindungspartner ergab. Die graphischen Darstellungen der gemittelten OD-Werte für die SIGLEC Fc-Fusionsproteine von SIGLEC-3 (A), SIGLEC-5 (B) und SIGLEC-10 (C) sind Abbildung 14 zu entnehmen. Aus den gemessenen OD-Werten des Antigen-ELISA wurde anschließend noch die Dissoziationskonstante  $K_D$  berechnet. Im Vergleich zu SIGLEC-5 und SIGLEC-10 erreichte SIGLEC-3 mit einem Wert von 3,722 µg/ml die höchste  $K_D$ . Die niedrigste  $K_D$  erreichte SIGLEC-5 mit 0,886 µg/ml. Für SIGLEC-10 ergab sich ein Wert von 0,892 µg/ml. Mit einer  $K_D$  von 1,27 µg/ml lag SIGLEC-11 zwischen SIGLEC-3 sowie SIGLEC-5 und SIGLEC-10. Die  $K_D$  sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

**Tab. 15:** Darstellung der Dissoziationskonstante  $K_D$  für SIGLEC-3, SIGLEC-5, SIGLEC-10 und SIGLEC-11.

	<b>SIGLEC-3</b>	<b>SIGLEC-5</b>	<b>SIGLEC-10</b>	<b>SIGLEC-11</b>
Dissoziationskonstante $K_D$ [µg/ml]	3,722	0,866	0,892	1,27

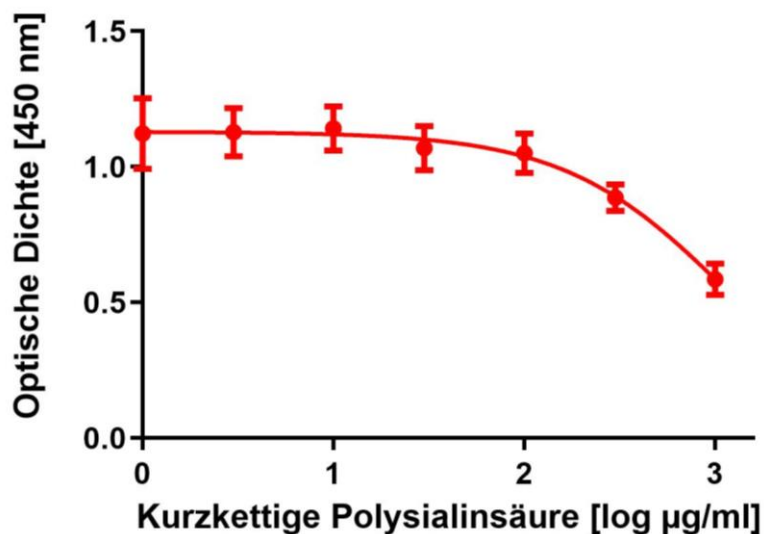


**Abb. 14:** Graphische Darstellung der OD-Werte mit der Standardabweichung in Abhängigkeit zur Konzentration der SIGLEC Fc-Fusionsproteine von SIGLEC-3 (A), SIGLEC-5 (B) und SIGLEC-10 (C). Dargestellt sind die gemittelten OD-Werte ( $n=3$ ) mit der Standardabweichung. Die Ergebnisse zeigen ein konzentrationsabhängiges Bindungsverhalten, wobei mit zunehmender Konzentration eine Rezeptorsättigung erreicht wird.

### 3.4.3 Bindungsstärke von kurzkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11

Zur Bestimmung der Bindungsstärke von kurzkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11 wurde ein kompetitiver ELISA durchgeführt. Für die kurzkettige Polysialinsäure wurde eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 1  $\mu\text{g/ml}$ , 3  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 30  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 300  $\mu\text{g/ml}$  und 1000  $\mu\text{g/ml}$  verwendet. Der Nachweis der Bindung zwischen dem SIGLEC-11

Fc-Fusionsprotein und kurzkettiger Polysialinsäure erfolgte durch die enzymatische Farbreaktion eines mit HRP-konjugierten Antikörpers. Es wurden drei Versuchsreihen ( $n=3$ ) durchgeführt und der Mittelwert aus den bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessenen OD-Werten gebildet. Bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  kurzkettiger Polysialinsäure lag der OD-Wert bei 1,124. Für eine Konzentration von 3  $\mu\text{g/ml}$  kurzkettiger Polysialinsäure blieb die optische Dichte mit 1,128 annähernd konstant und stieg bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  kurzkettiger Polysialinsäure auf einen OD-Wert von 1,141 an. Im Folgenden sank die optische Dichte bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{g/ml}$  kurzkettiger Polysialinsäure auf 1,069, bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  kurzkettiger Polysialinsäure auf 1,05 und bei einer Konzentration von 300  $\mu\text{g/ml}$  kurzkettiger Polysialinsäure auf 0,887. Bei der maximalen Konzentration von 1000  $\mu\text{g/ml}$  kurzkettiger Polysialinsäure lag der OD-Wert bei 0,586. Die gemessenen OD-Werte sind in Abbildung 15 dargestellt.



**Abb. 15:** Graphische Darstellung der OD-Werte mit der Standardabweichung in Abhängigkeit zum Logarithmus der Konzentration von kurzkettiger Polysialinsäure beim kompetitiven ELISA für das SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein. Dargestellt sind die gemittelten OD-Werte ( $n=3$ ). Zur Objektivierung der Bindungsstärke wurde anhand der gemessenen OD-Werte zusätzlich die  $IC_{50}$  berechnet. Für SIGLEC-11 lag die  $IC_{50}$  bei 1191  $\mu\text{g/ml}$  kurzkettiger Polysialinsäure. Daraus ergibt sich ein  $pIC_{50}$  für SIGLEC-11 von 3,076.

Zur Objektivierung der Bindungsstärke wurde mit Hilfe der Software PRISM [GraphPad Software] aus den gemessenen OD-Werte die mittlere inhibitorische Konzentration  $IC_{50}$  berechnet. Die  $IC_{50}$  für SIGLEC-11 lag bei 1191  $\mu\text{g/ml}$  kurzkettige Polysialinsäure. Ergänzend wurde noch der negative dekadische Logarithmus  $pIC_{50}$  berechnet. Der  $pIC_{50}$  war für SIGLEC-11 3,076.

#### 3.4.4 Bindungsstärke von kurzkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10

Zur Berechnung der Bindungsspezifität von kurzkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11 wurde die Bindungsstärke von SIGLEC-11 in Relation zur Bindungsstärke von SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 gesetzt. Daher wurde analog zum kompetitiven ELISA von SIGLEC-11 dieselbe Verdünnungsreihe für kurzkettige Polysialinsäure mit den Konzentrationen 1  $\mu\text{g/ml}$ , 3  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 30  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 300  $\mu\text{g/ml}$  und 1000  $\mu\text{g/ml}$  verwendet. Für die SIGLEC Fc-Fusionsproteine von SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 wurden jeweils 3 Versuchsreihen ( $n=3$ ) durchgeführt.

Für das SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein lag der OD-Wert bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  kurzkettige Polysialinsäure bei 0,742 und blieb für die Konzentration von 3  $\mu\text{g/ml}$  kurzkettige Polysialinsäure mit einer optischen Dichte von 0,771 annähernd konstant. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  kurzkettige Polysialinsäure sank der OD-Wert auf 0,651 und blieb anschließend bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  kurzkettige Polysialinsäure mit einer optischen Dichte von 0,678 konstant. Bei einer Konzentration von 300  $\mu\text{g/ml}$  kurzkettige Polysialinsäure sank die Absorptionsdichte auf 0,574. Bei der maximal untersuchten Konzentration von 1000  $\mu\text{g/ml}$  kurzkettige Polysialinsäure lag der OD-Wert bei 0,288. Damit nahm die Absorptionsdichte im Bereich zwischen 100  $\mu\text{g/ml}$  kurzkettige Polysialinsäure und 1000  $\mu\text{g/ml}$  kurzkettige Polysialinsäure am stärksten ab.

Einen vergleichbaren Kurvenverlauf ergaben sich sowohl für das SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein als auch für das SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein. Für das SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein lag der OD-Wert bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  kurzkettige Polysialinsäure bei 0,410

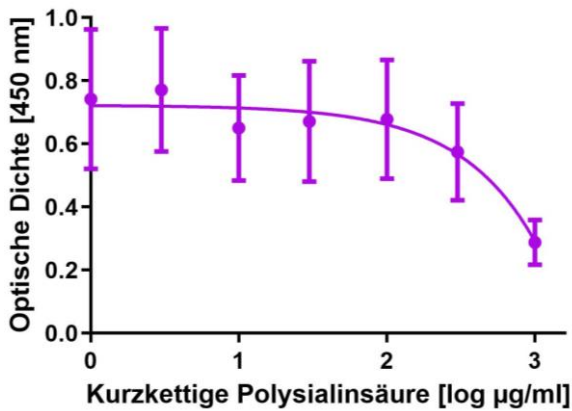


und war bis zu einer Konzentration von 3 µg/ml kurzkettige Polysialinsäure annähernd konstant. Bei einer Konzentration von 10 µg/ml kurzkettige Polysialinsäure sank der OD-Wert auf 0,391. Danach verringerte sich die optische Dichte für eine Konzentration von 30 µg/ml kurzkettige Polysialinsäure auf 0,363 und blieb bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml kurzkettige Polysialinsäure mit einem OD-Wert von 0,365 annähernd konstant. Danach sank der OD-Wert bei einer Konzentration von 300 µg/ml kurzkettige Polysialinsäure auf 0,304. Bei der höchsten Konzentration von 1000 µg/ml kurzkettige Polysialinsäure lag die optische Dichte bei 0,161.

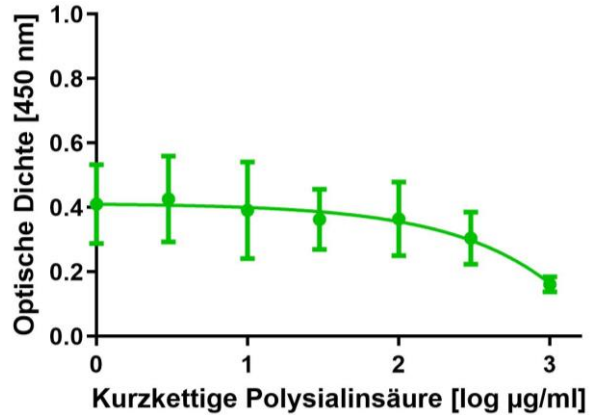
Im Vergleich dazu konnte für das SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein höhere OD-Werte gemessen werden. Bei einer Konzentration von 1 µg/ml kurzkettige Polysialinsäure lag die optische Dichte bei 0,443. Bei einer Konzentration von 3 µg/ml kurzkettige Polysialinsäure stieg der OD-Wert auf 0,504 an, um dann wieder auf eine optische Dichte von 0,446 bei einer Konzentration von 10 µg/ml kurzkettige Polysialinsäure zu sinken. Bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml kurzkettige Polysialinsäure blieb der OD-Wert mit 0,448 weitestgehend konstant. Danach sank der OD-Wert bei einer Konzentration von 300 µg/ml kurzkettige Polysialinsäure auf 0,376. Bei der maximalen Konzentration von 1000 µg/ml kurzkettige Polysialinsäure lag die optische Dichte bei 0,21. Die graphische Darstellung der OD-Werte für die SIGLEC Fc-Fusionsproteine von SIGLEC-3 (A), SIGLEC-5 (B) und SIGLEC-10 (C) erfolgte mit der Software PRISM [GraphPad Software] und ist in Abbildung 16 dargestellt.

Im nächsten Schritt wurde zur Objektivierung der Bindungsstärke ebenfalls aus den gemessenen OD-Werte die  $IC_{50}$  berechnet. Die Berechnung wurde mit Hilfe der Software PRISM [GraphPad Software] durchgeführt. Die mittlere inhibitorische Konzentration für SIGLEC-3 lag bei  $5,85 \times 10^7$  µg/ml kurzkettige Polysialinsäure. Für SIGLEC-5 war die  $IC_{50}$  bei  $1,87 \times 10^7$  µg/ml kurzkettige Polysialinsäure und für SIGLEC-10 bei  $2,96 \times 10^6$  µg/ml kurzkettige Polysialinsäure. Ergänzend dazu wurde noch der negative dekadische Logarithmus  $pIC_{50}$  berechnet. Für SIGLEC-5 ergab sich die höchste  $pIC_{50}$  mit 9,272 und für SIGLEC-10 die niedrigste  $pIC_{50}$  mit 6,471. Dazwischen lag SIGLEC-3 mit einem  $pIC_{50}$  von 7,767. Von allen vier untersuchten SIGLEC Fc-Fusionsproteinen hatte SIGLEC-11 mit 3,08 die niedrigste  $pIC_{50}$ .

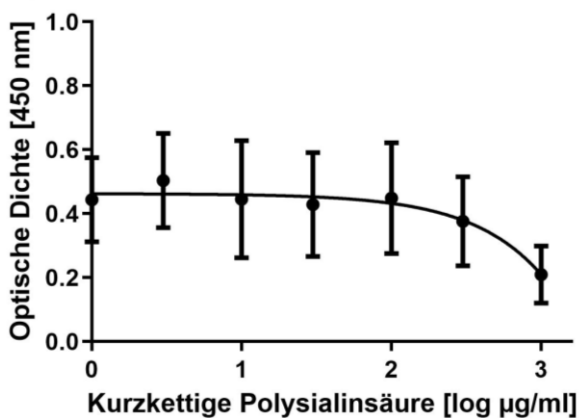
(A) SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein



(B) SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein



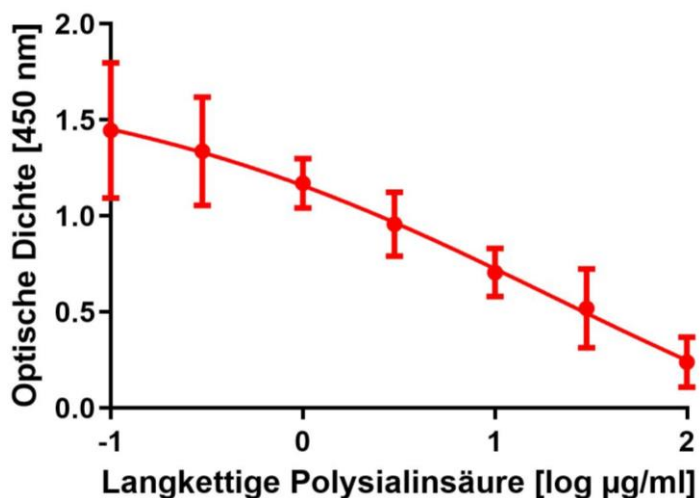
(C) SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein



**Abb. 16:** Graphische Darstellung der OD-Werte mit der Standardabweichung in Abhängigkeit zum Logarithmus der Konzentration von kurzketttiger Polysialinsäure beim kompetitiven ELISA für die SIGLEC Fc-Fusionsproteine von SIGLEC-3 (A), von SIGLEC-5 (B) und von SIGLEC-10 (C). Dargestellt sind die gemittelten OD-Werte ( $n=3$ ). Zur Objektivierung der Bindungsstärke wurde anhand der gemessenen OD-Werte zusätzlich die  $IC_{50}$  berechnet. Für SIGLEC-3 lag diese bei  $5,85 \times 10^7$  µg/ml kurzketttige Polysialinsäure, für SIGLEC-5 bei  $1,87 \times 10^7$  µg/ml kurzketttige Polysialinsäure und für SIGLEC-10 bei  $2,96 \times 10^6$  µg/ml kurzketttige Polysialinsäure. Daraus ergibt sich ein  $pIC_{50}$  für SIGLEC-3 von 7,767, für SIGLEC-5 von 9,272 und für SIGLEC-10 von 6,471.

### 3.4.5 Bindungsstärke von langkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11

Neben der Bindungsspezifität von kurzkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11 wurde auch die Bindungsspezifität von langkettiger Polysialinsäure untersucht. Für langkettige Polysialinsäure wurde eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 0,1 µg/ml, 0,3 µg/ml, 1 µg/ml, 3 µg/ml, 10 µg/ml, 30 µg/ml und 100 µg/ml verwendet. Es wurden insgesamt drei Versuchsreihen (n=3) durchgeführt und aus diesen der gemittelte OD-Wert gebildet. Für eine Konzentration von 0,1 µg/ml langkettige Polysialinsäure wurde ein OD-Wert von 1,445 gemessen. Mit zunehmender Konzentration von langkettiger Polysialinsäure nahm der OD-Wert ab. So wurde bei einer Konzentration von 0,3 µg/ml langkettige Polysialinsäure ein OD-Wert von 1,337, von 3 µg/ml langkettige Polysialinsäure ein OD-Wert von 0,958 µg/ml und von 30 µg/ml langkettige Polysialinsäure ein OD-Wert von 0,52 gemessen. Bei der maximalen Konzentration von 100 µg/ml langkettige Polysialinsäure betrug der OD-Wert 0,24. Die gemessenen OD-Werte sind in Abbildung 17 dargestellt.



**Abb. 17:** Graphische Darstellung der OD-Werte mit der Standardabweichung in Abhängigkeit zum Logarithmus der Konzentration von langkettiger Polysialinsäure beim kompetitiven ELISA für das SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein. Dargestellt sind die gemittelten OD-Werte (n=3) mit der Standardabweichung für das SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein. Zur Objektivierung der Bindungsspezifität wurde mit Hilfe der OD-Werte die  $IC_{50}$  berechnet. Für SIGLEC-11 lag diese bei 19,85 µg/ml langkettige Polysialinsäure. Dementsprechend war die  $pIC_{50}$  1,298 für SIGLEC-11.

Wie bei der kurzkettigen Polysialinsäure wurde zur Objektivierung der Bindungsstärke die  $IC_{50}$  berechnet. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der Software PRISM [GraphPad Software]. Die mittlere inhibitorische Konzentration für SIGLEC-11 und langkettiger Polysialinsäure als Ligand war  $19,85 \mu\text{g/ml}$  langkettige Polysialinsäure. Weiterführend wurde noch der negative dekadische Logarithmus  $pIC_{50}$  gebildet. Der  $pIC_{50}$  lag für SIGLEC-11 bei 1,298.

#### 3.4.6 Bindungsstärke von langkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10

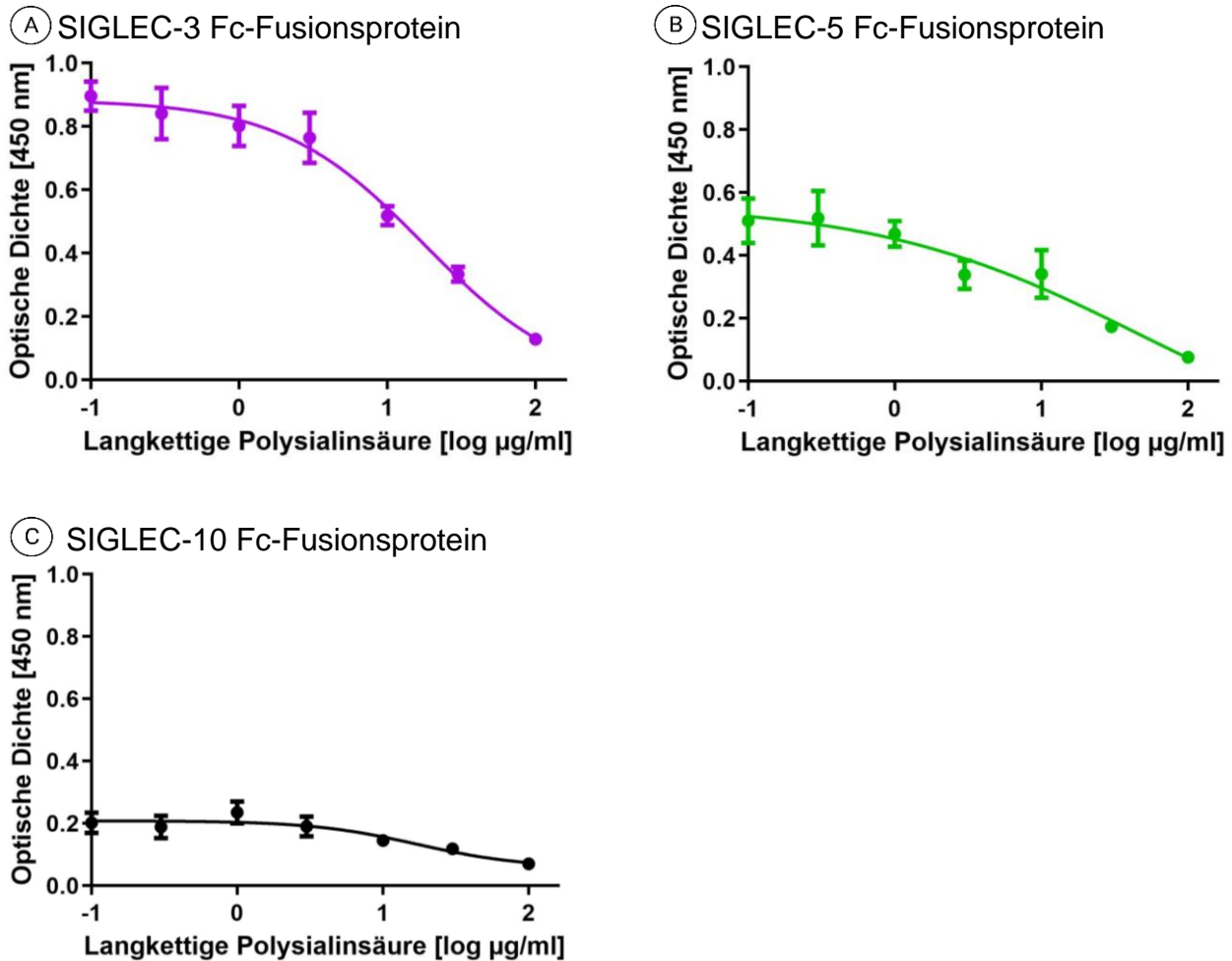
Zur Untersuchung der Bindungsspezifität von langkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11 wurde ebenfalls die Bindungsstärke zwischen SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 und langkettiger Polysialinsäure untersucht. Folglich wurde für langkettige Polysialinsäure die identische Verdünnungsreihe wie bei der Messung der Bindungsstärke zwischen SIGLEC-11 und langkettiger Polysialinsäure verwendet. Für alle drei SIGLEC Fc-Fusionsproteine wurden jeweils 3 Versuchsreihen ( $n=3$ ) durchgeführt. Für das SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein lag die Absorption bei einer Konzentration von  $0,1 \mu\text{g/ml}$  langkettige Polysialinsäure bei einem OD-Wert von 0,896. Bei der folgenden Konzentration von  $0,3 \mu\text{g/ml}$  langkettige Polysialinsäure sank die Absorptionsdichte auf 0,841. Bei den folgenden Konzentrationen nahm der OD-Wert weiter ab. Der OD-Wert war 0,765 bei einer Konzentration von  $3 \mu\text{g/ml}$  langkettige Polysialinsäure, 0,519 bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{g/ml}$  langkettige Polysialinsäure und 0,334 bei einer Konzentration von  $30 \mu\text{g/ml}$  langkettige Polysialinsäure. Bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{g/ml}$ , was die höchste Konzentration war, lag der OD-Wert bei 0,129.

Für das SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein und das SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein ergaben sich ähnliche Kurvenverläufe für die optische Dichte. Für das SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein war der OD-Wert bei einer Konzentration von  $0,1 \mu\text{g/ml}$  bei 0,510 und war bis zu einer Konzentration von  $0,3 \mu\text{g/ml}$  langkettige Polysialinsäure mit einem OD-Wert von 0,519 annähernd konstant. Danach sank der OD-Wert auf 0,469 bei einer Konzentration von  $1 \mu\text{g/ml}$  langkettige Polysialinsäure. Bei einer Konzentration von  $3 \mu\text{g/ml}$  langkettige Polysialinsäure verringerte sich die optische Dichte auf 0,339 und sank weiter auf einen OD-Wert von 0,341 bei

einer Konzentration von 10 µg/ml langkettige Polysialinsäure. Bei einer Konzentration von 30 µg/ml langkettige Polysialinsäure lag der OD-Wert bei 0,174. Bei der höchsten Konzentration von 100 µg/ml langkettige Polysialinsäure war der OD-Wert bei 0,077.

Für das SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein ergaben sich im Vergleich zu den SIGLEC Fc-Fusionsproteinen von SIGLEC-3 und SIGLEC-5 geringere optische Dichten. Für das SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein lag der OD-Wert bei 0,202 für eine Konzentration von 0,1 µg/ml langkettige Polysialinsäure. Bei einer Konzentration von 0,3 µg/ml langkettige Polysialinsäure sank der OD-Wert auf 0,188 und stieg dann bei einer Konzentration von 1 µg/ml langkettige Polysialinsäure wieder auf eine optische Dichte von 0,236 an. Damit blieb der OD-Wert bis zu einer Konzentration von 3 µg/ml langkettige Polysialinsäure, bei dem die Absorptionsdichte bei 0,190 lag, weitestgehend konstant. Danach sank der OD-Wert auf 0,119 bei einer Konzentration von 30 µg/ml langkettige Polysialinsäure. Für die höchste untersuchte Konzentration von 100 µg/ml langkettige Polysialinsäure lag die optische Dichte bei 0,070. Die graphische Darstellung erfolgte mit der Software PRISM [GraphPad Software] und ist für die SIGLEC Fc-Fusionsprotein von SIGLEC-3 (A), SIGLEC-5 (B) und SIGLEC-10 (C) in Abbildung 18 dargestellt.

Im nächsten Schritt wurde aus den gemessenen OD-Werten die  $IC_{50}$  berechnet. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der Software PRISM [GraphPad Software]. Die  $IC_{50}$  für SIGLEC-3 mit langkettiger Polysialinsäure als Bindungspartner lag bei 17,66 µg/ml langkettige Polysialinsäure und für SIGLEC-5 bei 46,18 µg/ml langkettige Polysialinsäure. Die geringste  $IC_{50}$  ergab sich für SIGLEC-10 mit 17,28 µg/ml langkettige Polysialinsäure. Zusätzlich wurde auch die  $pIC_{50}$  als dekadischer Logarithmus berechnet. Im Vergleich zu SIGLEC-11, bei dem die  $pIC_{50}$  bei 1,298 lag, war sowohl für SIGLEC-3 mit einer  $pIC_{50}$  von 1,247 als auch für SIGLEC-10 mit einer  $pIC_{50}$  von 1,237 die Bindungsstärke höher. Für SIGLEC-10 war die Bindungsstärke mit einer  $pIC_{50}$  von 1,664 am geringsten.



**Abb. 18:** Graphische Darstellung der OD-Werte mit der Standardabweichung in Abhängigkeit zum Logarithmus der Konzentration von langkettiger Polysialinsäure beim kompetitiven ELISA für das SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein (A), für das SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein (B) und für das SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein (C). Dargestellt sind die gemittelten OD-Werte ( $n=3$ ). Zur Objektivierung der Bindungsspezifität wurde mit Hilfe der OD-Werte die  $IC_{50}$  berechnet. Für SIGLEC-3 lag diese bei 17,66 µg/ml langkettige Polysialinsäure, für SIGLEC-5 bei 46,18 µg/ml langkettige Polysialinsäure und für SIGLEC-10 bei 17,28 µg/ml langkettige Polysialinsäure. Dementsprechend war die  $pIC_{50}$  für SIGLEC-3 bei 1,247, für SIGLEC-5 bei 1,664 und für SIGLEC-10 bei 1,237.

## 4. Diskussion

Mit zunehmendem Alter treten eine Vielzahl von Veränderungen des Immunsystems auf, die unter dem Begriff der Immunoseneszenz zusammengefasst werden und mit einer abnehmenden Funktionsfähigkeit des Immunsystems einhergehen. Hierzu zählen unter anderem die Expression von pro-inflammatorischen Mediatoren und die Entwicklung einer chronischen sterilen Entzündungsreaktion. Letzteres wird als Inflammaging bezeichnet und ist mit der Pathogenese von altersbedingten Krankheiten wie den neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert. Zu den neurodegenerativen Erkrankungen gehören unter anderem Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer (Cicolari et al., 2021; Kosyreva et al., 2022; Stephenson et al., 2018). Morbus Alzheimer ist durch aktivierte Mikrogliazellen und einer veränderten neuronalen Glykokalyx, die zu einer chronischen Entzündungsreaktion führen, charakterisiert (Claude et al., 2013; Wang und Neumann, 2010). Des Weiteren kommt es beim Morbus Alzheimer zu einer Akkumulation von A $\beta$  (Rubio-Perez und Morillas-Ruiz, 2012). Beim Morbus Parkinson führt die Ablagerung von  $\alpha$ -synuclein zu einer chronischen Entzündungsreaktion mit einem konsekutiven Untergang von Neuronen in der Substantia nigra (Poewe et al., 2017). Gemeinsam ist diesen und anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Frontotemporalen Demenz, der amyotrophen Lateralsklerose oder dem Chorea Huntington, dass ein hohes Lebensalter ein Hauptrisikofaktor darstellt (Hou et al., 2019). Aktuell stehen für die Behandlung dieser altersbedingten Erkrankungen überwiegend symptomatische Therapieansätze zur Verfügung. Die Entwicklung eines kurativen Therapieansatzes ist im Hinblick auf den demographischen Wandel von gesellschaftlicher Relevanz, weil die neurodegenerativen Erkrankungen mit hohen sozioökonomischen Kosten verbunden sind (Azam et al., 2021; Hou et al., 2019). Ein potenzieller therapeutischer Ansatzpunkt ist die Sialinsäure-SIGLEC Achse, die mehrere klinische und pharmakologische Vorteile mit sich bringt (Lünemann et al., 2021). Ein Vorteil der Sialinsäure-SIGLEC Achse ist, dass Sialinsäure als natürlich vorkommendes, körpereigenes Molekül fester Bestandteil einer intakten und gesunden neuronalen Glykokalyx ist. In der Regel ist es zahlreich an der äußeren Position der Glykokalyx zu finden (Deng et al., 2013; Bardor et al., 2005; Angata und Varki, 2002; Bornhöfft et al., 2018). Des Weiteren

steuert die Sialinsäure-SIGLEC Achse essentielle, intrazelluläre Signalwege, wozu die Modulation von inflammatorischen Prozessen gehört (Gagneux et al., 2015; Liao et al., 2020; Daëron et al., 2008). Innerhalb der Sialinsäure-SIGLEC Achse existiert mit SIGLEC-11 ebenfalls eine vielversprechende therapeutische Zielstruktur zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen. Zum einem wird der Rezeptor vornehmlich auf residenten Gewebemakrophagen wie Mikrogliazellen und damit einhergehend im neuronalen Gewebe exprimiert. Zusätzlich unterscheidet sich SIGLEC-11 durch die bevorzugte Bindung von  $\alpha$ 2,8-verknüpfter Sialinsäure in seinen Bindungscharakteristika von den anderen SIGLEC (Wang et al., 2012; Angata, 2002; Hayakawa et al., 2005). Dabei konnte der anti-inflammatorische Effekt von SIGLEC-11 durch die Bindung von Polysialinsäure bereits in vorherigen Studien der Arbeitsgruppe experimentell nachgewiesen werden (Lünemann et al., 2021; Shahraz et al., 2015; Shahraz et al., 2022).

Für die weitere Evaluation der Sialinsäure-SIGLEC Achse als potenziellen therapeutischen Ansatzpunkt galt es die Bindungscharakteristika zwischen SIGLEC-11 und Polysialinsäure nähergehend zu analysieren. Diese Dissertation zeigt neue Erkenntnisse hinsichtlich der Bindungsspezifität von kurzkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11 in Relation zu den Rezeptoren SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10, die ebenso wie SIGLEC-11 zur Untergruppe der CD33-ähnlichen Rezeptoren gehören (Crocker und Varki, 2001b; Duan und Paulson, 2020). Weiterführend wurde die Bindungsspezifität von langkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11 untersucht. Hierzu wurde die Bindungsstärke zwischen langkettiger Polysialinsäure und SIGLEC-11 ebenfalls in Relation zu der Bindungsstärke von SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 untersucht. Die Untersuchung der Bindungsstärke von Polysialinsäure unterschiedlicher Polymerisierungsgrade zu SIGLEC erfolgte mittels eines Antigen-ELISA und eines kompetitiven ELISA. Hierfür wurden im Rahmen dieser Dissertation Versuchsprotokolle etabliert. Für die Durchführung der ELISA wurden SIGLEC Fc-Fusionsproteine genutzt, für deren Proteinbiosynthese und anschließenden Aufreinigung in dieser Dissertation ebenfalls ein Protokoll etabliert wurde. Dieses umfasste die Klonierung der SIGLEC Fc-Fusionsplasmide, die darauffolgende Transfektion von HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] mit den SIGLEC Fc-Fusionsplasmiden sowie die abschließende Aufreinigung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine



aus dem Zellkulturüberstand. In der Zusammenschau konnten durch die Analyse der Bindungsspezifität von kurzkettiger sowie langkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11 wichtige Erkenntnisse über das Potenzial der Sialinsäure-SIGLEC Achse als therapeutischen Ansatzpunkt gewonnen werden.

#### 4.1 Etablierung eines Protokolls zur Proteinbiosynthese von SIGLEC Fc-Fusionsproteinen

Bevor die Bindungsstärke zwischen SIGLEC und Polysialinsäure durch den ELISA gemessen werden konnte, musste zuerst ein Protokoll zur Gewinnung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine von SIGLEC-3, SIGLEC-5, SIGLEC-10 und SIGLEC-11 etabliert werden. Dieses umfasste die einzelnen Schritte von der Klonierung eines SIGLEC Fc-Fusionsplasmids über die Proteinbiosynthese in transfizierten HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] bis hin zur Aufreinigung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine aus dem Zellkulturüberstand.

##### 4.1.1 Klonierung des SIGLEC Fc-Fusionsplasmids zur Proteinbiosynthese der SIGLEC Fc-Fusionsproteine

Zur Gewinnung von rekombinanten Proteinen ist die Nutzung von Fc-Fusionsproteinen eine gängige Methode (Asher und Bren, 2014; Guerrero et al., 2015; Su et al., 2013). Dementsprechend wurde in dieser Dissertation zur Analyse der Bindungsspezifität von Polysialinsäure zu SIGLEC-11 ein Fc-Fusionsprotein verwendet. Hierzu wurde im ersten Schritt ein Fc-Fusionsplasmid, das sich aus SIGLEC als Insert und dem pFuse-hIgG1-Fc2 Vektor [InvivoGen] zusammensetzt, kloniert. Für das Insert wurde nicht die gesamte genetische Information der jeweiligen SIGLEC verwendet, sondern nur die V-Set Ig-Domäne sowie die erste C2-Set Ig-Domäne. Die V-Set Ig-Domäne ist von Bedeutung, da sich auf dem F-Strang der V-Set Ig-Domäne die Bindungsstelle für Polysialinsäure befindet. Die Bindungsstelle ist ein positiv geladenes Arginin, das sich in einer flachen Tasche befindet (Angata, 2002; Duan und Paulson, 2020). Die C2-Set Ig-Domäne projiziert die Bindungsstelle der V-Set Ig-Domäne in den Raum. Die Projektion der Bindungsstelle in den extrazellulären Raum ist für die Detektion von Polysialinsäure wichtig (Duan und Paulson, 2020). Die DNA-Sequenzen von

SIGLEC-3, SIGLEC-5, SIGLEC-10 und SIGLEC-11 wurden mit Hilfe der Software geneious [biomatters] von der öffentlichen Datenbank des National Center for Biotechnology Information entnommen. Als Vektor wurde der pFuse-hlgG1-Fc2-Vektor [InvivoGen] verwendet. Bereits in früheren Arbeiten wurde der pFuse-hlgG1-Fc2-Vektor [InvivoGen] erfolgreich zur Klonierung von Fc-Fusionsplasmiden eingesetzt, um Fc-Fusionsproteine für experimentelle Untersuchung zu synthetisieren (Yang et al., 2021; Bode et al., 2019). Dieses ist dadurch zu begründen, dass der pFuse-hlgG1-Fc2-Vektor [InvivoGen] zum einen die genetische Information für die IL2-Signalsequenz enthält. Diese Signalsequenz bedingt, dass die klonierten Fc-Fusionsproteine in den Zellüberstand sezerniert werden. Zum anderen enthält der Vektor die genetische Information für die CH2-Domäne und CH3-Domäne der schweren IgG-Kette. Diese ermöglicht beispielsweise die Aufreinigung der Fc-Fusionsprotein aus dem Zellkulturüberstand mittels Affinitätschromatographie.

In dieser Dissertation wurde erfolgreich ein Protokoll zur Klonierung der SIGLEC Fc-Fusionsplasmide von SIGLEC-3, SIGLEC-5, SIGLEC-10 und SIGLEC-11 etabliert. Der Nachweis einer erfolgreichen Ligation des Vektors mit dem Insert sowie der Ausschluss von Mutationen erfolgte durch einen zweistufigen Prozess. Zuerst wurde durch einen Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* [ThermoFisher] und *BglII* [ThermoFisher] der Erfolg der Klonierung überprüft. Die Proben, bei denen im Doppelverdau eine erfolgreiche Klonierung nachgewiesen werden konnten, wurden dem zweiten Prozessschritt zugeführt. Bei diesem wurden Mutationen innerhalb des Inserts, die während der Klonierung und Amplifizierung aufgetreten sind, durch eine direkte Gensequenzierung ausgeschlossen. In der Zusammenschau konnte damit erfolgreich ein SIGLEC Fc-Fusionsplasmid für SIGLEC-3, SIGLEC-5, SIGLEC-10 und SIGLEC-11 kloniert werden. Vermutlich wird dieses Protokoll in Zukunft auch zur Klonierung von weiteren SIGLEC Fc-Fusionsplasmiden genutzt werden können.

#### 4.1.2 HEK 293-F Zellen können SIGLEC Fc-Fusionsproteine synthetisieren und sezernieren

Für die Proteinbiosynthese der SIGLEC Fc-Fusionsproteine wurden HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] verwendet, bei denen es sich um eine modifizierte Zelllinie von HEK 293 Zellen handelt. Ursprünglich wurde die HEK 293 Zelllinie aus der Niere eines im Jahr 1973 gestorbenen Embryos gewonnen (Graham et al., 1977). Ein wesentlicher Vorteil der HEK 293 Zelllinie ist, dass diese unter standardisierten Zellkulturbedingungen eine stabile Genomstruktur besitzt (Lin et al., 2014). Dem Anforderungsprofil des jeweiligen Anwendungszwecks entsprechend wurde diese Zelllinie in den vergangenen Jahren mehrfach modifiziert (Thomas und Smart, 2005). Bei den in dieser Dissertation verwendeten HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] handelt es sich um eine Zelllinie, die auf die Proteinbiosynthese von rekombinanten Proteinen in hohen Konzentrationen spezialisiert ist. Damit eignet sich die HEK 293-F Zelllinie für die Proteinbiosynthese der SIGLEC Fc-Fusionsproteine besonders. Zum Nachweis der Proteinbiosynthese der SIGLEC Fc-Fusionsproteine wurde ein Western Blot mit dem Zelllysats von transfizierten HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] durchgeführt. Für die SIGLEC Fc-Fusionsproteine von SIGLEC-3, SIGLEC-5, SIGLEC-10 und SIGLEC-11 konnte die Proteinbiosynthese durch HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] nachgewiesen werden. Im Western Blot zeigte sich für das SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein ein Molekulargewicht von ~130 kDa, für das SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein von ~120 kDa, für das SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein von ~110 kDa und für das SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein von ~120 kDa. Interessanterweise unterschied sich damit das Molekulargewicht der durch HEK 293-F Zellen synthetisierten SIGLEC Fc-Fusionsproteine, das im Western Blot abgelesen werden konnte, vom durch die Software geneious [Biomatters] kalkulierten Molekulargewicht. Für das SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein wurde ein Molekulargewicht von 54,75 kDa, für das SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein von 53,43 kDa, für das SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein von 52,71 kDa und für das SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein von 55,67 kDa durch die Software geneious [biomatters] berechnet. Es ist davon auszugehen, dass die Unterschiede beim Molekulargewicht durch posttranslationale Modifikationen, die bei der computergestützten Berechnung nicht berücksichtigt worden sind, verursacht wurden. Posttranslationale Modifikationen finden in Säugetierzellen, wie den HEK 293 Zellen, regelmäßig am Ende der Proteinbiosynthese statt und sind essentiell für die

Funktionsfähigkeit von Proteinen (Xu et al., 2018). In der Literatur ist bereits beschrieben worden, dass durch HEK 293 Zellen synthetisierte Fusionsproteine auf Grund der humanen Herkunft der Zelllinie eine posttranslationale Modifikation erhalten. Diese Modifikationen sind mit den physiologischen posttranslationalen Prozessen des Menschen vergleichbar (Hu et al., 2018; Subedi et al., 2015). Die Fähigkeit der HEK 293 Zelllinie zur posttranslationalen Modifikation bei der Proteinbiosynthese sind nicht als nachteilig anzusehen. Viel mehr sorgt diese Fähigkeit für eine besonders hohe Qualität der rekombinanten Proteine im Vergleich zur Proteinbiosynthese durch *E. coli* oder andere Prokaryoten (Berlec und Strukelj, 2013). Damit ist davon auszugehen, dass die synthetisierten SIGLEC Fc-Fusionsproteine durch die posttranslationalen Modifikationen vergleichbare Eigenschaften zu endogenen humanen Proteinen erhalten (Dumont et al., 2016; Liu et al., 2014). Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] das SIGLEC Fc-Fusionsprotein auf Grund des IL2-Signalpeptid in den Zellüberstand sezernieren können. Dafür wurde ein Western Blot mit dem Zellüberstand durchgeführt. Für die SIGLEC Fc-Fusionsproteine zeigten sich im Western Blot vom Zellüberstand vergleichbare Molekulargewichte wie im Western Blot vom Zelllysate. Dieses unterstützt die These, dass die Differenzen zum kalkulierten Molekulargewicht mit den posttranslationalen Modifikationen zu begründen sind.

Somit konnte durch den Western Blot nachgewiesen werden, dass die HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] die SIGLEC Fc-Fusionsproteine sowohl synthetisieren als auch in den Zellkulturüberstand sezernieren können. Dabei ist davon auszugehen, dass die synthetisierten SIGLEC Fc-Fusionsproteine auf Grund der posttranslationalen Modifikationen vergleichbare Eigenschaften wie *in vivo* aufweisen. In der Zusammenschau konnte damit erfolgreich ein Protokoll zur Biosynthese von SIGLEC Fc-Fusionsproteinen in HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] etabliert werden, bei dem die rekombinanten Proteine infolge der posttranslationalen Modifikation eine hohe Wertigkeit besitzen.

#### 4.1.3 Etablierung eines Protokolls zur Aufreinigung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine

Die Affinitätschromatografie ist in der Wissenschaft ein beliebtes Werkzeug für die Aufreinigung von Molekülen wie beispielsweise Proteinen oder Antikörpern aus komplexen Probenmischungen (Li, 2021; Hober et al., 2007). Unter den heutzutage verwendeten Verfahren zur Aufreinigung von Probenmischungen zählt die affinitätsbasierte Methode nicht nur zu den effektivsten Methoden sondern auch zu den vielfältigsten (Urh et al., 2009). Die Methodik basiert auf einer hochspezifischen, in der Regel reversiblen nicht-kovalenten Bindung zwischen zwei Molekülen (Kimple et al., 2013). Die aus der Probenmischung zu isolierende Zielstruktur, das sogenannte Zielmolekül, bildet die mobile Phase. Das zweite Moleküle ist an eine feste Matrix gebunden, die die stationäre Phase bildet (Urh et al., 2009). Für eine erfolgreiche Affinitätschromatografie, die sich durch einen hohen Reinheitsgrad bei möglichst großer Ausbeute auszeichnet, müssen Informationen über die Bindung von dem aufzureinigenden Zielmolekül zu dem Molekül der stationären Phase vorliegen. In dieser Dissertation wurde als Zielmolekül das humane IgG1-Fc2 Fragment gewählt, welches Bestandteil des pFuse-hlgG1-Fc2 Vektors [InvivoGen] ist. Als stationäre Phase wurde entsprechend der aktuellen Literatur Protein A ausgewählt (Grodzki und Berenstein, 2010). Mit Protein A als stationäre Phase und dem humanen IgG1-Fc2 Fragment des SIGLEC Fc-Fusionsprotein als mobile Phase konnten die SIGLEC Fc-Fusionsproteine aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt werden. Interessanterweise zeigte sich während der Elution bei der Aufreinigung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine einen Doppelpeak. Unter physiologischen Bedingungen ist beschrieben worden, dass SIGLEC Dimere und zum Teil sogar Tetramere ausbilden und damit mehrere Polysialinsäuren binden können (Rodrigues et al., 2020). Folglich kann der Doppelpeak während der Elution als Hinweis gewertet werden, dass die SIGLEC Fc-Fusionsproteine ebenfalls Dimere formen. Durch die Ausbildung von Dimeren gewinnen die synthetisierten SIGLEC Fc-Fusionsproteine an biologischer Aussagekraft. Abschließend wurde überprüft, ob mit dem Protokoll für die Affinitätschromatografie die SIGLEC Fc-Fusionsproteine in einer hohen Konzentration mit einem hohen Reinheitsgrad aus dem Überstand aufgereinigt werden konnten. Hierfür wurde eine erneute Affinitätschromatografie mit dem Durchfluss vom Ladeschritt und Waschschrift durchgeführt. Bei der erneuten HPLC wurde während der

Elution kein erneuter Anstieg für die UV-Absorption detektiert, sodass in der Probemischung keine Rückstände der SIGLEC Fc-Fusionsprotein vorhanden waren.

Zusammenfassend konnte in dieser Dissertation ein Protokoll für eine Affinitätschromatographie mittels HPLC etabliert werden, mit dem die SIGLEC Fc-Fusionsproteine von SIGLEC-3, SIGLEC-5, SIGLEC-10 und SIGLEC-11 mit einem hohen Reinheitsgrad bei einer gleichzeitig hohen Ausbeute aus dem Zellüberstand aufgereinigt werden konnten. Damit gelang es ein Protokoll für die Aufreinigung der SIGLEC Fc-Fusionsproteine aus komplexen Probemischungen zu etablieren.

#### 4.2 Analyse der Bindungsspezifität von SIGLEC-11 zu kurzkettiger Polysialinsäure

SIGLEC sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems und können anhand ihrer genetischen Sequenz in zwei Gruppen unterteilt werden (Bornhöfft et al., 2018). Die in dieser Dissertation untersuchten Rezeptoren SIGLEC-3, SIGLEC-5, SIGLEC-10 und SIGLEC-11 gehören zur Gruppe der CD-33 ähnlichen SIGLEC (Pillai et al., 2012; Duan und Paulson, 2020). Trotz ihrer hohen genetischen Homogenität unterscheiden sich die Rezeptoren im Expressionsmuster auf den im Blut zirkulierenden Immunzellen. Eine weitere Besonderheit bei SIGLEC-11 ist, dass dieser Rezeptor im Vergleich zu den anderen CD33-ähnlichen SIGLEC bevorzugt  $\alpha$ 2,8-verknüpfte Sialinsäure bindet. Bisher gibt es innerhalb der Gruppe der CD33-ähnlichen SIGLEC jedoch keine weiterführenden Informationen bezüglich der Bindungsspezifität von kurzkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11 (Angata, 2002; Varki, 2009b; Crocker et al., 2007). Daher wird in dieser Dissertation die Bindungsspezifität von kurzkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11 nähergehend analysiert. Wenn nicht anders beschrieben handelt es sich im folgenden Abschnitt 4.2 „Analyse der Bindungsspezifität von SIGLEC-11 zu kurzkettiger Polysialinsäure“ um  $\alpha$ 2,8-verknüpfte Polysialinsäure.

#### 4.2.1 Etablierung eines kompetitiven ELISA zur Analyse der Bindungsstärke

Durch die Arbeitsgruppe ist bereits beschrieben worden, dass kurzkettige Polysialinsäure nach Bindung an SIGLEC-11 einen anti-inflammatorischen Effekt auf Mikrogliazellen besitzt, ohne gleichzeitig die metabolische Aktivität der Zellen negativ zu beeinflussen (Liao et al., 2021; Liao et al., 2020; Shahraz et al., 2022). Damit stellt kurzkettige Polysialinsäure einen potenziellen Wirkstoffkandidat für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen dar (Lünemann et al., 2021). Für die Zulassung als Therapeutikum sind jedoch weitere Erkenntnisse über die Bindungsspezifität von kurzkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11 notwendig (Yan und Wang, 2012). Für die Bestimmung der Bindungsspezifität von kurzkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11 wurde deren Bindungsstärke in Relation zur Bindungsstärke von kurzkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10, welche auf Grund ihrer hohen genetischen Homogenität ausgewählt wurden, gesetzt (Duan und Paulson, 2020). Zur Messung der Bindungsstärke wurde ein kompetitiver ELISA, der auf einer mit langkettiger Polysialinsäure beschichteten Mikrotiterplatte basierte, etabliert. Zur Etablierung des kompetitiven ELISA musste im Antigen-ELISA zuerst eine Bindungsinteraktion zwischen langkettiger Polysialinsäure und den SIGLEC Fc-Fusionsproteinen nachgewiesen werden. Die SIGLEC Fc-Fusionsproteine sowohl von SIGLEC-11 als auch von SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 banden an langkettige Polysialinsäure. Für alle SIGLEC Fc-Fusionsproteine zeigte sich dabei ein konzentrationsabhängiges Bindungsverhalten zu langkettiger Polysialinsäure, sodass mit steigender Konzentration der SIGLEC Fc-Fusionsproteine eine Rezeptorsättigung erreicht wurde. Des Weiteren konnte mit Hilfe des Antigen-ELISA die Konzentrationen von den SIGLEC Fc Fusionsproteine ermittelt werden, mit denen eine ideale Signalintensität beim kompetitiven ELISA erreicht wurde. Für SIGLEC-3 lag die Konzentration bei 30 µg/ml und für SIGLEC-5, SIGLEC-10 sowie SIGLEC-11 bei 3 µg/ml.

Zusammenfassend konnte in dieser Dissertation nicht nur eine Bindungsinteraktion zwischen dem SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein und langkettiger Polysialinsäure nachgewiesen werden, sondern auch für die SIGLEC Fc-Fusionsproteine von SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10. Weiterführend konnte auf Grundlage von diesen Ergebnissen ein kompetitiver

ELISA zur Analyse der Bindungsstärke zwischen Polysialinsäure und den SIGLEC Fc-Fusionsproteinen etabliert werden.

#### 4.2.2 SIGLEC-11 bindet spezifisch an kurzkettige Polysialinsäure

Es ist bekannt, dass PolySia avDP20, welches ein  $\alpha$ 2,8-verknüpftes Homopolymer ist und zu den kurzkettigen Polysialinsäure gezählt wird, nach Bindung an SIGLEC-11 zu einer reduzierten inflammatorischen Antwort führt (Shahraz et al., 2022; Liao et al., 2021). So führte die Gabe von polySia avDP20 bei mit A $\beta$  inkubierten Mikrogliazellen zu einer reduzierten Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Shahraz et al., 2015). Eine Behandlung mit Sialinsäure sowohl als Monosaccharid als auch als Oligosaccharid zeigte hingegen keinen anti-inflammatorischen Effekt (Shahraz, 2016; Shahraz et al., 2022). Bereits im niedrigen einstelligen Mikrogrammbereich konnte für kurzkettige Polysialinsäure über die Aktivierung von SIGLEC-11 eine anti-inflammatorische Wirkung nachgewiesen werden (Shahraz et al., 2022; Shahraz et al., 2015). In dieser Dissertation konnte erfolgreich ein kompetitiver ELISA innerhalb des Labors etabliert werden, der bei diesen Konzentrationen eine Bindung zwischen Polysialinsäure unterschiedlicher Polymerisierungsgrade und SIGLEC detektiert. Die untersuchten Konzentrationen lagen bei kurzkettiger Polysialinsäure im Bereich zwischen 0,1  $\mu$ g/ml und 100  $\mu$ g/ml und bei langkettiger Polysialinsäure zwischen 1  $\mu$ g/ml und 1000  $\mu$ g/ml. Zur Bestimmung der Bindungsspezifität von kurzkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11 wurde die Bindungsstärke zu SIGLEC-11 mit der Bindungsstärke zu SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 verglichen. Für SIGLEC-11 ergab sich die höchste Bindungsstärke mit einer  $pI_{C_{50}}$  von 3,08. Die zweithöchste  $pI_{C_{50}}$  hatte SIGLEC-10 mit 6,471. Damit war die Bindungsstärke von SIGLEC-10 im Vergleich zu SIGLEC-11 um den Faktor 1.000 niedriger. Mit einer  $pI_{C_{50}}$  von 7,767 für SIGLEC-3 und von 9,272 für SIGLEC-5 war die Bindungsstärke von kurzkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11 ebenfalls niedriger. Damit bindet kurzkettige Polysialinsäure in  $\alpha$ 2,8-verknüpfter Konfiguration spezifisch an SIGLEC-11. Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 trotz ihrer hohen genetischen Homogenität zu SIGLEC-11 bevorzugt  $\alpha$ 2,3-verknüpfte und  $\alpha$ 2,6-verknüpfte



Sialinsäure binden (Brinkman-Van der Linden und Varki, 2000; Cornish et al., 1998; Munday et al., 2001; Freeman et al., 1995).

Zusammenfassend stellt kurzkettige  $\alpha$ 2,8-verknüpfte Polysialinsäure auf Grund seiner hohen Bindungsspezifität für SIGLEC-11 und seiner anti-inflammatorischen Wirkung sowie seines Expressionsmusters auf Mikrogliazellen einen vielversprechenden Wirkstoffkandidat für neurodegenerative Erkrankungen dar. Es ist jedoch zu beachten, dass kurzkettige Polysialinsäure nicht nur durch die Bindung an SIGLEC-11 über die Sialinsäure-SIGLEC Achse einen anti-inflammatorischen Effekt vermittelt. Shahraz et al. konnten zeigen, dass im Mikrogrammbereich dosierte kurzkettige Polysialinsäure ebenfalls durch die Aktivierung des alternativen Weg des Komplementsystem anti-inflammatorisch wirkt (Shahraz et al., 2022). In Zukunft ist zu untersuchen welche Auswirkungen sich daraus auf die maximale therapeutische Dosierung ergeben, damit keine weiteren Signalwege aktiviert werden, die zu unerwünschten Nebenwirkungen führen könnten. Nichtsdestotrotz, konnte ein kompetitiver ELISA, der die Bindungsstärke zwischen Polysialinsäure und SIGLEC im einstelligen Mikrogrammbereich misst, etabliert werden.

#### 4.2.3 Langkettige Polysialinsäure bindet unspezifisch an SIGLEC-11

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Rezeptoren SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 neben  $\alpha$ 2,6-verknüpfte und  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäure auch  $\alpha$ 2,8-verknüpfte Polysialinsäure binden (Brinkman-Van der Linden et al., 2003; Brinkman-Van der Linden und Varki, 2000). Im Vergleich mit SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 konnte für kurzkettige Polysialinsäure in einer  $\alpha$ 2,8-Konfiguration eine Bindungsspezifität zu SIGLEC-11 gezeigt werden. Die Bindungsstärke von Polysialinsäure höherer Polymerisierungsgrade zu SIGLEC ist bisher noch nicht weitergehend untersucht worden. Für eine Zulassung von Polysialinsäure als medikamentöse Therapie ist dieses jedoch von Interesse, weil langkettige Polysialinsäure im Gegensatz zur kurzkettigen Polysialinsäure nicht nur eine anti-inflammatorische Wirkung besitzt, sondern auch einen negativen Effekt auf die metabolische Zellaktivität hat (Shahraz, 2016). Folglich wurde in dieser Dissertation der kompetitive ELISA nicht

nur für kurzkettige Polysialinsäure durchgeführt, sondern ebenfalls für langkettige Polysialinsäure. Im Vergleich zu SIGLEC-3 mit einer  $pIC_{50}$  von 1,247 sowie für SIGLEC-10 mit einer  $pIC_{50}$  von 1,237 besitzt langkettige Polysialinsäure zu SIGLEC-11 mit einer  $pIC_{50}$  von 1,298 eine schwächere Bindungsstärke. Die geringste Bindungsstärke von langkettiger Polysialinsäure ergab sich zu SIGLEC-10 mit einer  $pIC_{50}$  von 1,664. In der Zusammenschau unterscheidet sich damit die Bindungsstärke von langkettiger Polysialinsäure zu den jeweiligen SIGLEC nicht wesentlich voneinander. Im Gegensatz zur kurzkettigen Polysialinsäure ergibt sich damit für langkettige Polysialinsäure keine Bindungsspezifität zu SIGLEC-11 in Relation zu SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10. Interessanterweise zeigt sich damit für  $\alpha$ 2,8-verknüpfte Polysialinsäure eine Bindung zu SIGLEC-11, die abhängig vom Polymerisierungsgrad der Polysialinsäure ist. Bisher war bekannt gewesen, dass Polysialinsäure mit einer definierten Konfiguration an verschiedene SIGLEC binden und ein SIGLEC unterschiedlich konfigurierte Polysialinsäuren als Liganden besitzen kann (Gonzalez-Gil und Schnaar, 2021; Brinkman-Van der Linden und Varki, 2000). In Zukunft sind noch weitere Untersuchungen über die Bindungsinteraktion zwischen SIGLEC und Polysialinsäure im dreidimensionalen Raum notwendig, um die Gründe für die Unterschiede bei der Bindungsspezifität zwischen kurzkettiger und langkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11 besser zu verstehen. Als Methoden zur Analyse des Bindungsverhalten bieten sich klassische Methoden wie Titration und Ko-Kultursysteme sowie neuere Methoden wie maschinelles Lernen an (Rube et al., 2022; Jarmoskaite et al., 2020; Rezaei et al., 2022).

Zusammenfassend konnten wir in dieser Dissertation zeigen, dass die Bindungsstärken von langkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11 sich nicht von der Bindungsstärke zu SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 unterscheidet. Damit bindet langkettige Polysialinsäure in  $\alpha$ 2,8-verknüpfter Konfiguration unspezifisch an SIGLEC-11. In Zusammenschau mit den Ergebnissen zur Bindungsspezifität von kurzkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11 konnte in dieser Dissertation die Erkenntnis gewonnen werden, dass die Bindungsspezifität von  $\alpha$ 2,8-verknüpfte Polysialinsäure zu SIGLEC-11 abhängig vom Polymerisierungsgrad der Polysialinsäure ist.

#### 4.2.4 Bindungsspezifität von Polysialinsäure zu SIGLEC-11 in Abhängigkeit des Polymerisierungsgrads von Polysialinsäure

Im kompetitiven ELISA zeigte sich für langkettige Polysialinsäure keine Bindungsspezifität zu SIGLEC-11 in Relation zu SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10. Jedoch konnte eine höhere Bindungsstärke für langkettige Polysialinsäure im Vergleich zur kurzkettigen Polysialinsäure gemessen werden. Die  $pIC_{50}$  von langkettiger Polysialinsäure lag für SIGLEC-11 bei 1,298. Damit ist die Bindungsstärke von langkettiger Polysialinsäure im Vergleich zur Bindungsstärke von kurzkettiger Polysialinsäure, bei der die  $pIC_{50}$  bei 3,08 lag, um den Faktor 100 stärker. Jedoch zeigte sich nicht nur für SIGLEC-11 eine höhere Bindungsstärke zu langkettiger Polysialinsäure, sondern auch für SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10. Die Bindungsstärke von langkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-10 war mit einer  $pIC_{50}$  von 1,664 im Vergleich zur Bindungsstärke von kurzkettiger Polysialinsäure mit einer  $pIC_{50}$  von 6,471 um den Faktor  $10^5$  stärker. Bei SIGLEC-3, der eine  $pIC_{50}$  von 7,767 für kurzkettige Polysialinsäure zeigte, sowie bei SIGLEC-5, dessen  $pIC_{50}$  für kurzkettige Polysialinsäure bei 9,272 lag, war die Bindungsstärke von langkettiger Polysialinsäure im Vergleich zur kurzkettigen Polysialinsäure nochmals um den Faktor  $10^6$  bzw. um den Faktor  $10^8$  stärker. Damit führte ein höherer Polymerisierungsgrad bei SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 im Vergleich zu SIGLEC-11 zu einer ausgeprägteren Steigerung der Bindungsstärke. Jedoch konnte nur für kurzkettige Polysialinsäure eine Bindungsspezifität zu SIGLEC-11 nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass ein höherer Polymerisierungsgrad einerseits mit einer höheren Bindungsstärke von Polysialinsäure zu SIGLEC einhergeht. Andererseits nimmt jedoch die Bindungsspezifität der Polysialinsäure zu SIGLEC-11 in Relation zu SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 mit steigendem Polymerisierungsgrad ab. Damit konnte gezeigt werden, dass Polysialinsäure durch eine Modifikation hin zu niedrigen Homopolymeren SIGLEC-11 spezifisch bindet. Diese Erkenntnisse sind für die weitere Erforschung von Polysialinsäure als Wirkstoffkandidat wichtig, weil bei der Evaluation eine hohe Bindungsspezifität von besonderem Interesse ist, um die Wahrscheinlichkeit von unerwünschten Nebenwirkungen zu reduzieren (Yan und Wang, 2012; Lee und Ma, 2007). Dementsprechend gilt es in Zukunft weitergehende Untersuchungen hinsichtlich der dreidimensionalen

Bindungsinteraktion durchzuführen, um ein besseres Verständnis des Einflusses vom Polymerisierungsgrad und von anderen chemischen Modifikationen auf die Bindungsstärke der Polysialinsäure zu SIGLEC-11 zu erhalten (Kairys et al., 2019; Monteiro et al., 2022). Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass durch Modifikationen des Polymerisierungsgrads von Polysialinsäure nicht nur die Bindungsspezifität verändert werden kann, sondern auch die Bindungscharakteristika. Eine Steigerung des Polymerisierungsgrads von  $\alpha$ 2,8-verknüpfter Polysialinsäure führte zu einer vergleichbaren Bindungsstärke von SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 wie bei SIGLEC-11. Im Gegensatz dazu ist in der Literatur bisher beschrieben, dass SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 bevorzugt  $\alpha$ 2,6-verknüpfte und  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäure binden (Crocker, 2005; Brinkman-Van der Linden und Varki, 2000).

#### 4.3 Limitationen bei der Untersuchung der Bindungsstärke

In dieser Dissertation konnten neue Erkenntnisse über die Bindungsspezifität von Polysialinsäure unterschiedlicher Polymerisierungsgrade zu SIGLEC-11 in Relation zu SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 gewonnen werden. Wenngleich diese Dissertation Limitationen aufweist, dienen diese Ergebnisse zur weiteren Evaluation von Polysialinsäure als potenziellen Wirkstoffkandidat zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen.

Als Limitation ist anzuführen, dass für die Klonierung der SIGLEC Fc-Fusionsplasmide nur die erste C2-Set Ig-Domäne der jeweiligen SIGLEC in den pFuse-hIgG1-Fc2-Vektor [InvivoGen] kloniert wurde. *In vivo* besteht der extrazelluläre Teil der SIGLEC jedoch aus mehreren hintereinander gereihten C2-Set Ig-Domänen, die auf die V-Set Ig-Domäne folgen. Diese C2-Set Ig-Domänen sind unter anderem für die Projektion der in der V-Set Ig-Domäne gelegenen Bindungsstelle in den extrazellulären Raum verantwortlich. Die Projektion in den extrazellulären Raum ist für die Funktionsfähigkeit der Rezeptoren von Bedeutung, weil es die Bindung von Polysialinsäure an SIGLEC ermöglicht (Duan und Paulson, 2020). Somit kann die reduzierte Anzahl von C2-Set Ig-Domänen Auswirkungen auf die Konfiguration der Bindungsstelle im dreidimensionalen Raum haben. Zum anderen kann die reduzierte Anzahl die Konfiguration von SIGLEC, die *in vivo* bevorzugt als Dimere bzw. als Tetramere vorliegen,

beeinflussen. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass ein Teil der synthetisierten SIGLEC Fc-Fusionsproteine wahrscheinlich als Dimere vorgelegen haben. Der Grund für diese Annahme ist, dass die SIGLEC Fc-Fusionsproteine während der Aufreinigung mittels HPLC in einem Doppelpeak, der bereits im Kapitel 4.1.3 diskutiert worden ist, eluierten. Das Vorhandensein der Dimere ist für die Analyse der Bindungseigenschaften zwischen Polysialinsäure und SIGLEC von Bedeutung, weil durch die gleichzeitige Bindung von mehreren Polysialinsäuren die Bindungseigenschaften beeinflusst werden (Rodrigues et al., 2020). Die gleichzeitige Bindung von mehreren Liganden wird als Avidität bezeichnet und hat eine stärkere biologische Aussagekraft als die reine Bindungsstärke, die nur die Bindung von einer löslichen Polysialinsäure an einen SIGLEC widerspiegelt. Die Ergebnisse des kompetitiven ELISA, der in dieser Dissertation zur Analyse der Bindungsspezifität von Polysialinsäure zu SIGLE-11 verwendet wurde, können eher als Annäherung an die Bindungsstärke angesehen werden. Ergänzend ist zu den Ergebnissen des kompetitiven ELISA anzumerken, dass sich für alle SIGLEC Fc-Fusionsproteine ein Sättigungseffekt gezeigt hatte. Dieses ist durch OD-Werte, die nicht im linearen Bereich der logarithmischen Skala für die Absorption lagen, zu erklären. Hierdurch wird die quantitative Aussagekraft teilweise eingeschränkt. Durch eine Verkürzung der Enzymaktivität hätte erreicht werden können, dass die OD-Werte im linearen Bereich geblieben wären. Andererseits hätte eine Verkürzung der Enzymaktivität jedoch dazu geführt, dass bei den verwendeten Konzentrationen der Polysialinsäure, die sich im Bereich des niedrigen einstelligen Mikrogrammbereich befanden, nicht reproduzierbare, objektive OD-Werten gemessen worden wären. Dieser niedrige Konzentrationsbereich von kurzkettiger Polysialinsäure ist jedoch von hoher Relevanz und hervorgehobenen Interesse, da die Arbeitsgruppe für diesen eine anti-inflammatorische Wirkung sowie einen neuroprotektiven Effekt nachweisen konnte (Karlstetter et al., 2017; Liao et al., 2021; Shahraz, 2016). Zusammenfassend ist damit in zukünftigen Untersuchungen nicht nur die Avidität zu untersuchen und das Fehlen der C2-Set Ig-Domänen bei den SIGLEC Fc-Fusionsproteinen zu adressieren, sondern auch die durch den Sättigungseffekt auftretenden Limitationen zu beachten. Für Letzteres könnte als potenzieller Lösungsansatz die Verwendung von sensitiveren Messmethoden, mit denen eine Verkürzung der Enzymaktivität bei gleichbleibender Datenqualität im niedrigen Mikrogrammbereich möglich wäre, in Erwägung gezogen werden.

*In vivo* wird die Bindungsspezifität von Polysialinsäure zu SIGLEC nicht nur durch die Projektion der Bindungsstelle in den extrazellulären Raum beeinflusst, sondern viel mehr handelt es sich dabei um ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren innerhalb der Glykokalyx (Bochner und Zimmermann, 2015; Honigfort et al., 2021). Wie gerade bereits beschrieben wurde mit dem kompetitiven ELISA primär die Bindungsstärke zwischen einem löslichen SIGLEC und einer löslichen Polysialinsäure gemessen, weswegen äußere Einflussfaktoren auf die Bindungsspezifität nicht berücksichtigt wurden. Von besonderem Interesse könnte zukünftig der Einfluss der strukturellen Zusammensetzung der Glykokalyx auf die Bindungseigenschaften sein, da cis-Interaktionen sowie trans-Interaktionen die Bindungsstärke von Polysialinsäure zu SIGLEC modulieren (Razi und Varki, 1998; Collins et al., 2006). In Zukunft ist dieses komplexe Zusammenspiel innerhalb der Glykokalyx durch weitere Experimente zu untersuchen. Nichtsdestotrotz geben die hier untersuchten Bindungsstärken sowie die daraus ermittelte Bindungsspezifität eine gute Annäherung über die Bindungseigenschaften von kurzkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11 (Deng et al., 2022; Eaton et al., 1995).

Des Weiteren ist aufzuführen, dass sich im Western Blot eine Differenz zwischen dem mittels der Software geneious [biomatters] kalkulierten Molekulargewicht und dem im Western Blot abzulesenden Molekulargewicht zeigte. Der Western Blot diente der Überprüfung, ob die HEK 293-F Zellen [ThermoFisher] die SIGLEC Fc-Fusionsproteine synthetisieren und anschließenden in den Zellüberstand sezernieren können. Der Grund für die Differenzen beim Molekulargewicht könnte wie bereits diskutiert in den posttranslationalen Modifikationen, die in humanen Zellen wie der HEK 293-F Zelllinie ein regelhaft stattfindender Prozess am Ende der Proteinbiosynthese sind, liegen (Zhong et al., 2023; Xu et al., 2018). Ein weiterer Grund für die stattgehabte posttranslationale Modifikation ist vermutliche Bildung von Dimeren, die durch den Doppelpeak bei der Aufreinigung während der Elution beobachtet werden konnten. Weiterführend ist anzumerken, dass die HEK 293-F Zelllinie hat ihren Ursprung im humanen Nierengewebe, wohingegen SIGLEC bevorzugt auf Immunzellen exprimiert werden (Graham et al., 1977; Pillai et al., 2012). Es ist davon auszugehen, dass sich die posttranslationale Modifikation in den beiden Zelltypen unterscheidet, wodurch die im kompetitiven ELISA untersuchte Bindungsstärke zwischen Polysialinsäure und SIGLEC beeinflusst sein

könnte (Dennis, 2017). Die posttranslationale Modifikation durch die HEK 293-F Zelllinie ist jedoch nicht als nachteilig anzusehen, sondern führt im Vergleich zur Proteinbiosynthese in Prokaryoten zu einer höheren Qualität der rekombinanten Proteine. Trotzdem gilt es in Zukunft den Effekt der vermutlichen Unterschiede bei den posttranslationalen Modifikationen auf die Bindungsstärke im kompetitiven ELISA zu untersuchen.

In dieser Dissertation wurden mit SIGLEC-3, SIGLEC-5, SIGLEC-10 und SIGLEC-11 nur ein Teil der CD-33 ähnlichen SIGLEC untersucht. Auf Grund der hohen genetischen Homogenität innerhalb dieser Gruppe ist es möglich, dass kurzkettige Polysialinsäure eine vergleichbare Bindungsspezifität zu anderen CD-33 ähnlichen SIGLEC wie zu SIGLEC-11 besitzt (Angata et al., 2004; Padler-Karavani et al., 2014). Dementsprechend muss in Zukunft auch für die anderen CD-33 ähnlichen SIGLEC die Bindungsspezifität mit Hilfe eines kompetitiven ELISA analysiert werden. Bei einer vergleichbaren Bindungsspezifität müsste die Bindungsstärke zwischen SIGLEC-11 und kurzkettiger Polysialinsäure gesteigert werden, um Nebenwirkungen durch unspezifische Bindungen zu minimieren und die therapeutische Wirkung durch eine gezielte Modulation der Immunreaktion zu steigern (Radhakrishnan und Tidor, 2007; Nussinov und Tsai, 2012; Kairys et al., 2019). Wie in dieser Dissertation gezeigt werden konnte, wäre dieses durch eine Modifikation des Polymerisierungsgrades möglich. Für die Entwicklung weiterer Modifikationen der Polysialinsäure, die die Bindungsspezifität zwischen kurzkettiger Polysialinsäure und SIGLEC-11 verbessern, wären Informationen über die Bindungsinteraktion im dreidimensionalen Raum notwendig. Daher sollte in Zukunft die Bindungsinteraktion im dreidimensionalen Raum durch weiterführende Untersuchungen wie computergestützte Simulationen untersucht werden (Rezaei et al., 2022; Rube et al., 2022).

Die hier aufgeführten Limitationen schränken nicht die Aussagekraft der in dieser Dissertation gewonnen wissenschaftlichen Erkenntnis ein. Viel mehr unterstreichen diese die Notwendigkeit der Fortführung der bisherigen Forschung, um das Potential von kurzkettiger Polysialinsäure in der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen zu evaluieren. In diesem Zusammenhang ist anzuführen, dass es sich hier nur um *in vitro* Experimente handelt. Aus diesem Grund müssen diese Erkenntnisse um Daten aus *in vivo* Analysen ergänzt werden. In den vergangenen Jahren wurden hierfür erfolgreich Mausmodelle etabliert, die bereits

erste *in vivo* Erkenntnisse brachten (Lünemann et al., 2021). Das Zusammenführen dieser Ergebnisse könnte zukünftig helfen kurzkettige Polysialinsäure von der präklinischen in die klinische Forschung zu überführen.

#### 4.4 Ausblick: Kurzkettige Polysialinsäure - Ein Medikament für neurodegenerative Erkrankungen?

In den kommenden Jahren wird das durchschnittliche Lebensalter der Weltbevölkerung infolge des demographischen Wandels weiter zunehmen. Ein höheres Lebensalter geht mit einer chronischen, sterilen Entzündung, auch als Inflammaging bezeichnet, einher (Franceschi und Campisi, 2014; Franceschi et al., 2018b). Damit werden altersbedingte Krankheiten, deren Pathogenese häufig auf ein übersteuertes Immunsystem zurückzuführen sind, in der medizinischen Versorgung an Bedeutung gewinnen. Zu den bekannten altersbedingten Erkrankungen gehören beispielsweise Diabetes Mellitus, Frailty, Tumore oder kardiovaskuläre Krankheiten, aber auch neurodegenerative Krankheiten zählen dazu (Ferrucci und Fabbri, 2018; Zuo et al., 2019; Prattichizzo et al., 2016). Bei den neurodegenerativen Erkrankungen des ZNS zeigen aktuelle Daten, dass neben einer erhöhten Grundaktivität von Mikrogliazellen auch Veränderungen innerhalb der Sialinsäure-SIGLEC Achse, die eine Modulation der Immunaktivität zur Folge haben, eine Rolle bei der Pathogenese spielen (Klaus et al., 2020; Linnartz et al., 2010; Lünemann et al., 2021). In den vergangenen Jahren hat sich vor allem  $\alpha$ 2,8-verknüpfte kurzkettige Polysialinsäure, die ein Ligand von SIGLEC-11 ist, als potenzieller Wirkstoffkandidat im Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen herauskristallisiert (Lünemann et al., 2021). So wird  $\alpha$ 2,8-verknüpfte Sialinsäure vornehmlich in der Glykokalyx des ZNS und auf Mikrogliazellen exprimiert (Rutishauser, 2008; Yabe et al., 2003; Curreli et al., 2007). Dabei besitzt kurzkettige Polysialinsäure nicht nur über die Sialinsäure-SIGLEC Achse eine anti-inflammatorische Wirkung, sondern auch durch Properdin, einem Regulator des alternativen Wegs des Komplementsystems (Shahraz et al., 2015; Shahraz et al., 2022). Auch die biologischen Eigenschaften von SIGLEC-11, das insbesondere am Anfang einer Immunantwort eine wichtige regulatorische Rolle einnimmt, sind für das Potenzial als therapeutischer Ansatzpunkt bedeutend (Cao et al., 2009; Crocker et al., 2007; Varki, 2009a; Carlin et al., 2009). So wird SIGLEC-11 vornehmlich auf Gewebsmakrophagen wie



Mikrogliazellen exprimiert (Angata et al., 2002). Aber nicht nur das Expressionsmuster von SIGLEC-11 ist hervorzuheben, sondern auch das Bindungsverhalten zu Sialinsäure (Hanashima et al., 2013; Padler-Karavani et al., 2014; Lehmann et al., 2012). So bindet SIGLEC-11 bevorzugt  $\alpha$ 2,8-verknüpfte Sialinsäure (Angata et al., 2002; Hayakawa et al., 2005). Damit ergänzt SIGLEC-11 das therapeutische Potenzial von kurzkettiger Polysialinsäure optimal (Angata, 2002; Crocker und Varki, 2001a; Crocker und Varki, 2001b).

Bei der Entwicklung von neuen medikamentösen Therapien ist auch die Analyse der Bindungsspezifität zum Bindungspartner von übergeordnetem Interesse. Daher war das Ziel dieser Dissertation die weitergehende Charakterisierung der Bindungsspezifität von kurzkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-11. Zum einen verringert eine hohe Bindungsspezifität die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen infolge von unspezifischen Bindungen (Kairys et al., 2019). Zum anderen sorgt eine hohe Bindungsspezifität des Medikaments zum Liganden für eine verbesserte therapeutische Effektivität (Radhakrishnan und Tidor, 2007). Die Untersuchung der Bindungsspezifität von Polysialinsäure zu SIGLEC erfolgte durch einen kompetitiven ELISA. Zwischen kurzkettiger Polysialinsäure und SIGLEC-11 zeigte sich im Vergleich zu SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 eine Bindungsspezifität zu Gunsten von SIGLEC-11. Weil langkettige Polysialinsäure ebenfalls einen anti-inflammatorischen Effekt besitzt, wurde zusätzlich die Bindungsstärke von langkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC untersucht. Einschränkend ist jedoch zu erwähnen, dass langkettige Polysialinsäure einen negativen Einfluss auf die metabolische Aktivität einer Zelle besitzt (Shahraz, 2016). Im Vergleich zu kurzkettiger Polysialinsäure zeigte sich für langkettige Polysialinsäure eine um den Faktor 100 stärkere Bindungsstärke zu SIGLEC-11. Die Bindungsstärken von langkettiger Polysialinsäure zu SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 waren im Vergleich zur kurzkettigen Polysialinsäure sogar bis um den Faktor  $10^8$  stärker. Jedoch ergab sich für langkettige Polysialinsäure keine Bindungsspezifität zu SIGLEC-11. Damit eignet sich kurzkettige Polysialinsäure auf Grund seiner spezifischen Bindung zu SIGLEC-11 als potenzieller Wirkstoffkandidat im Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen.

Zusammenfassend sind diese Ergebnisse wichtige Erkenntnisse für eine zukünftige Zulassung von Polysialinsäure als Wirkstoffkandidat und zur Verbesserung der therapeutischen Wirksamkeit. In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Modifikation des Polymerisierungsgrad hin zu niedrigen Homopolymeren die Bindungsspezifität von Polysialinsäure zu SIGLEC-11 steigert, sodass für kurzkettige Polysialinsäure eine spezifische Bindung an SIGLEC-11 gezeigt werden konnte. Für die weitere Medikamentenentwicklung von kurzkettiger Polysialinsäure werden nicht nur weitere Erkenntnisse über den Einfluss des Polymerisierungsgrads auf die Bindungsspezifität von Polysialinsäure zu SIGLEC-11 von Interesse sein, sondern auch von anderen Faktoren wie die Interaktionen mit der Glykokalyx (Razi und Varki, 1998; Collins et al., 2006). Hinsichtlich des kompetitiven ELISA, der die Bindung von einer löslichen Polysialinsäure mit einem löslichen SIGLEC untersucht, ist zu erwähnen, dass dieser am ehesten die Bindungsstärke abbildet. Unter physiologischen Bedingungen liegt SIGLEC jedoch bevorzugt als Dimere vor, weshalb in Zukunft ebenfalls die Avidität von SIGLEC-11, welche nähere Auskunft über das biologische Bindungsverhalten gibt, untersucht werden sollte. Des Weiteren sind in Hinblick auf die aufgeführten Limitationen und die zum Teil noch unklaren biologischen Prozesse weiterführende *in vitro* und *in vivo* Experimente notwendig, um die nachgeschalteten Signalwege besser zu verstehen und die Ergebnisse von ersten klinischen Studien zu interpretieren.

## 5. Zusammenfassung

Im Laufe der Evolution haben Säugetiere für Glykokonjugate mit Sialinsäure ein vielfältiges Repertoire an Immunrezeptoren entwickelt, wozu die in dieser Dissertation untersuchten SIGLEC, die mit Sialinsäure eine funktionelle Einheit bilden, gehören (Macauley et al., 2014; Varki, 2011b, 2017b; Liao et al., 2020). Als Teil der angeborenen Immunantwort begünstigt ein Ungleichgewicht der Sialinsäure-SIGLEC Achse das Auftreten von altersbedingten Erkrankungen (Lünemann et al., 2021; Crocker et al., 2007; Macauley et al., 2014; Murugesan et al., 2021; Serrano-López und Martín-Antonio, 2021; López-Otín et al., 2013). Innerhalb der Sialinsäure-SIGLEC Achse besitzt vor allem  $\alpha$ 2,8-verknüpfte kurzkettige Polysialinsäure eine neuroprotektive Wirkung, weil diese genauso wie der Bindungspartner SIGLEC-11 bevorzugt im ZNS exprimiert wird (Hayakawa et al., 2005). Dabei zeigt  $\alpha$ 2,8-verknüpfte kurzkettige Polysialinsäure nicht nur über SIGLEC-11, sondern auch über alternative Signalwege wie dem Komplementsystem einen anti-inflammatorischen Effekt (Liao et al., 2021; Shahrzad et al., 2015; Shahrzad et al., 2022). Damit stellt die Modulation der SIGLEC-vermittelten Immunantwort durch Gabe von Polysialinsäure einen innovativen therapeutischen Ansatzpunkt dar. Zur Evaluation von kurzkettiger Polysialinsäure als potenziellen Wirkstoffkandidat wurde die Bindungsspezifität zu SIGLEC-11 weitergehend analysiert. Hierfür wurde zuerst ein Protokoll zur Proteinbiosynthese von SIGLEC Fc-Fusionsproteinen und zur anschließenden Aufreinigung aus dem Zellkulturüberstand etabliert. Im nächsten Schritt gelang es anhand eines Antigen-ELISA zu zeigen, dass SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10 neben  $\alpha$ 2,3- und  $\alpha$ 2,6-verknüpfte Polysialinsäure auch an  $\alpha$ 2,8-verknüpfte Polysialinsäure binden. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen konnte ein kompetitiver ELISA etabliert werden. Hier zeigte sich für kurzkettige Polysialinsäure eine höhere Bindungsspezifität zu SIGLEC-11 in Relation zu SIGLEC-3, SIGLEC-5 und SIGLEC-10. Wenngleich für langkettige Polysialinsäure eine weit aus höhere Bindungsstärke zu SIGLEC-11 im Vergleich zu kurzkettiger Polysialinsäure gezeigt werden konnte, so ergab sich keine spezifische Bindung mehr für SIGLEC-11. In Zusammenschau unterstreichen die gewonnenen Daten das Potential von kurzkettiger Polysialinsäure als Wirkstoffkandidat. Gleichzeitig heben unsere Ergebnisse hervor, dass die

Veränderung des Polymerisierungsgrads von Polysialinsäure hin zu niedrigen Homopolymeren zu einer messbaren Verbesserung der Bindungsspezifität führt. Trotz der vielversprechenden Ergebnisse ist für einen zukünftigen therapeutischen Einsatz von Polysialinsäure festzuhalten, dass im Hinblick auf noch ausstehende Ergebnisse erster klinischer Studien und die teils noch unklaren Wirkmechanismen weitere experimentelle Untersuchungen notwendig sind. Bezugnehmend auf die Fragestellung dieser Dissertation kann abschließend gesagt werden, dass die Gabe von kurzkettiger Polysialinsäure zur Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen auf Grund der hohen Bindungsspezifität und des neuronalen Expressionsmusters von SIGLEC-11 ein vielversprechender Ansatzpunkt ist.

## 6. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung der Familie der humanen SIGLEC, welche aus 15 Rezeptoren besteht.....	20
<b>Abbildung 2:</b> Chemische Strukturformel von den drei häufigsten Formen der Sialinsäure in der Sesselkonfiguration.....	25
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung des klonierten SIGLEC Fc-Fusionsplasmids (A) und des SIGLEC Fc-Fusionsproteins (B).....	40
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung des Western Blots zum Nachweis der Biosynthese der SIGLEC Fc-Fusionsproteine und deren Sezernierung in den Zellüberstand. ....	50
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Darstellung des Ablaufs der HPLC zur Aufreinigung des SIGLEC Fc-Fusionsprotein aus dem Zellüberstand.....	55
<b>Abbildung 6:</b> Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des Antigen-ELISAs zur Analyse der Avidität zwischen langkettiger Polysialinsäure und den SIGLEC Fc-Fusionsproteinen. ....	58
<b>Abbildung 7:</b> Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des kompetitiven ELISAs zur Analyse der Bindungsstärke zwischen kurzkettiger Polysialinsäure und dem SIGLEC Fc-Fusionsprotein (A). Ebenfalls wurde die Bindungsstärke zwischen langkettiger Polysialinsäure und dem SIGLEC Fc-Fusionsprotein untersucht (B).....	61
<b>Abbildung 8:</b> Ergebnisse des Alignments für die klonierten SIGLEC Fc-Fusionsplasmide von SIGLEC-3 (A), SIGLEC-5 (B), SIGLEC-10 (C) und SIGLEC-11 (D).....	72
<b>Abbildung 9:</b> Zeitlicher Verlauf der gemessenen UV-Extinktion bei einer Wellenlänge von 205/280 nm für das Laden (A), Waschen (B) und die Elution (C) während der Aufreinigung vom SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein aus dem Zellkulturüberstand mittels HPLC. ....	77

- Abbildung 10:** Zeitlicher Verlauf der gemessenen UV-Extinktion bei einer Wellenlänge von 205/280 nm für das Laden (A), Waschen (B) und die Elution (C) während der Aufreinigung vom SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein aus dem Zellkulturüberstand mittels HPLC..... 79
- Abbildung 11:** Zeitlicher Verlauf der gemessenen UV-Extinktion bei einer Wellenlänge von 205/280 nm für das Laden (A), Waschen (B) und die Elution (C) während der Aufreinigung vom SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein aus dem Zellkulturüberstand mittels HPLC..... 80
- Abbildung 12:** Zeitlicher Verlauf der gemessenen UV-Extinktion bei einer Wellenlänge von 205/280 nm für das Laden (A), Waschen (B) und die Elution (C) während der Aufreinigung vom SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein aus dem Zellkulturüberstand mittels HPLC. .... 81
- Abbildung 13:** Graphische Darstellung der gemittelten OD-Werte mit der Standardabweichung in Abhängigkeit zur Konzentration des SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein beim Antigen-ELISA. .... 83
- Abbildung 14:** Graphische Darstellung der OD-Werte mit der Standardabweichung in Abhängigkeit zur Konzentration der SIGLEC Fc-Fusionsproteine von SIGLEC-3 (A), SIGLEC-5 (B) und SIGLEC-10 (C) ..... 86
- Abbildung 15:** Graphische Darstellung der OD-Werte mit der Standardabweichung in Abhängigkeit zum Logarithmus der Konzentration von kurzkettiger Polysialinsäure beim kompetitiven ELISA für das SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein..... 87
- Abbildung 16:** Graphische Darstellung der OD-Werte mit der Standardabweichung in Abhängigkeit zum Logarithmus der Konzentration von kurzkettiger Polysialinsäure beim kompetitiven ELISA für die SIGLEC Fc-Fusionsprotein von SIGLEC-3 (A), von SIGLEC-5 (B) und von SIGLEC-10 (C). ..... 90
- Abbildung 17:** Graphische Darstellung der OD-Werte mit der Standardabweichung in Abhängigkeit zum Logarithmus der Konzentration von langkettiger Polysialinsäure beim kompetitiven ELISA für das SIGLEC-11 Fc-Fusionsprotein..... 91

**Abbildung 18:** Graphische Darstellung der OD-Werte mit der Standardabweichung in Abhängigkeit zum Logarithmus der Konzentration von langkettiger Polysialinsäure beim kompetitiven ELISA für das SIGLEC-3 Fc-Fusionsprotein (A), für das SIGLEC-5 Fc-Fusionsprotein (B) und für das SIGLEC-10 Fc-Fusionsprotein (C)..... 94

## 7. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Amplifikation des DNA-Abschnitts der jeweiligen SIGLEC zur Klonierung der SIGLEC Fc-Fusionsplasmide mittels PCR.....	40
<b>Tabelle 2:</b> Nukleotidsequenzen der jeweiligen Primer zur Amplifikation des DNA-Abschnitts der jeweiligen SIGLEC zur Klonierung der SIGLEC Fc-Fusionsplasmide mittels PCR.....	41
<b>Tabelle 3:</b> PCR-Programm zur Amplifikation des DNA-Abschnitts vom jeweiligen SIGLEC zur Klonierung der SIGLEC Fc-Fusionsplasmide.....	41
<b>Tabelle 4:</b> Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den Doppelverdau des pFuse-hlgG1-Fc1 Vektors [InvivoGen] mit <i>EcoRI</i> [ThermoFisher] und <i>BglII</i> [ThermoFisher].....	42
<b>Tabelle 5:</b> Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den Doppelverdau des Inserts, dem DNA-Abschnitts der jeweiligen SIGLEC, mit <i>EcoRI</i> [ThermoFisher] und <i>BglII</i> [ThermoFisher] .....	42
<b>Tabelle 6:</b> Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Ligation des verdauten pFuse-hlgG1-Fc1 Vektors [InvivoGen] mit dem verdauten Insert des jeweiligen SIGLEC zur Klonierung der SIGLEC Fc-Fusionsplasmide.....	43
<b>Tabelle 7:</b> Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den Doppelverdau des klonierten SIGLEC Fc-Fusionsplasmids mit <i>EcoRI</i> [ThermoFisher] und <i>BglII</i> [ThermoFisher] .....	45
<b>Tabelle 8:</b> Nukleotidsequenzen der jeweiligen Primer zur Amplifizierung des SIGLEC Fc-Fusionsprotein zur direkten Sequenzierung durch das Unternehmen Sequence Laboratories Göttingen GmbH .....	45
<b>Tabelle 9:</b> Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die direkte Sequenzierung der SIGLEC Fc-Fusionsplasmide durch das Unternehmen Sequence Laboratories Göttingen GmbH .....	46



<b>Tabelle 10:</b> HPLC-Programm zur Aufreinigung der synthetisierte SIGLEC Fc-Fusionsproteine aus dem Zellüberstand von transfizierten HEK 293-F Zellen von Proben mit einem Gesamtvolumen von kleiner 50 ml.....	54
<b>Tabelle 11:</b> HPLC-Programm zur Aufreinigung der synthetisierte SIGLEC Fc-Fusionsproteine aus dem Zellüberstand von transfizierten HEK 293-F Zellen von Proben mit einem Gesamtvolumen von größer 50 ml.....	54
<b>Tabelle 12:</b> Reaktionsansatz und Programmeinstellungen zum Auswerten des Antigen-ELISA mit Hilfe des Mikrotiterplattenleser Infinite F200 PRO [TECAN] .....	60
<b>Tabelle 13:</b> Reaktionsansatz und Programmeinstellungen zum Auswerten des kompetitiven ELISA mit Hilfe des Mikrotiterplattenleser Infinite F200 PRO [TECAN].....	62
<b>Tabelle 14:</b> Darstellung der Molekulargewichte der jeweiligen SIGLEC Fc-Fusionsproteine, die zum einem durch die Software geneious [biomatters] kalkuliert und zum anderen vom Western Blot abgelesen wurden .....	74
<b>Tabelle 15:</b> Darstellung der Dissoziationskonstante $K_D$ für SIGLEC-3, SIGLEC-5, SIGLEC-10 und SIGLEC-11 .....	85

## 8. Literaturverzeichnis

Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 41–53

Abeln M, Albers I, Peters-Bernard U, Fläxsig-Schulz K, Kats E, Kispert A, Tomlinson S, Gerardy-Schahn R, Münster-Kühnel A, Weinhold B. Sialic acid is a critical fetal defense against maternal complement attack. *J Clin Invest* 2019; 129: 422–436

Akkaya M, Barclay AN. How do pathogens drive the evolution of paired receptors? *Eur J Immunol* 2013; 43: 303–313

Alexander GC, Emerson S, Kesselheim AS. Evaluation of Aducanumab for Alzheimer Disease: Scientific Evidence and Regulatory Review Involving Efficacy, Safety, and Futility. *JAMA* 2021; 325: 1717–1718

Ali SR, Fong JJ, Carlin AF, Busch TD, Linden R, Angata T, Areschoug T, Parast M, Varki N, Murray J, Nizet V, Varki A. Siglec-5 and Siglec-14 are polymorphic paired receptors that modulate neutrophil and amnion signaling responses to group B *Streptococcus*. *J Exp Med* 2014; 211: 1231–1242

Altheide TK, Hayakawa T, Mikkelsen TS, Diaz S, Varki N, Varki A. System-wide genomic and biochemical comparisons of sialic acid biology among primates and rodents: Evidence for two modes of rapid evolution. *J Biol Chem* 2006; 281: 25689–25702

Angata T. I-type lectins. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 294–316

Angata T. Molecular diversity and evolution of the Siglec family of cell-surface lectins. *Mol Divers* 2006; 10: 555–566

Angata T. Possible Influences of Endogenous and Exogenous Ligands on the Evolution of Human Siglecs. *Front Immunol* 2018; 9: 2885

Angata T, Hayakawa T, Yamanaka M, Varki A, Nakamura M. Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates. *FASEB J* 2006; 20: 1964–1973

Angata T, Kerr SC, Greaves DR, Varki NM, Crocker PR, Varki A. Cloning and characterization of human Siglec-11. A recently evolved signaling molecule that can interact with SHP-1 and SHP-2 and is expressed by tissue macrophages, including brain microglia. *J Biol Chem* 2002; 277: 24466–24474

Angata T, Margulies EH, Green ED, Varki A. Large-scale sequencing of the CD33-related Siglec gene cluster in five mammalian species reveals rapid evolution by multiple mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 13251–13256

Angata T, Tabuchi Y, Nakamura K, Nakamura M. Siglec-15: an immune system Siglec conserved throughout vertebrate evolution. *Glycobiology* 2007; 17: 838–846

Angata T, Varki A. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev* 2002; 102: 439–469

Asher WB, Bren KL. Affinity purification of heme-tagged proteins. *Methods Mol Biol* 2014; 1177: 17–33

Azam S, Haque ME, Balakrishnan R, Kim I-S, Choi D-K. The Ageing Brain: Molecular and Cellular Basis of Neurodegeneration. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 683459

Bajaj T, Ramirez A, Wagner-Thelen H. Genetik der Alzheimer-Krankheit. *Med Genet* 2018; 30: 259–266

Barbé-Tuana F, Funchal G, Schmitz CRR, Maurmann RM, Bauer ME. The interplay between immunosenescence and age-related diseases. *Semin Immunopathol* 2020; 42: 545–557

- Bardor M, Nguyen DH, Diaz S, Varki A. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 4228–4237
- Barker CF, Billingham RE. *Immunologically Privileged Sites*: Elsevier, 1978: 1–54
- Baufeld C, O'Loughlin E, Calcagno N, Madore C, Butovsky O. Differential contribution of microglia and monocytes in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm (Vienna)* 2018; 125: 809–826
- Bellenguez C, Grenier-Boley B, Lambert J-C. Genetics of Alzheimer's disease: where we are, and where we are going. *Curr Opin Neurobiol* 2020; 61: 40–48
- Berlec A, Strukelj B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2013; 40: 257–274
- Blaum BS, Hannan JP, Herbert AP, Kavanagh D, Uhrin D, Stehle T. Structural basis for sialic acid-mediated self-recognition by complement factor H. *Nat Chem Biol* 2015; 11: 77–82
- Blixt O, Collins BE, van den Nieuwenhof IM, Crocker PR, Paulson JC. Sialoside specificity of the siglec family assessed using novel multivalent probes: identification of potent inhibitors of myelin-associated glycoprotein. *J Biol Chem* 2003; 278: 31007–31019
- Bochner BS, Zimmermann N. Role of siglecs and related glycan-binding proteins in immune responses and immunoregulation. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135: 598–608
- Bode K, Bujupi F, Link C, Hein T, Zimmermann S, Peiris D, Jaquet V, Lepenies B, Weyd H, Krammer PH. Dectin-1 Binding to Annexins on Apoptotic Cells Induces Peripheral Immune Tolerance via NADPH Oxidase-2. *Cell Rep* 2019; 29: 4435-4446.e9
- Bornhöfft KF, Goldammer T, Rebl A, Galuska SP. Siglecs: A journey through the evolution of sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins. *Dev Comp Immunol* 2018; 86: 219–231

Breimer ME, Holgersson J. The Structural Complexity and Animal Tissue Distribution of N-Glycolylneuraminic Acid (Neu5Gc)-Terminated Glycans. Implications for Their Immunogenicity in Clinical Xenografting. *Front Mol Biosci* 2019; 6: 57

Brinkman-Van der Linden EC, Varki A. New aspects of siglec binding specificities, including the significance of fucosylation and of the sialyl-Tn epitope. Sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins. *J Biol Chem* 2000; 275: 8625–8632

Brinkman-Van der Linden ECM, Angata T, Reynolds SA, Powell LD, Hedrick SM, Varki A. CD33/Siglec-3 binding specificity, expression pattern, and consequences of gene deletion in mice. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 4199–4206

Broccolini A, Mirabella M. Hereditary inclusion-body myopathies. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852: 644–650

Büll C, Nason R, Sun L, van Coillie J, Madriz Sørensen D, Moons SJ, Yang Z, Arbitman S, Fernandes SM, Furukawa S, McBride R, Nycholat CM, Adema GJ, Paulson JC, Schnaar RL, Boltje TJ, Clausen H, Narimatsu Y. Probing the binding specificities of human Siglecs by cell-based glycan arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021; 118: e2026102118

Butler CA, Thornton P, Brown GC. CD33M inhibits microglial phagocytosis, migration and proliferation, but the Alzheimer's disease-protective variant CD33m stimulates phagocytosis and proliferation, and inhibits adhesion. *J Neurochem* 2021; 158: 297–310

Cao H, Bono B de, Belov K, Wong ES, Trowsdale J, Barrow AD. Comparative genomics indicates the mammalian CD33rSiglec locus evolved by an ancient large-scale inverse duplication and suggests all Siglecs share a common ancestral region. *Immunogenetics* 2009; 61: 401–417

Carlin AF, Uchiyama S, Chang Y-C, Lewis AL, Nizet V, Varki A. Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. *Blood* 2009; 113: 3333–3336

- Chang Y-C, Nizet V. The interplay between Siglecs and sialylated pathogens. *Glycobiology* 2014; 24: 818–825
- Checkoway H, Lundin JI, Kelada SN. Neurodegenerative diseases. *IARC Sci Publ* 2011: 407–419
- Chen G-Y, Chen X, King S, Cavassani KA, Cheng J, Zheng X, Cao H, Yu H, Qu J, Fang D, Wu W, Bai X-F, Liu J-Q, Woodiga SA, Chen C, Sun L, Hogaboam CM, Kunkel SL, Zheng P, Liu Y. Amelioration of sepsis by inhibiting sialidase-mediated disruption of the CD24-SiglecG interaction. *Nat Biotechnol* 2011; 29: 428–435
- Chen JY, Cortes C, Ferreira VP. Properdin: A multifaceted molecule involved in inflammation and diseases. *Mol Immunol* 2018; 102: 58–72
- Chen X, Varki A. Advances in the biology and chemistry of sialic acids. *ACS Chem Biol* 2010; 5: 163–176
- Chou HH, Takematsu H, Diaz S, Iber J, Nickerson E, Wright KL, Muchmore EA, Nelson DL, Warren ST, Varki A. A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 11751–11756
- Chou H-H, Hayakawa T, Diaz S, Krings M, Indriati E, Leakey M, Paabo S, Satta Y, Takahata N, Varki A. Inactivation of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase occurred prior to brain expansion during human evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 11736–11741
- Chung YC, Ko HW, Bok E, Park ES, Huh SH, Nam JH, Jin BK. The role of neuroinflammation on the pathogenesis of Parkinson's disease. *BMB Rep* 2010; 43: 225–232
- Cicolari S, Catapano AL, Magni P. Inflammaging and neurodegenerative diseases: Role of NLRP3 inflammasome activation in brain atherosclerotic vascular disease. *Mech Ageing Dev* 2021; 195: 111467

Claude J, Linnartz-Gerlach B, Kudin AP, Kunz WS, Neumann H. Microglial CD33-related Siglec-E inhibits neurotoxicity by preventing the phagocytosis-associated oxidative burst. *J Neurosci* 2013; 33: 18270–18276

Collins BE, Blixt O, Han S, Duong B, Li H, Nathan JK, Bovin N, Paulson JC. High-affinity ligand probes of CD22 overcome the threshold set by cis ligands to allow for binding, endocytosis, and killing of B cells. *J Immunol* 2006; 177: 2994–3003

Comi G, Bar-Or A, Lassmann H, Uccelli A, Hartung H-P, Montalban X, Sørensen PS, Hohlfeld R, Hauser SL. Role of B Cells in Multiple Sclerosis and Related Disorders. *Ann Neurol* 2021; 89: 13–23

Cornish AL, Freeman S, Forbes G, Ni J, Zhang M, Cepeda M, Gentz R, Augustus M, Carter KC, Crocker PR. Characterization of siglec-5, a novel glycoprotein expressed on myeloid cells related to CD33. *Blood* 1998; 92: 2123–2132

Cova I, Markova A, Campini I, Grande G, Mariani C, Pomati S. Worldwide trends in the prevalence of dementia. *J Neurol Sci* 2017; 379: 259–260

Crocker PR. Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling. *Curr Opin Struct Biol* 2002; 12: 609–615

Crocker PR. Siglecs in innate immunity. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5: 431–437

Crocker PR, Clark EA, Filbin M, Gordon S, Jones Y, Kehrl JH, Kelm S, Le Douarin N, Powell L, Roder J, Schnaar RL, SgROI DC, Stamenkovic K, Schauer R, Schachner M, van den Berg TK, van der Merwe PA, Watt SM, Varki A. Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins. *Glycobiology* 1998; 8: v

Crocker PR, Gordon S. Properties and distribution of a lectin-like hemagglutinin differentially expressed by murine stromal tissue macrophages. *J Exp Med* 1986; 164: 1862–1875

Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 255–266

Crocker PR, Varki A. Siglecs in the immune system. *Immunology* 2001a; 103: 137–145

Crocker PR, Varki A. Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends Immunol* 2001b; 22: 337–342

Culig L, Chu X, Bohr VA. Neurogenesis in aging and age-related neurodegenerative diseases. *Ageing Res Rev* 2022; 78: 101636

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

Daëron M, Jaeger S, Du Pasquier L, Vivier E. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunol Rev* 2008; 224: 11–43

Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol* 2012; 72: 648–672

Davalos D, Ryu JK, Merlini M, Baeten KM, Le Moan N, Petersen MA, Deerinck TJ, Smirnov DS, Bedard C, Hakozaki H, Gonias Murray S, Ling JB, Lassmann H, Degen JL, Ellisman MH, Akassoglou K. Fibrinogen-induced perivascular microglial clustering is required for the development of axonal damage in neuroinflammation. *Nat Commun* 2012; 3: 1227

Deng L, Chen X, Varki A. Exploration of sialic acid diversity and biology using sialoglycan microarrays. *Biopolymers* 2013; 99: 650–665

Deng Y, Efremov AK, Yan J. Modulating binding affinity, specificity, and configurations by multivalent interactions. *Biophys J* 2022; 121: 1868–1880

Dennis JW. Genetic code asymmetry supports diversity through experimentation with post-translational modifications. *Curr Opin Chem Biol* 2017; 41: 1–11



Deuschl G, Beghi E, Fazekas F, Varga T, Christoforidi KA, Sipido E, Bassetti CL, Vos T, Feigin VL. The burden of neurological diseases in Europe: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Public Health* 2020; 5: e551-e567

Duan S, Paulson JC. Siglecs as Immune Cell Checkpoints in Disease. *Annu Rev Immunol* 2020; 38: 365–395

Dugger BN, Dickson DW. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017; 9

Dumont J, Ewart D, Mei B, Estes S, Kshirsagar R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol* 2016; 36: 1110–1122

Eaton BE, Gold L, Zichi DA. Let's get specific: the relationship between specificity and affinity. *Chem Biol* 1995; 2: 633–638

El Maarouf A, Petridis AK, Rutishauser U. Use of polysialic acid in repair of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 16989–16994

Engelhardt B, Coisne C. Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids Barriers CNS* 2011; 8: 4

Eskandari-Sedighi G, Jung J, Macauley MS. CD33 isoforms in microglia and Alzheimer's disease: Friend and foe. *Mol Aspects Med* 2023; 90: 101111

Ferrucci L, Fabbri E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol* 2018; 15: 505–522

Formosa-Dague C, Castelain M, Martin-Yken H, Dunker K, Dague E, Sletmoen M. The Role of Glycans in Bacterial Adhesion to Mucosal Surfaces: How Can Single-Molecule Techniques Advance Our Understanding? *Microorganisms* 2018; 6

Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014; 69 Suppl 1: S4-9

Franceschi C, Garagnani P, Morsiani C, Conte M, Santoro A, Grignolio A, Monti D, Capri M, Salvioli S. The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates. *Front Med (Lausanne)* 2018a; 5: 61

Franceschi C, Garagnani P, Parini P, Giuliani C, Santoro A. Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol* 2018b; 14: 576–590

Freeman SD, Kelm S, Barber EK, Crocker PR. Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules. *Blood* 1995; 85: 2005–2012

Gagneux P, Aebi M, Varki A. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY) 2015

Gaikwad S, Larionov S, Wang Y, Dannenberg H, Matozaki T, Monsonego A, Thal DR, Neumann H. Signal regulatory protein-beta1: a microglial modulator of phagocytosis in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 2009; 175: 2528–2539

Giancchetti E, Arena A, Fierabracci A. Sialic Acid-Siglec Axis in Human Immune Regulation, Involvement in Autoimmunity and Cancer and Potential Therapeutic Treatments. *Int J Mol Sci* 2021; 22

Gilbert-Juan J, Varea E, Guirado R, Blasco-Ibáñez JM, Crespo C, Nacher J. Alterations in the expression of PSA-NCAM and synaptic proteins in the dorsolateral prefrontal cortex of psychiatric disorder patients. *Neurosci Lett* 2012; 530: 97–102

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 2010; 330: 841–845

Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 2010; 140: 918–934

Gloor SM, Wachtel M, Bolliger MF, Ishihara H, Landmann R, Frei K. Molecular and cellular permeability control at the blood–brain barrier. *Brain Res Rev* 2001; 36: 258–264

Golde TE, Miller VM. Proteinopathy-induced neuronal senescence: a hypothesis for brain failure in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *Alzheimers Res Ther* 2009; 1: 5

Gonzalez-Gil A, Schnaar RL. Siglec Ligands. *Cells* 2021; 10

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36: 59–74

Gretenkort L, Thiesler H, Hildebrandt H. Neuroimmunomodulatory properties of polysialic acid. *Glycoconj J* 2023; 40: 277–294

Grodzki AC, Berenstein E. Antibody Purification: Affinity Chromatography – Protein A and Protein G Sepharose. *Methods Mol Biol* 2010: 33–41

Guerrero F, Ciragan A, Iwai H. Tandem SUMO fusion vectors for improving soluble protein expression and purification. *Protein Expr Purif* 2015; 116: 42–49

Hanashima S, Sato C, Tanaka H, Takahashi T, Kitajima K, Yamaguchi Y. NMR study into the mechanism of recognition of the degree of polymerization by oligo/polysialic acid antibodies. *Bioorg Med Chem* 2013; 21: 6069–6076

Hane M, Chen DY, Varki A. Human-specific microglial Siglec-11 transcript variant has the potential to affect polysialic acid-mediated brain functions at a distance. *Glycobiology* 2021; 31: 231–242

Harduin-Lepers A, Mollicone R, Delannoy P, Oriol R. The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach. *Glycobiology* 2005; 15: 805–817

Hartnell A, Steel J, Turley H, Jones M, Jackson DG, Crocker PR. Characterization of human sialoadhesin, a sialic acid binding receptor expressed by resident and inflammatory macrophage populations. *Blood* 2001; 97: 288–296

Hayakawa T, Angata T, Lewis AL, Mikkelsen TS, Varki NM, Varki A. A human-specific gene in microglia. *Science* 2005; 309: 1693

Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, Herrup K, Frautschy SA, Finsen B, Brown GC, Verkhratsky A, Yamanaka K, Koistinaho J, Latz E, Halle A, Petzold GC, Town T, Morgan D, Shinohara ML, Perry VH, Holmes C, Bazan NG, Brooks DJ, Hunot S, Joseph B, Deigendesch N, Garaschuk O, Boddeke E, Dinarello CA, Breitner JC, Cole GM, Golenbock DT, Kummer MP. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2015; 14: 388–405

Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, El Khoury J. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci* 2018; 21: 1359–1369

Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi TK, Borowsky ML, Wang L, Means TK, El Khoury J. The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat Neurosci* 2013; 16: 1896–1905

Higa HH, Butor C, Diaz S, Varki A. O-acetylation and de-O-acetylation of sialic acids. *J Biol Chem* 1989; 264: 19427–19434

Hildebrandt H, Mühlenhoff M, Weinhold B, Gerardy-Schahn R. Dissecting polysialic acid and NCAM functions in brain development. *J Neurochem* 2007; 103 Suppl 1: 56–64

Hober S, Nord K, Linhult M. Protein A chromatography for antibody purification. *J Chromatogr B* 2007; 848: 40–47

Hoekstra H, Romero Pastrana F, Bonarius HPJ, van Kessel KPM, Elsinga GS, Kooi N, Groen H, van Dijk JM, Buist G. A human monoclonal antibody that specifically binds and inhibits the staphylococcal complement inhibitor protein SCIN. *Virulence* 2018; 9: 70–82

Honigfort DJ, Altman MO, Gagneux P, Godula K. Glycocalyx crowding with mucin mimetics strengthens binding of soluble and virus-associated lectins to host cell glycan receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021; 118: e2107896118

Horvat A, Schwaiger F-W, Hager G, Bröcker F, Streif R, Knyazev PG, Ullrich A, Kreutzberg GW. A Novel Role for Protein Tyrosine Phosphatase SHP1 in Controlling Glial Activation in the Normal and Injured Nervous System. *J Neurosci* 2001; 21: 865–874

Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, Bohr VA. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 2019; 15: 565–581

Hu J, Han J, Li H, Zhang X, Liu LL, Chen F, Zeng B. Human Embryonic Kidney 293 Cells: A Vehicle for Biopharmaceutical Manufacturing, Structural Biology, and Electrophysiology. *CTO* 2018; 205: 1–8

Hyvärinen S, Meri S, Jokiranta TS. Disturbed sialic acid recognition on endothelial cells and platelets in complement attack causes atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2016; 127: 2701–2710

Inoue S, Kitajima K, Inoue Y. Identification of 2-keto-3-deoxy-D-glycero--galactononic acid (KDN, deaminoneuraminic acid) residues in mammalian tissues and human lung carcinoma cells. Chemical evidence of the occurrence of KDN glycoconjugates in mammals. *J Biol Chem* 1996; 271: 24341–24344

Isomura R, Kitajima K, Sato C. Structural and functional impairments of polysialic acid by a mutated polysialyltransferase found in schizophrenia. *J Biol Chem* 2011; 286: 21535–21545

Janas T, Janas T. Membrane oligo- and polysialic acids. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1808: 2923–2932

Jandus C, Simon H-U, Gunten S von. Targeting siglecs--a novel pharmacological strategy for immuno- and glycotherapy. *Biochem Pharmacol* 2011; 82: 323–332

- Jarmoskaite I, Alsadhan I, Vaidyanathan PP, Herschlag D. How to measure and evaluate binding affinities. *Elife* 2020; 9
- Jellinger KA. Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *J Cell Mol Med* 2010; 14: 457–487
- Jellusova J, Düber S, Gückel E, Binder CJ, Weiss S, Voll R, Nitschke L. Siglec-G regulates B1 cell survival and selection. *J Immunol* 2010; 185: 3277–3284
- Kairys V, Baranauskiene L, Kazlauskiene M, Matulis D, Kazlauskas E. Binding affinity in drug design: experimental and computational techniques. *Expert Opin Drug Discov* 2019; 14: 755–768
- Kanato Y, Kitajima K, Sato C. Direct binding of polysialic acid to a brain-derived neurotrophic factor depends on the degree of polymerization. *Glycobiology* 2008; 18: 1044–1053
- Karlstetter M, Kopatz J, Aslanidis A, Shahraz A, Caramoy A, Linnartz-Gerlach B, Lin Y, Lückoff A, Fauser S, Düker K, Claude J, Wang Y, Ackermann J, Schmidt T, Hornung V, Skerka C, Langmann T, Neumann H. Polysialic acid blocks mononuclear phagocyte reactivity, inhibits complement activation, and protects from vascular damage in the retina. *EMBO Mol Med* 2017; 9: 154–166
- Kelm S, Schauer R. Sialic Acids in Molecular and Cellular Interactions. *Int Rev Cytol* 1977; 175: 137–240
- Kempuraj D, Thangavel R, Natteru PA, Selvakumar GP, Saeed D, Zahoor H, Zaheer S, Iyer SS, Zaheer A. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Spine* 2016; 1
- Keppler OT, Hinderlich S, Langner J, Schwartz-Albiez R, Reutter W, Pawlita M. UDP-GlcNAc 2-epimerase: a regulator of cell surface sialylation. *Science* 1999; 284: 1372–1376

Khan A, Sergi C. Sialidosis: A Review of Morphology and Molecular Biology of a Rare Pediatric Disorder. *Diagnostics (Basel)* 2018; 8

Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, Wieghofer P, Heinrich A, Riemke P, Hölscher C, Müller DN, Luckow B, Brocker T, Debowski K, Fritz G, Opdenakker G, Diefenbach A, Biber K, Heikenwalder M, Geissmann F, Rosenbauer F, Prinz M. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci* 2013; 16: 273–280

Kimple ME, Brill AL, Pasker RL. Overview of affinity tags for protein purification. *Curr Protoc Protein Sci* 2013; 73: 9.9.1-9.9.23

Klaus C, Hansen JN, Ginolhac A, Gérard D, Gnanapragassam VS, Horstkorte R, Rossdam C, Buettner FFR, Sauter T, Sinkkonen L, Neumann H, Linnartz-Gerlach B. Reduced sialylation triggers homeostatic synapse and neuronal loss in middle-aged mice. *Neurobiol Aging* 2020; 88: 91–107

Kontis V, Bennett JE, Mathers CD, Li G, Foreman K, Ezzati M. Future life expectancy in 35 industrialised countries: projections with a Bayesian model ensemble. *Lancet* 2017; 389: 1323–1335

Kosyreva AM, Sentyabreva AV, Tsvetkov IS, Makarova OV. Alzheimer's Disease and Inflammation. *Brain Sci* 2022; 12: 1237

Kouser L, Abdul-Aziz M, Nayak A, Stover CM, Sim RB, Kishore U. Properdin and factor h: opposing players on the alternative complement pathway "see-saw". *Front Immunol* 2013; 4: 93

Kouser L, Paudyal B, Kaur A, Stenbeck G, Jones LA, Abozaid SM, Stover CM, Flahaut E, Sim RB, Kishore U. Human Properdin Opsonizes Nanoparticles and Triggers a Potent Pro-inflammatory Response by Macrophages without Involving Complement Activation. *Front Immunol* 2018; 9: 131

Kuroki K, Furukawa A, Maenaka K. Molecular recognition of paired receptors in the immune system. *Front Microbiol* 2012; 3: 429

Läubli H, Nalle SC, Maslyar D. Targeting the Siglec-Sialic Acid Immune Axis in Cancer: Current and Future Approaches. *Cancer Immunol Res* 2022; 10: 1423–1432

Läubli H, Varki A. Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins (Siglecs) detect self-associated molecular patterns to regulate immune responses. *Cell Mol Life Sci* 2020; 77: 593–605

Lee J, Ma H. Specificity and selectivity evaluations of ligand binding assay of protein therapeutics against concomitant drugs and related endogenous proteins. *AAPS J* 2007; 9: E164-70

Lehmann F, Gäthje H, Kelm S, Dietz F. Evolution of sialic acid-binding proteins: molecular cloning and expression of fish siglec-4. *Glycobiology* 2004; 14: 959–968

Lehmann SM, Krüger C, Park B, Derkow K, Rosenberger K, Baumgart J, Trimbuch T, Eom G, Hinz M, Kaul D, Habbel P, Kälin R, Franzoni E, Rybak A, Nguyen D, Veh R, Ninnemann O, Peters O, Nitsch R, Heppner FL, Golenbock D, Schott E, Ploegh HL, Wulczyn FG, Lehnardt S. An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat Neurosci* 2012; 15: 827–835

Lenza MP, Atxabal U, Oyenarte I, Jiménez-Barbero J, Ereño-Orbea J. Current Status on Therapeutic Molecules Targeting Siglec Receptors. *Cells* 2020; 9

Lewcock JW, Schlepckow K, Di Paolo G, Tahirovic S, Monroe KM, Haass C. Emerging Microglia Biology Defines Novel Therapeutic Approaches for Alzheimer's Disease. *Neuron* 2020; 108: 801–821

Li Y. Immunoglobulin-binding protein-based affinity chromatography in bispecific antibody purification: Functions beyond product capture. *Protein Expr Purif* 2021; 188: 105976



- Li Y, Chen X. Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 94: 887–905
- Liao H, Klaus C, Neumann H. Control of Innate Immunity by Sialic Acids in the Nervous Tissue. *Int J Mol Sci* 2020
- Liao H, Winkler J, Wißfeld J, Shahraz A, Klaus C, Neumann H. Low molecular weight polysialic acid prevents lipopolysaccharide-induced inflammatory dopaminergic neurodegeneration in humanized SIGLEC11 transgenic mice. *Glia* 2021; 69: 2845–2862
- Lin Y-C, Boone M, Meuris L, Lemmens I, van Roy N, Soete A, Reumers J, Moisse M, Plaisance S, Drmanac R, Chen J, Speleman F, Lambrechts D, van de Peer Y, Tavernier J, Callewaert N. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun* 2014; 5: 4767
- Linnartz B, Kopatz J, Tenner AJ, Neumann H. Sialic acid on the neuronal glycoalyx prevents complement C1 binding and complement receptor-3-mediated removal by microglia. *J Neurosci* 2012; 32: 946–952
- Linnartz B, Wang Y, Neumann H. Microglial immunoreceptor tyrosine-based activation and inhibition motif signaling in neuroinflammation. *Int J Alzheimers Dis* 2010; 2010: 1–7
- Liow LH, van Valen L, Stenseth NC. Red Queen: from populations to taxa and communities. *Trends Ecol Evol* 2011; 26: 349–358
- Liu X, Ping H, Zhang C. Rapid establishment of a HEK 293 cell line expressing FVIII-BDD using AAV site-specific integration plasmids. *BMC Res Notes* 2014; 7: 626
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* 2013; 153: 1194–1217
- Lu RJ, Wang EK, Benayoun BA. Functional genomics of inflamm-aging and immunosenescence. *Brief Funct Genomics* 2022; 21: 43–55

- Lübbbers J, Rodríguez E, van Kooyk Y. Modulation of Immune Tolerance via Siglec-Sialic Acid Interactions. *Front Immunol* 2018; 9: 2807
- Lünemann JD, Gunten S von, Neumann H. Targeting sialylation to treat central nervous system diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2021; 42: 998–1008
- Macauley MS, Crocker PR, Paulson JC. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 653–666
- Mahajan VS, Pillai S. Sialic acids and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2016; 269: 145–161
- Malik M, Simpson JF, Parikh I, Wilfred BR, Fardo DW, Nelson PT, Estus S. CD33 Alzheimer's risk-altering polymorphism, CD33 expression, and exon 2 splicing. *J Neurosci* 2013; 33: 13320–13325
- Manzi AE, Higa HH, Diaz S, Varki A. Intramolecular self-cleavage of polysialic acid. *J Biol Chem* 1994; 269: 23617–23624
- Martinet L, Smyth MJ. Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nat Rev Immunol* 2015; 15: 243–254
- McAuley EZ, Scimone A, Tiwari Y, Agahi G, Mowry BJ, Holliday EG, Donald JA, Weickert CS, Mitchell PB, Schofield PR, Fullerton JM. Identification of sialyltransferase 8B as a generalized susceptibility gene for psychotic and mood disorders on chromosome 15q25-26. *PLoS One* 2012; 7: e38172
- Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol* 2015; 6: 262
- Monteiro NRC, Oliveira JL, Arrais JP. DTITR: End-to-end drug-target binding affinity prediction with transformers. *Comput Biol Med* 2022; 147: 105772

- Muchmore EA, Diaz S, Varki A. A structural difference between the cell surfaces of humans and the great apes. *Am. J. Phys. Anthropol.* 1998; 107: 187–198
- Munday J, Kerr S, Ni J, Cornish AL, Zhang JQ, Nicoll G, Floyd H, Mattei M-G, Moore P, Liu D, Crocker PR. Identification, characterization and leucocyte expression of Siglec-10, a novel human sialic acid-binding receptor. *Biochem J* 2001; 355: 489–497
- Münster-Kühnel AK, Tiralongo J, Krapp S, Weinhold B, Ritz-Sedlacek V, Jacob U, Gerardy-Schahn R. Structure and function of vertebrate CMP-sialic acid synthetases. *Glycobiology* 2004; 14: 43R-51R
- Murugesan G, Weigle B, Crocker PR. Siglec and anti-Siglec therapies. *Curr Opin Chem Biol* 2021; 62: 34–42
- Nakata D, Close BE, Colley KJ, Matsuda T, Kitajima K. Molecular cloning and expression of the mouse N-acetylneuraminic acid 9-phosphate synthase which does not have deaminoneuraminic acid (KDN) 9-phosphate synthase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273: 642–648
- Nakata D, Troy FA. Degree of polymerization (DP) of polysialic acid (polySia) on neural cell adhesion molecules (N-CAMS): development and application of a new strategy to accurately determine the DP of polySia chains on N-CAMS. *J Biol Chem* 2005; 280: 38305–38316
- Neumann H, Kotter MR, Franklin RJM. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain* 2009; 132: 288–295
- Neumann H, Wekerle H. Brain microglia: watchdogs with pedigree. *Nat Neurosci* 2013; 16: 253–255
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 2005; 308: 1314–1318

- Niraula A, Sheridan JF, Godbout JP. Microglia Priming with Aging and Stress. *Neuropsychopharmacology* 2016; 42: 318–333
- Nitschke L. The role of CD22 and other inhibitory co-receptors in B-cell activation. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 290–297
- Nussinov R, Tsai C-J. The different ways through which specificity works in orthosteric and allosteric drugs. *Curr Pharm Des* 2012; 18: 1311–1316
- Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 2006; 126: 855–867
- O'Reilly MK, Paulson JC. Siglecs as targets for therapy in immune-cell-mediated disease. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30: 240–248
- Padler-Karavani V, Hurtado-Ziola N, Chang Y-C, Sonnenburg JL, Ronaghy A, Yu H, Verhagen A, Nizet V, Chen X, Varki N, Varki A, Angata T. Rapid evolution of binding specificities and expression patterns of inhibitory CD33-related Siglecs in primates. *FASEB J* 2014; 28: 1280–1293
- Padler-Karavani V, Yu H, Cao H, Chokhawala H, Karp F, Varki N, Chen X, Varki A. Diversity in specificity, abundance, and composition of anti-Neu5Gc antibodies in normal humans: potential implications for disease. *Glycobiology* 2008; 18: 818–830
- Papastefanaki F, Chen J, Lavdas AA, Thomaidou D, Schachner M, Matsas R. Grafts of Schwann cells engineered to express PSA-NCAM promote functional recovery after spinal cord injury. *Brain* 2007; 130: 2159–2174
- Paulson JC, Macauley MS, Kawasaki N. Siglecs as sensors of self in innate and adaptive immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1253: 37–48
- Pedersen DV, Gadeberg TAF, Thomas C, Wang Y, Joram N, Jensen RK, Mazarakis SMM, Revel M, El Sissy C, Petersen SV, Lindorff-Larsen K, Thiel S, Laursen NS, Fremeaux-Bacchi

- V, Andersen GR. Structural Basis for Properdin Oligomerization and Convertase Stimulation in the Human Complement System. *Front Immunol* 2019; 10: 2007
- Pillai S, Netravali IA, Cariappa A, Mattoo H. Siglecs and immune regulation. *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 357–392
- Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, Schrag A-E, Lang AE. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 3: 17013
- Prattichizzo F, Nigris V de, La Sala L, Procopio AD, Olivieri F, Ceriello A. "Inflammaging" as a Druggable Target: A Senescence-Associated Secretory Phenotype-Centered View of Type 2 Diabetes. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 1810327
- Puigdellívol M, Allendorf DH, Brown GC. Sialylation and Galectin-3 in Microglia-Mediated Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci* 2020; 14: 162
- Radhakrishnan ML, Tidor B. Specificity in molecular design: a physical framework for probing the determinants of binding specificity and promiscuity in a biological environment. *J Phys Chem B* 2007; 111: 13419–13435
- Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 623–635
- Ravetch JV, Lanier LL. Immune inhibitory receptors. *Science* 2000; 290: 84–89
- Rawal P, Zhao L. Sialometabolism in Brain Health and Alzheimer's Disease. *Front Neurosci* 2021; 15: 648617
- Razi N, Varki A. Masking and unmasking of the sialic acid-binding lectin activity of CD22 (Siglec-2) on B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 7469–7474
- Razi N, Varki A. Cryptic sialic acid binding lectins on human blood leukocytes can be unmasked by sialidase treatment or cellular activation. *Glycobiology* 1999; 9: 1225–1234

Rezaei MA, Li Y, Wu D, Li X, Li C. Deep Learning in Drug Design: Protein-Ligand Binding Affinity Prediction. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform* 2022; 19: 407–417

Rhea EM, Banks WA. Role of the Blood-Brain Barrier in Central Nervous System Insulin Resistance. *Front Neurosci* 2019; 13: 521

Rodrigues E, Jung J, Park H, Loo C, Soukhtezari S, Kitova EN, Mozaneh F, Daskhan G, Schmidt EN, Aghanya V, Sarkar S, Streith L, St Laurent CD, Nguyen L, Julien J-P, West LJ, Williams KC, Klassen JS, Macauley MS. A versatile soluble siglec scaffold for sensitive and quantitative detection of glycan ligands. *Nat Commun* 2020; 11: 5091

Rube HT, Rastogi C, Feng S, Kribelbauer JF, Li A, Becerra B, Melo LAN, Do BV, Li X, Adam HH, Shah NH, Mann RS, Bussemaker HJ. Prediction of protein-ligand binding affinity from sequencing data with interpretable machine learning. *Nat Biotechnol* 2022; 40: 1520–1527

Rubin LL, Staddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22: 11–28

Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal* 2012; 2012: 756357

Russo MV, McGavern DB. Inflammatory neuroprotection following traumatic brain injury. *Science* 2016; 353: 783–785

Rutishauser U. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 26–35

Sapoń K, Janas T, Sikorski AF, Janas T. Polysialic acid chains exhibit enhanced affinity for ordered regions of membranes. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2019; 1861: 245–255

Sato C. Chain Length Diversity of Sialic Acids and Its Biological Significance. *TIGG* 2004; 16: 331–344

Sato C, Kitajima K. Disialic, oligosialic and polysialic acids: distribution, functions and related disease. *J Biochem* 2013; 154: 115–136

Schmauck-Medina T, Molière A, Lautrup S, Zhang J, Chlopicki S, Madsen HB, Cao S, Soendenbroe C, Mansell E, Vestergaard MB, Li Z, Shiloh Y, Opresko PL, Egly J-M, Kirkwood T, Verdin E, Bohr VA, Cox LS, Stevnsner T, Rasmussen LJ, Fang EF. New hallmarks of ageing: a 2022 Copenhagen ageing meeting summary. *Aging (Albany NY)* 2022; 14: 6829–6839

Schwardt O, Kelm S, Ernst B. SIGLEC-4 (MAG) Antagonists: From the Natural Carbohydrate Epitope to Glycomimetics. *Top Curr Chem* 2015; 367: 151–200

Schwarz F, Landig CS, Siddiqui S, Secundino I, Olson J, Varki N, Nizet V, Varki A. Paired Siglec receptors generate opposite inflammatory responses to a human-specific pathogen. *EMBO J* 2017; 36: 751–760

Schwarzkopf M, Knobloch K-P, Rohde E, Hinderlich S, Wiechens N, Lucka L, Horak I, Reutter W, Horstkorte R. Sialylation is essential for early development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 5267–5270

Serrano-López J, Martín-Antonio B. Inflammaging, an Imbalanced Immune Response That Needs to Be Restored for Cancer Prevention and Treatment in the Elderly. *Cells* 2021; 10

Shahraz A. 2016. Neuroprotective Effects of Polysialic Acid and SIGLEC-11 in Activated Phagocytic Cells. Verfügbar unter <https://hdl.handle.net/20.500.11811/6731> (Zugriffsdatum: 04.12.2023)

Shahraz A, Kopatz J, Mathy R, Kappler J, Winter D, Kapoor S, Schütza V, Scheper T, Giesemann V, Neumann H. Anti-inflammatory activity of low molecular weight polysialic acid on human macrophages. *Sci Rep* 2015; 5: 16800

Shahraz A, Lin Y, Mbroh J, Winkler J, Liao H, Lackmann M, Bungartz A, Zipfel PF, Skerka C, Neumann H. Low molecular weight polysialic acid binds to properdin and reduces the activity of the alternative complement pathway. *Sci Rep* 2022; 12: 5818

Siddiqui SS, Matar R, Merheb M, Hodeify R, Vazhappilly CG, Marton J, Shamsuddin SA, Al Zouabi H. Siglecs in Brain Function and Neurological Disorders. *Cells* 2019; 8

Sierra A, Abiega O, Shahrzad A, Neumann H. Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 6

Skovronsky DM, Lee VM-Y, Trojanowski JQ. Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2006; 1: 151–170

Song Y, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y. Isolation and structural elucidation of a novel type of ganglioside, deaminated neuraminic acid (KDN)-containing glycosphingolipid, from rainbow trout sperm. The first example of the natural occurrence of KDN-ganglioside, (KDN)GM3. *J Biol Chem* 1991; 266: 21929–21935

Spence S, Greene MK, Fay F, Hams E, Saunders SP, Hamid U, Fitzgerald M, Beck J, Bains BK, Smyth P, Themistou E, Small DM, Schmid D, O'Kane CM, Fitzgerald DC, Abdelghany SM, Johnston JA, Fallon PG, Burrows JF, McAuley DF, Kissenpfennig A, Scott CJ. Targeting Siglecs with a sialic acid-decorated nanoparticle abrogates inflammation. *Sci Transl Med* 2015; 7: 303ra140

Stäsche R, Hinderlich S, Weise C, Effertz K, Lucka L, Moormann P, Reutter W. A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Molecular cloning and functional expression of UDP-N-acetyl-glucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *J Biol Chem* 1997; 272: 24319–24324

Stephenson J, Nutma E, van der Valk P, Amor S. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology* 2018; 154: 204–219

Strubl S, Schubert U, Kühnle A, Rebl A, Ahmadvand N, Fischer S, Preissner KT, Galuska SP. Polysialic acid is released by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in vitro. *Cell Biosci* 2018; 8: 64



Su P-C, Si W, Baker DL, Berger BW. High-yield membrane protein expression from *E. coli* using an engineered outer membrane protein F fusion. *Protein Sci* 2013; 22: 434–443

Subedi GP, Johnson RW, Moniz HA, Moremen KW, Barb A. High Yield Expression of Recombinant Human Proteins with the Transient Transfection of HEK293 Cells in Suspension. *J Vis Exp* 2015: e53568

Takahashi K, Rochford CDP, Neumann H. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J Exp Med* 2005; 201: 647–657

Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2005; 51: 187–200

Thomas R, Wang W, Su D-M. Contributions of Age-Related Thymic Involution to Immunosenescence and Inflammaging. *Immun Ageing* 2020; 17: 2

Toubai T, Hou G, Mathewson N, Liu C, Wang Y, Oravecz-Wilson K, Cummings E, Rossi C, Evers R, Sun Y, Wu J, Choi SW, Fang D, Zheng P, Liu Y, Reddy P. Siglec-G-CD24 axis controls the severity of graft-versus-host disease in mice. *Blood* 2014; 123: 3512–3523

Urh M, Simpson D, Zhao K. Chapter 26 Affinity Chromatography. *Methods Enzymol* 2009; 463: 417–438

Varea E, Guirado R, Gilabert-Juan J, Martí U, Castillo-Gomez E, Blasco-Ibáñez JM, Crespo C, Nacher J. Expression of PSA-NCAM and synaptic proteins in the amygdala of psychiatric disorder patients. *J Psychiatr Res* 2012; 46: 189–197

Varki A. Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* 1992; 2: 25–40

Varki A. Nothing in glycobiology makes sense, except in the light of evolution. *Cell* 2006; 126: 841–845

Varki A. Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med* 2008; 14: 351–360

Varki A. Multiple changes in sialic acid biology during human evolution. *Glycoconj J* 2009a; 26: 231–245

Varki A. Natural ligands for CD33-related Siglecs? *Glycobiology* 2009b; 19: 810–812

Varki A. Evolutionary forces shaping the Golgi glycosylation machinery: why cell surface glycans are universal to living cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011a; 3

Varki A. Since there are PAMPs and DAMPs, there must be SAMPs? Glycan “self-associated molecular patterns” dampen innate immunity, but pathogens can mimic them. *Glycobiology* 2011b; 21: 1121–1124

Varki A. Are humans prone to autoimmunity? Implications from evolutionary changes in hominin sialic acid biology. *J Autoimmun* 2017a; 83: 134–142

Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology* 2017b; 27: 3–49

Varki A, Angata T. Siglecs--the major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology* 2006; 16: 1R-27R

Essentials of Glycobiology. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, Reg. Cold Spring Harbor (NY) 2015

Varki A, Gagneux P. Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1253: 16–36

Varki A, Schauer R. Essentials of glycobiology. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2009

Varki NM, Strobert E, Dick EJ, Benirschke K, Varki A. Biomedical differences between human and nonhuman hominids: potential roles for uniquely human aspects of sialic acid biology. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2011; 6: 365–393

Varki NM, Varki A. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest* 2007; 87: 851–857

Villanueva-Cabello TM, Gutiérrez-Valenzuela LD, Salinas-Marín R, López-Guerrero DV, Martínez-Duncker I. Polysialic Acid in the Immune System. *Front Immunol* 2021; 12: 823637

Vries I de, Busse C, Kopatz J, Neumann H, Beutel S, Scheper T. Polysialic acid production using *Escherichia coli* K1 in a disposable bag reactor. *Eng Life Sci* 2017; 17: 723–731

Wang X, Mitra N, Cruz P, Deng L, Varki N, Angata T, Green ED, Mullikin J, Hayakawa T, Varki A. Evolution of siglec-11 and siglec-16 genes in hominins. *Mol Biol Evol* 2012; 29: 2073–2086

Wang Y, Neumann H. Alleviation of neurotoxicity by microglial human Siglec-11. *J Neurosci* 2010; 30: 3482–3488

Wielgat P, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Czarnomysy R, Rogowski K, Bielawski K, Car H. The Paired Siglecs in Brain Tumours Therapy: The Immunomodulatory Effect of Dexamethasone and Temozolomide in Human Glioma In Vitro Model. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 1791

Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood–brain barrier. *Vascul Pharmacol* 2002; 38: 323–337

Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* 2002; 35: 419–432

Xu H, Wang Y, Lin S, Deng W, Di Peng, Cui Q, Xue Y. PTMD: A Database of Human Disease-associated Post-translational Modifications. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2018; 16: 244–251

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

Yamauchi J, Miyamoto Y, Torii T, Takashima S, Kondo K, Kawahara K, Nemoto N, Chan JR, Tsujimoto G, Tanoue A. Phosphorylation of cytohesin-1 by Fyn is required for initiation of myelination and the extent of myelination during development. *Sci Signal* 2012; 5: ra69

Yamazaki Y, Kanekiyo T. Blood-Brain Barrier Dysfunction and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 2017; 18

Yan Z, Wang J. Specificity quantification of biomolecular recognition and its implication for drug discovery. *Sci Rep* 2012; 2: 309

Yang L, Chen X, Wang Q, Zhu Y, Wu C, Ma X, Zuo D, He H, Le Huang, Li J, Xia C, Hu S, Yang X, Feng M. Generation of TIM3 inhibitory single-domain antibodies to boost the anti-tumor activity of chimeric antigen receptor T cells. *Oncol Lett* 2021; 22: 542

Zenaro E, Piacentino G, Constantin G. The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2017; 107: 41–56

Zeng Y. Endothelial glycocalyx as a critical signalling platform integrating the extracellular haemodynamic forces and chemical signalling. *J Cell Mol Med* 2017; 21: 1457–1462

Zeng Y, Zhang XF, Fu BM, Tarbell JM. The Role of Endothelial Surface Glycocalyx in Mechanosensing and Transduction. *Adv Exp Med Biol* 2018; 1097: 1–27

Zhan Y, Paolicelli RC, Sforazzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, Vyssotski AL, Bifone A, Gozzi A, Ragozzino D, Gross CT. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat Neurosci* 2014; 17: 400–406

Zhang B, Gaiteri C, Bodea L-G, Wang Z, McElwee J, Podtelezchnikov AA, Zhang C, Xie T, Tran L, Dobrin R, Fluder E, Clurman B, Melquist S, Narayanan M, Suver C, Shah H, Mahajan M, Gillis T, Mysore J, MacDonald ME, Lamb JR, Bennett DA, Molony C, Stone DJ, Gudnason V, Myers AJ, Schadt EE, Neumann H, Zhu J, Emilsson V. Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. *Cell* 2013; 153: 707–720

Zhang W, Xiao D, Mao Q, Xia H. Role of neuroinflammation in neurodegeneration development. *Signal Transduct Target Ther* 2023; 8: 267

Zhao J, Brooks DM, Lurie DI. Lipopolysaccharide-activated SHP-1-deficient mouse microglia release increased nitric oxide, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ . *Glia* 2006; 53: 304–312

Zhong Q, Xiao X, Qiu Y, Xu Z, Chen C, Chong B, Zhao X, Hai S, Li S, An Z, Dai L. Protein posttranslational modifications in health and diseases: Functions, regulatory mechanisms, and therapeutic implications. *MedComm (2020)* 2023; 4: e261

Zipfel PF, Hallström T, Hammerschmidt S, Skerka C. The complement fitness factor H: role in human diseases and for immune escape of pathogens, like pneumococci. *Vaccine* 2008; 26 Suppl 8: I67-74

Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 729–740

Zlatina K, Saftenberger M, Kühnle A, Galuska CE, Gärtner U, Rebl A, Oster M, Vernunft A, Galuska SP. Polysialic Acid in Human Plasma Can Compensate the Cytotoxicity of Histones. *Int J Mol Sci* 2018; 19

Zuo L, Prather ER, Stetskiv M, Garrison DE, Meade JR, Peace TI, Zhou T. Inflammaging and Oxidative Stress in Human Diseases: From Molecular Mechanisms to Novel Treatments. *Int J Mol Sci* 2019; 20

## 9. Danksagung

Ich möchte mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Harald Neumann für die Überlassung des Forschungsthemas, die hervorragende Betreuung und die unermüdliche wissenschaftliche Unterstützung bedanken.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Anahita Shahraz sowie Annemarie Bungartz für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der experimentellen Datenerhebung, die Beantwortung meiner Fragen und die konstruktive Kritik bei der Datenauswertung bedanken. Insbesondere danke ich Annemarie Bungartz für Ihre hilfreichen Anmerkungen und Hilfestellung beim Verfassen dieser Dissertation.

Auch bei den anderen wissenschaftlichen MitarbeiterInnen der AG Neumann, die mich auf meinem wissenschaftlichen Weg der Dissertation begleitet haben, möchte ich mich bedanken. Insbesondere der kollegiale und respektvolle fachliche Austausch, aber auch die gegenseitige Unterstützung sowie die erhellende Zusammenarbeit bleiben mir stets positiv im Gedächtnis. Ein besonderes Dankeschön gilt in diesem Zuge Rita Jietou, Christine Klaus, Jens Kopatz, Huan Liao, Bettina Linnartz-Gerlach, Mona Mathews, Jonas Winkler und Jannis Wißfeld, die mich am längsten auf meinem Weg der Promotion begleitet und unterstützt haben.

Zuletzt gilt neben meinen engen Freunden aus der Schulzeit und der Studienzeit ein ganz besonderer Dank an meine Familie mit meinen Eltern Silke und Bernd sowie meinen Geschwistern Jonathan und Ann-Kathrin. Silke, Bernd, Ann-Kathrin und Jonathan ihr habt mich nicht nur auf Weg der Promotion begleitet, sondern unterstützt mich bereits auf meinem gesamten Lebensweg mit unermüdlicher Ausdauer! Ohne eure Unterstützung und euer regelhaftes positives Zureden hätte ich manches sicherlich nicht erreicht. Auch meiner Ehefrau Joana mit ihrer Familie gilt ein besonderes Dankeschön. Du stehst sowohl in guten als auch in schlechten Zeiten an meiner Seite und unterstützt mich mit unermüdlicher Kraft sowie positiver Energie beim Erreichen meiner Ziele. Vielen Dank!