

Analyse von Sialinsäuren in der humanen Retina

Ein Pilotversuch mit Etablierung eines Verfahrens zur Detektion von Polysialinsäuren

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Felix Sebastian Jonathan Hufschmidt

aus Freiburg im Breisgau

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Harald Neumann
2. Gutachter: Prof. Dr. Jochen Walter

Tag der mündlichen Prüfung: 16.09.2025

Aus dem Institut für Rekonstruktive Neurobiologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Einleitung.....	9
1.1 Sialinsäuren: Aufbau, Eigenschaften und Vorkommen.....	9
1.2 Metabolismus von Sialinsäuren: Synthese und Sialyltransferasen.....	11
1.3 Funktion von Sialinsäuren.....	13
1.3.1 Wachstum, neuronale Plastizität und Myelinisierung.....	13
1.3.2 Immunregulation im ZNS.....	14
1.3.2.1 Siglecs.....	14
1.3.2.2 Regeneration und Reparatur.....	15
1.3.2.3 Komplement-System.....	15
1.3.2.4 Mikroglia.....	17
1.4 Altern, Neuroinflammation und Neurodegeneration.....	18
1.4.1 Altern und altersassoziierte Veränderungen.....	18
1.4.2 Neuroinflammation und inflammatorische Marker.....	19
1.4.3 Altern und Neurodegeneration.....	21
1.5 Retina und Altersabhängige Makuladegeneration.....	23
1.6 Ziele der Arbeit.....	26
2. Material und Methoden.....	28
2.1 Material.....	28
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Humanes Retinagewebe.....	33
2.2.2 Biochemische Methoden.....	34
2.2.2.1 Probenvorbereitung für die biochemischen Analysen.....	34
2.2.2.2 Quantifizierung der gesamten Sialinsäuren.....	34
2.2.2.3 Quantifizierung der Polysialinsäuren.....	35
2.2.2.4 Quantifizierung der Proteine.....	38
2.2.3 Immunhistochemie.....	39
2.2.3.1 Probenvorbereitung für die Immunhistochemie.....	39
2.2.3.2 Färbung von Sialinsäuren unterschiedlicher Kettenlänge.....	39
2.2.3.3 Kofärbung von Iba-1 und CD68.....	40

2.2.4 Gentranskriptionsanalysen.....	40
2.2.4.1 Probenvorbereitung für die Gentranskriptionsanalysen.....	40
2.2.4.2 Isolation der RNA.....	41
2.2.4.3 Reverse Transkription.....	41
2.2.4.4 Quantitative real-time PCR.....	41
2.2.5 Statistische Analyse.....	42
3. Ergebnisse.....	44
3.1 Etablierung der Analysemethoden.....	44
3.1.1 Etablierung der Aminoff-Methode zur Quantifizierung der gesamten Sialinsäuren in Gewebeproben der Retina.....	44
3.1.2 Etablierung eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Analyse der langkettigen Polysialinsäuren in Gewebeproben.....	48
3.2 Ergebnisse der Analysen humaner Retinae.....	53
3.2.1 Quantitativer Nachweis der gesamten Sialinsäuren mittels Aminoff Methode.....	53
3.2.2 Quantitativer Nachweis von Polysialinsäuren mittels Sandwich-ELISA.....	54
3.2.3 Immunhistochemie von Tri-, und Polysialinsäuren.....	55
3.2.4 Zusammenhänge zwischen den verschiedenen analysierten Sialinsäuren.....	60
3.2.5 Altersabhängige Veränderungen der Sialinsäuren.....	61
3.2.6 Geschlechtsabhängige Unterschiede der Sialinsäuren.....	61
3.2.7 Immunhistochemie von Mikroglia.....	62
3.2.8 Mikroglia und ihr Zusammenhang zu den analysierten Sialinsäuren.....	65
3.2.8.1 Altersabhängige Veränderungen mikroglialer Marker.....	65
3.2.8.2 Geschlechtsabhängige Unterschiede mikroglialer Marker.....	65
3.2.8.3 Zusammenhänge zwischen Mikroglia und den analysierten Sialinsäuren.....	66
3.2.9 Inflammatorische Marker und Sialinsäuren.....	67
3.2.10 Sialyltransferasen und Sialinsäuren.....	68
3.2.10.2 Zusammenhänge der Sialyltransferasentranskription mit dem Spenderalter, dem Geschlecht und dem Vorkommen verschiedener Sialinsäuren.....	69
3.2.10.3 Korrelation der Sialyltransferasetranskription mit Mikroglia- und inflammatorischen Markern.....	70
4. Diskussion.....	71
4.1 Quantifizierung der gesamten Sialinsäuren in humanen Retinae.....	72

4.2 Quantifizierung der Polysialinsäuren in humanen Retinae.....	74
4.3 Immunhistochemie von Sialinsäuren in humanen Retinae.....	77
4.4 Einfluss des Alters auf die untersuchten Sialinsäuren.....	79
4.5 Einfluss des Geschlechts auf die untersuchten Sialinsäuren.....	80
4.6 Einfluss von Vorkommen und Aktivität von Mikroglia auf die untersuchten Sialinsäuren.....	81
4.7 Einfluss der Transkription inflammatorischer Marker auf die untersuchten Sialinsäuren.....	85
4.8 Einfluss der Sialyltransferase-Transkription auf die untersuchten Sialinsäuren.....	86
5. Zusammenfassung.....	89
6. Anhang.....	91
7. Abbildungsverzeichnis.....	101
8. Tabellenverzeichnis.....	103
9. Literaturverzeichnis.....	104
10. Erklärung zum Eigenanteil.....	122
11. Veröffentlichungen.....	123
12. Danksagung.....	123

Abkürzungsverzeichnis

AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
ANOVA	Analysis of variance
ApoE	Apolipoprotein E
avDP	Average degree of polymerization
BCA	Bicinchoninic acid
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary desoxyribonucleic acid
CMP	Cytosinmonophosphat
CRP	C-reaktives-Protein
CT	Computertomographie
CT-Wert	Cycle threshold-Wert
Cy3	Cyanin 3
DAPI	4',6-Diamino-2-Phenylindol
ddH ₂ O	Double-distilled water
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
Don	Donor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCNFL	Ganglion cell and nerve fiber layer
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HDL	High-density lipoprotein
HRP	Horseradish peroxidase

Iba-1	Ionized calcium binding adaptor molecule-1
Ig	Immunglobulin
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
IL1 β	Interleukin-1 β
IL1-Ra	Interleukin-1 receptor antagonist protein
IL-6	Interleukin-6
INL	Inner nuclear layer
IPL	Inner plexiform layer
ISOS	Inner segment/outer segment layer
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
Kdn	2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononic acid
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NCAM	Neural cell adhesion molecule
Neu5Ac	N-Acetylneuraminic acid
Neu5Gc	N-Glycolylneuraminic acid
NFL	Nerve fiber layer
NGS	Normal goat serum
NO	Nitric oxide
OCT	Optimal cutting temperature
ONL	Outer nuclear layer
OPL	Outer plexiform layer
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyde

PMSF	Phenylmethylsulfonylflourid
PSA	Polysialic acid
RAGE	Receptor for advanced glycation endproducts
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
Sia	Sialinsäure
Siglec	Sialic acid binding immunoglobuline like lectin
ST3GAL	Beta-Galactosid α 2-3-Sialyltransferase
ST6GAL	Beta-Galactosid α 2-6-Sialyltransferase
ST6HALNAc	GalNAc α 2-6-Sialyltransferase
ST8SIA	α 2-8-Sialyltransferase
sTNFR	Soluble tumor necrosis factor receptor
THP-1	Tamm-Horsfall Protein 1
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TMEM119	Transmembrane protein 119
TNF α	Tumor necrosis factor α
TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP-GlcNac	Uridine diphosphate-N-acetylglucosamine
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Sialinsäuren: Aufbau, Eigenschaften und Vorkommen

Als Sialinsäuren werden die Derivate der Neuraminsäure bezeichnet. Es handelt sich um Monosaccharide, die als gemeinsames Strukturmerkmal aus einem Grundgerüst aus neun Kohlenstoffatomen aufgebaut sind (Varki et al., 2009). Sie zeichnen sich durch Hydrophilie und eine negative Ladung aus (Varki, 2008). Sialinsäuren sind Bestandteile von homo- oder heteromeren Kohlenhydratverbindungen und lassen sich anhand ihrer Kettenlänge klassifizieren. Langkettige Homopolymere aus mehr als acht Einheiten werden als Polysialinsäuren bezeichnet, kürzere Verbindungen aus drei bis sieben Sialinsäurebausteinen als Oligosialinsäuren (Sato und Kitajima, 2021). Es konnte gezeigt werden, dass der Polymerisierungsgrad eine wichtige Rolle für die biologischen Effekte spielt, welche durch Polysialinsäuren ausgeübt werden (Thiesler et al., 2021). Bei den drei in Wirbeltieren vorkommenden Hauptbestandteilen polymerer Sialinsäuren handelt es sich um 5-N-Acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac), 5-N-Glykolylnneuraminsäure (Neu5Gc) und 5-Deamino-3,5-Dideoxy-Neuraminsäure (Kdn) (Varki et al., 2009). Bisher wurden Sialinsäuren insbesondere in Mikroorganismen, Wirbeltieren, sowie einigen Insektenarten nachgewiesen und kommen als Strukturbestandteile von Muzinen, Glykoproteinen und Glykolipiden vor, die sich in großer Menge auf der äußeren Zellmembran, auf lysosomalen Membranen und als Bausteine sezernierter Glykoproteine finden lassen (Varki et al., 2009). Die komplexe Gesamtheit der Sialinsäuren wird auch als "Sialom" bezeichnet. Es existieren viele Faktoren, welche die besondere Komplexität des "Sialoms" erklären. So entstehen alleine durch Modifikationen (wie unter anderem Acetylierung, Sulfatierung und Methylierung) über 50 verschiedene Sialinsäuren, welche über unterschiedliche Bindungsstellen und Arten von Bindungen untereinander und an ein zugrundeliegendes Glykan oder Glykokonjugat gebunden sein können. Auch die zugrundeliegende Struktur, welche durch die Sialinsäuren terminiert wird, hat Einfluss auf die Erkennung von Kohlenhydraten durch Glykan-bindende Proteine, insbesondere, da monovalente Glykanliganden oft nicht mit hoher Affinität gebunden werden (Cohen und Varki, 2010). Im menschlichen Gehirn

kommen über drei Viertel der Sialinsäuren als Bestandteil von Gangliosiden vor, die etwa 80 % der Glykane dort ausmachen (Sipione et al., 2020).

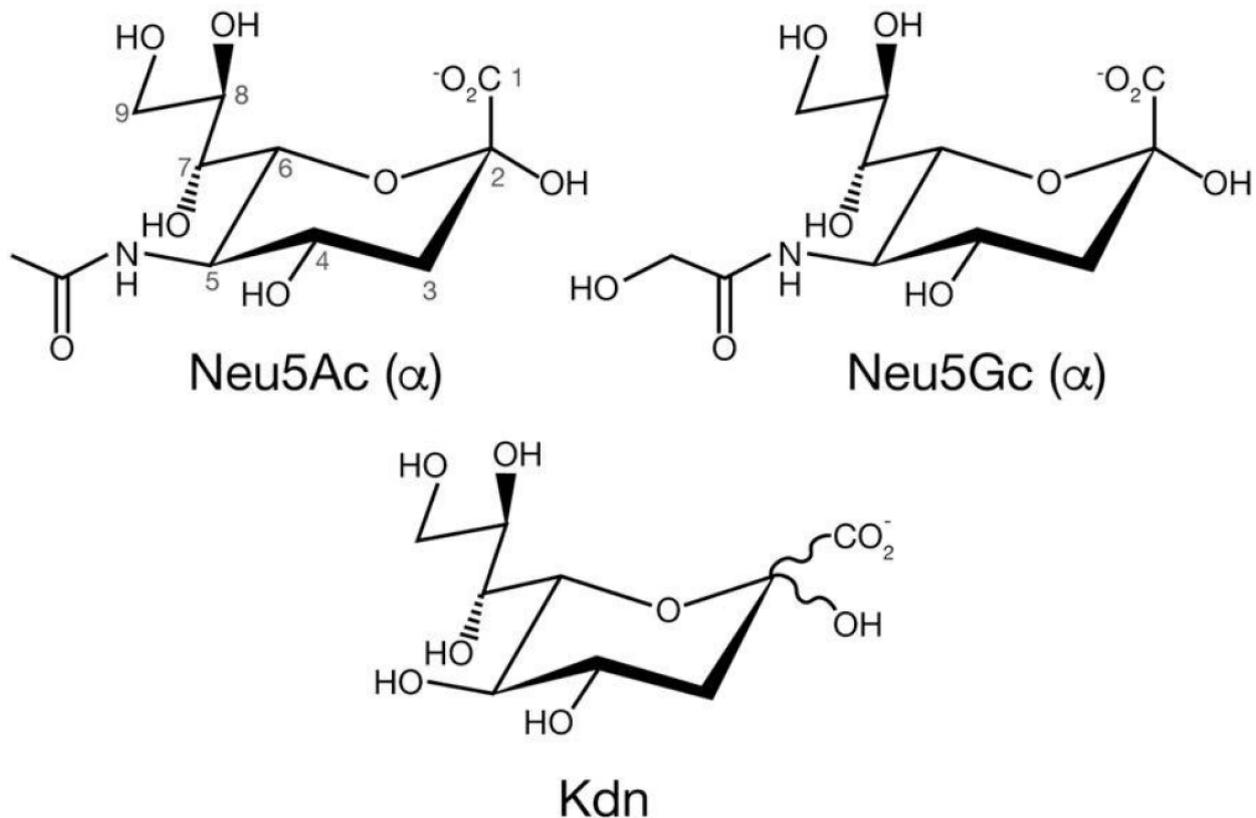


Abb. 1: Konformationsformeln der drei häufigsten natürlich vorkommenden Sialinsäuren Neu5Ac (N-Acetylneuraminsäure), Neu5Gc (N-Glycolylneuraminsäure) und Kdn (5-Deamino-3,5-Dideoxy-Neuraminsäure). Diese unterscheiden sich strukturell primär durch den Rest, der an das C5-Atom des Grundgerüsts gebunden ist. Im Fall von Neu5Ac ist über eine Aminogruppe eine Acetylgruppe gebunden. Bei Neu5Gc ist über die Aminogruppe eine Glycolylgruppe gebunden. Im Fall von Kdn ist an das C5-Atom eine Hydroxygruppe gebunden (Varki et al., 2009).

Zur immunhistochemischen Darstellung sowie zur Detektion von Sialinsäuren unterschiedlicher Kettenlänge wurden in dieser Arbeit mehrere Antikörper verwandt. Der A2B5-Antikörper wurde bei seiner Entdeckung aus einer hybriden Mauszelelinie gewonnen, nachdem Mäuse mit embryonalen Retinazellen von Hühnern immunisiert worden waren (Eisenbarth et al., 1979). Es zeigte sich schon initial eine Bindung an ein Sialidase-sensitives Antigen. Später zeigt sich als Zielstruktur ein α 2-8-gebundenes Epitop aus drei Sialinsäuren, welches an Ganglioside und wahrscheinlich auch an

Glykoproteine gebunden vorkommen kann und unter anderem während der Entwicklung von neuronalen Stammzellen und der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen in der weißen Substanz exprimiert wird (Figarella-Branger et al., 2022). Der bei der Immunhistochemie verwendete Antikörper gegen CD56 bindet an ein Polysialinsäure-Epitop, wie es typischerweise auf NCAM zu finden ist (Miller et al., 1994), die genaue Art der erkannten Sialinsäuren, sowie seine Spezifität bezüglich des Polymerisierungsgrads sind bisher noch unbekannt (Villanueva-Cabello et al., 2022). Bei der Detektion von Polysialinsäuren in einem Sandwich-ELISA wurde außerdem ein Antikörper gegen Polysialinsäuren (Klon 735) verwendet, der homopolymere, α 2-8-gebundene Sialinsäuren mit einem Polymerisierungsgrad von mindestens 10 erkennt (Nagae et al., 2013). Der in den immunhistochemischen Experimenten verwandte Polysialinsäure-spezifische Antikörper (Klon 2-2B) ist gegen polymere Sialinsäuren mit mindestens vier Neu5Ac-Molekülen gerichtet (Sato et al., 2000).

1.2 Metabolismus von Sialinsäuren: Synthese und Sialyltransferasen

Die Biosynthese von Sialinsäuren findet in eukaryotischen Zellen im Zytosol statt. Die initialen Schritte umfassen die Synthese von Uridindiphosphat-N-acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) aus Glucose und Glutamin im zytosolischen Hexosamin-Weg (Akella et al., 2019). Die eigentliche Sialinsäuresynthese beginnt mit vier Reaktionen, in denen aus Uridindiphosphat-N-acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) die Sialinsäure 5-N-Acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac) synthetisiert wird (Angata et Varki, 2002). Anschließend wird die de-novo synthetisierte Sialinsäure im Zellkern durch Bindung an Cytidinmonophosphat (CMP) aktiviert. Alternativ können Sialinsäuren aus phagozytierten Glykoproteinen und Glykolipiden durch Sialidasen in den Lysosomen freigesetzt werden und anschließend im Zellkern aktiviert werden. Die aktivierte Sialinsäure gelangt über das Zytoplasma in den Golgi-Apparat, wo durch Sialyltransferasen, Enzyme aus der Gruppe der Glykosyltransferasen, aus den aktivierten Sialinsäuren Kohlenhydrate oder Glykokonjugate synthetisiert werden (Li et Chen, 2012). Bei Sialyltransferasen handelt es sich um Typ-II-Transmembranproteine mit einer N-terminalen zytoplasmatischen Domäne, einer singulären

Transmembrandomäne und einer C-terminalen katalytischen Domäne. Alle menschlichen Sialyltransferasen besitzen als gemeinsames Strukturmerkmal in ihrem aktiven Zentrum vier konservierte Peptidsequenzen, die als "sialylmotifs" bezeichnet werden. Bei Wirbeltieren sind Sialyltransferasen vor allem im Golgi-Apparat lokalisiert, lassen sich jedoch auch frei in Körperflüssigkeiten nachweisen (Audry et al., 2011). Sialyltransferasen sind die Schlüsselenzyme der Synthese von Sialinsäure-haltigen Kohlenhydratverbindungen und Glykokonjugaten. Sie katalysieren den Transfer einer mit CMP aktivierten Sialinsäure auf ein Akzeptormolekül. Bei dem Akzeptormolekül handelt es sich um ein Galactose-Molekül, ein N-Acetylgalactosamin (GalNAc), ein N-Acetylglucosamin (GlcNAc) oder eine andere Sialinsäure (Grewal et al., 2021).

Anhand des Akzeptorsubstrats und der gebildeten glykosidischen Bindung lassen sich die 20 bekannten menschlichen Sialyltransferasen in vier Familien einteilen. Die erste Gruppe der Beta-Galactosid α 2-3-Sialyltransferasen (ST3GAL 1-6) katalysiert die Bindung von Neu5Ac an die 3-OH-Gruppe eines Galactose-Rests von N- oder O-glykosylierten Kohlenhydraten und Glykolipiden. Die zweite Gruppe der Beta-Galactosid α 2-6-Sialyltransferasen (ST6GAL 1-2) katalysiert die Bindung von Neu5Ac an die 6-OH-Gruppe von Galactose-Resten von N-glykosylierten Kohlenhydraten. Die Gruppe der GalNAc α 2-6-Sialyltransferasen (ST6GalNAc 1-6) katalysiert die Bindung von Neu5Ac an die 6-OH-Gruppe von N-Acetylgalactosamin-Resten von O-glykosylierten Kohlenhydraten und Glykolipiden. Die Gruppe der α 2-8-Sialyltransferasen (ST8SIA 1-4) katalysiert den Transfer von Neu5Ac an die 8-OH-Gruppe von anderen Neu5Ac-Resten in N- oder O-glykosidisch gebundenen Kohlenhydraten oder Glykolipiden. (Grewal et al., 2021).

Die Regulation des Vorkommens der entstehenden Kohlenhydratstrukturen ist aufgrund ihrer hohen Komplexität Gegenstand aktueller Forschung. Unter anderem spielen die Expression von Glykosyltransferasen, die Verfügbarkeit der Substrate, Enzymhemmung, sowie weitere regulierende Prozesse auf Ebene von Substrat und Enzymen eine Rolle (Nairn et al., 2008). Im Fall der Sialyltransferasen wurde gezeigt, dass die Verfügbarkeit von aktivierten Sialinsäuren einen starken Einfluss auf die Transkription von Sialyltransferasen hat (Bork et al., 2017). Für Tumorzellen (Bassagañas et al., 2015) und natürliche Killerzellen (Rosenstock et al., 2020) konnte außerdem gezeigt werden,

dass inflammatorische Zytokine ebenfalls einen Einfluss auf die Expression von Sialyltransferasen und die Zusammensetzung der Sialinsäuren der untersuchten Zellen haben. Der Abbau von Sialinsäurepolymeren wird durch Sialidasen katalysiert. Diese im Zytosol und in verschiedenen Zellorganellen lokalisierten Enzyme erkennen Sialinsäuren und ihre glykosidische Bindung und können diese spalten (Heimerl et al., 2022).

1.3 Funktion von Sialinsäuren

1.3.1 Wachstum, neuronale Plastizität und Myelinisierung

Polysialinsäuren spielen eine wichtige Rolle für die Entwicklung des zentralen Nervensystems und die neuronale Plastizität im adulten Gehirn. So wird angenommen, dass sterische Hinderung durch Polysialinsäuren eine wichtige Rolle in der Regulation des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls 1 (NCAM) erfüllt (Thiesler et al., 2022). Dies ist im sich entwickelnden zentralen Nervensystem relevant für Prozesse wie die neurale Zellmigration, den Auswuchs von Axonen und die Synaptogenese (Schmid et al., 2008). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von NCAM-gebundenen Polysialinsäuren wichtig für die ungestörte Entwicklung der großen Fasertrakte des Gehirns ist (Hildebrandt et al., 2009). Wichtige Eigenschaften sind in diesem Kontext ihre negative Ladung mit entsprechenden elektrostatischen Wechselwirkungen, sowie ihre Hydrophilie (Varki, 2008). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Polysialinsäuren eine große Rolle in der Bindung und somit Regulation der Funktion verschiedener Neurotrophine, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren spielen (Sato und Kitajima, 2013). In diesem Kontext ist der Polymerisierungsgrad der Sialinsäuren maßgeblich relevant (Kanato et al., 2008). Im adulten Gehirn findet sich weiterhin eine NCAM-Expression in Bereichen aktivitätsabhängiger neuronaler Plastizität und spielt eine Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen (Thiesler et al., 2022). Die Untersuchung des Hippocampus humaner Gehirne zeigte, dass die Menge PSA-NCAM positiver Zellen mit dem Alter abnimmt, was als Hinweis für eine abnehmende Neuroplastizität gedeutet wurde (Boldrini et al., 2018). Auch scheinen

Polysialinsäuren eine Rolle in der Entwicklung von Oligodendrozyten und damit der Myelinisierung von Axonen des zentralen Nervensystems zu spielen (Werneburg et al., 2017).

1.3.2 Immunregulation im ZNS

Die folgenden Ausführungen beschränken sich auf die immunregulatorischen Vorgänge im zentralen Nervensystem, da es eine immunologische Sonderstellung im Vergleich zu anderen Organen einnimmt aufgrund verschiedener, auch immunologischer Barrieren (unter anderem der Blut-Hirn-Schranke und der Membrana limitans gliae superficialis) und seiner Ausstattung mit Mikroglia, den bedeutendsten Repräsentanten des angeborenen Immunsystems im zentralen Nervensystem (Mapunda et al., 2022).

1.3.2.1 Siglecs

Sialinsäuren fungieren als Liganden von Rezeptoren. In diesem Kontext bedeutsam sind unter anderem Siglecs (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins). Dies sind an der Zelloberfläche gelegene Transmembranrezeptoren, die Sialinsäuren erkennen. Sie gehören zur Gruppe der Lektine, bei denen es sich um spezifische Rezeptoren zur Bindung von Kohlenhydraten handelt (Macauley et al., 2014). Siglecs werden vor allem von hämatopoetischen Zellen und Zellen des Immunsystems in einem komplexen Muster exprimiert. Ihre Interaktion mit Sialinsäuren moduliert eine Vielzahl von Prozessen, welche das Überleben und die Aktivität von Immunzellen beeinflussen, weshalb sie wichtige regulatorische Funktionen in der Steuerung des Immunsystems wahrnehmen (Crocker et al., 2007). Die meisten Siglecs besitzen eine intrazelluläre ITIM-Domäne (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif), welche unter anderem als Erkennungssignal für körpereigene Strukturen dient und so das Immunsystem dämpft. Einige Siglecs können nach Ligandenbindung auch proinflammatorisch wirken (Lübbbers et al., 2018). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Mechanismus bei der negativen Regulation verschiedener Leukozytenfunktionen relevant ist (Avril et al.,

2006). Für Siglec-11 konnte eine Expression im Gehirn und der humanen Retina nachgewiesen werden (Karlstetter et al., 2017). In der Zellkultur konnte gezeigt werden, dass es durch Bindung von Polysialinsäuren an diesen Rezeptor zu einer Reduktion der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und einer verminderten Phagozytose kommt, was eine neuroprotektive Wirkung hatte (Wang et Neumann, 2010).

1.3.2.2 Regeneration und Reparatur

Auch bei Regenerationsprozessen nach Schädigung zentralnervöser Strukturen konnte die Bedeutsamkeit von Polysialinsäuren gezeigt werden. So ist beispielsweise Siglec-10 an der Kontrolle der Entzündungsreaktion beteiligt, welche aus Gewebeschädigung resultiert (Chen et al., 2009). In einem Modell zeigte sich, dass die Überexpression von Polysialinsäuren durch Astrozyten im Mausmodell nach spinaler oder cerebraler Läsion zum vermehrten Aussprossen von Axonen führte (El Maarouf et al., 2006). In einer anderen Studie konnte durch die Applikation von Polysialinsäure-Mimetika nach spinaler Läsion eine verbesserte axonale Aussprossung und mehr Synapsen sowie eine bessere Myelinisierung proximal der Läsion nachgewiesen werden, was in einem besseren funktionellen Outcome resultierte (Mehanna et al., 2010). In der murinen Retina konnte gezeigt werden, dass durch Polysialinsäuren mit einem durchschnittlichen Polymerisierungsgrad von 20 nach laserinduzierter Retinaschädigung die Aktivierung von Mikroglia und Komplementsystem reduziert werden konnte (Karlstetter et al., 2017).

1.3.2.3 Komplement-System

Das Komplement-System ist als Effektor der angeborenen Immunität in der Regulation einer Vielzahl immunologischer Prozesse bedeutsam. Über verschiedene Signalwege (namentlich dem klassischen -, den alternativen -, und den Lektin-Weg) führen Trigger in Form von Antikörpern, Kohlenhydratverbindungen oder verschiedenen mit exogenen Pathogenen oder endogener Schädigung assoziierten Strukturmerkmalen zu einer Aktivierung einer komplexen und streng regulierten Kaskade. Es konnte gezeigt werden, dass das Komplement-System nicht nur für die Opsonierung, die Initiierung proinflammatorischer Signale, die Phagozytose oder Lyse von Pathogenen und

apoptotischen Zellen und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies relevant ist, sondern auch an der Regulation des Überlebens und der Aktivität von Lymphozyten beteiligt ist (Ricklin et al., 2010). Speziell auf das Nervensystem bezogen konnte gezeigt werden, dass es neben der Abwehr von Pathogenen auch an fundamentalen Prozessen sowohl physiologischer als auch pathologischer Zustände beteiligt ist. Es spielt eine Rolle bei der Synapsen-Homöostase, in der Regulation von axonalem Wachstum, bei Neuroinflammationsprozessen und bei direkter Neurotoxizität durch Lyse von Neuronen (Warwick et al., 2021). Für den klassischen und den Lektin-Weg des Komplementsystems gilt, dass ihre Effekte maßgeblich von einer Verstärkung durch den alternativen Weg abhängig sind (Harboe et al., 2009). Insbesondere die Kontrolle der Aktivierung des alternativen Komplement-Wegs ist deshalb von Bedeutung. Hier spielt der Komplementfaktor H als negativer Regulator eine Schlüsselrolle. Ein Fehlen des Erkennens von polyanionischen Verbindungen an der Zelloberfläche (unter anderem Sialinsäuren), durch Komplementfaktor H hat eine Aktivierung des Komplementsystems über den alternativen Weg zur Folge (Meri, 2016). In der Zellkultur erfolgte die Inkubation muriner Zellen mit humanem Serum, was zur Lyse der Zellen durch humane Komplementfaktoren führte. Es konnte durch Zugabe von Polysialinsäuren mit einem durchschnittlichen Polymerisierungsgrad von 20 eine Reduktion der Bildung des Membranangriffskomplex erreicht werden und eine signifikant reduzierte Lyse der murinen Zellen. Als am ehesten zugrundeliegender Mechanismus wurde eine durch Polysialinsäuren mit einem durchschnittlichen Polymerisierungsgrad von 20 ausgelöste dosisabhängige Reduktion der Aktivierung des alternativen Komplement-Wegs identifiziert (Karlstetter et al., 2017). Für Properdin, einen positiven Regulator des alternativen Komplement-Wegs, konnte weiterhin gezeigt werden, dass es Polysialinsäuren mit einem durchschnittlichen Polymerisierungsgrad von 20 bindet, was die Aktivität des alternativen Komplement-Wegs hemmt. Sialinsäuren dienen dem Körper so zur Selbsterkennung und zur Kontrolle der Aktivierung des alternativen Komplement-Wegs (Shahraz et al., 2022).

1.3.2.4 Mikroglia

Für die zelluläre Immunabwehr des zentralen Nervensystems sind neben peripheren Immunzellen (insbesondere T-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen) insbesondere Mikroglia als ZNS-ständige Immunzellen relevant.

Die Funktionen von Mikroglia lassen sich grundsätzlich in drei Kategorien einteilen. Sie erfüllen über eine differenzierte Wahrnehmung ihrer Umgebung eine Überwachungsfunktion im zentralen Nervensystem. Bei Hinweisen für eine Infektion oder Schädigung, die zu ihrer Aktivierung führt, sind sie im Rahmen einer Abwehrfunktion zur Phagozytose befähigt, können Antigene präsentieren und eine Entzündungsreaktion auslösen durch Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine sowie reaktiver Sauerstoffspezies und NO. Außerdem erfüllen sie eine homöostatische Funktion mit Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine, Regulation der Synapsen-Homöostase und Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, welche Neurone schützen und zur Geweberegeneration beitragen (Ousman und Kubes, 2012 und Gretenkort et al., 2023). Sie sind so für eine gesunde Entwicklung des Gehirns notwendig (Paolicelli et al., 2011).

Es existieren verschiedene Verfahren um Mikroglia und ihre Aktivität nachzuweisen. In dieser Arbeit erfolgte zur immunhistochemischen Darstellung von Mikroglia eine Ko-Färbung von Iba-1 (Ionized calcium-binding adaptor molecule 1) und CD68 (Cluster of differentiation 68). Iba-1 ist ein Marker, der im Gehirn der Ratte exklusiv durch Mikroglia exprimiert wird (Ito et al., 1998) und an der Modulation der Aktinfilament-Reorganisation und so der Zellmigration und Phagozytose von Mikroglia beteiligt ist (Ohsawa et al., 2004). Anhand einer Meta-Analyse von Studien zur Quantifizierung von Iba-1 mittels unterschiedlicher Verfahren in Gehirngewebe von Alzheimer-Patienten und gesunden Kontrollen ergab sich, dass Iba-1 von allen Mikroglia exprimiert wird und es bei Aktivierung der Zellen zu einer gesteigerten Expression kommt (Hopperton et al., 2018). CD68 ist ein Protein der lysosomalen Membran von Mikroglia und Monozyten, welches von aktiv-phagozytierenden Mikroglia stärker exprimiert wird (Walker et Lue, 2015). Eine gewisse basale Expressionsrate konnte in allen Mikroglia nachgewiesen werden (Lee et al., 2002).

In den Gentranskriptionsanalysen wurde neben Iba-1 und CD68 zusätzlich TMEM19 untersucht. Es handelt sich hierbei um ein Transmembranprotein, welches unter anderem und im ZNS exklusiv von Mikroglia exprimiert wird. Bei der Aktivierung von Mikroglia kommt es zu einer reduzierten Expression und zu einer Abnahme der Dichte TMEM119-positiver Zellen in verschiedenen Mausmodellen mit neuronaler Schädigung und Inflammation. Ob dem ursächlich lediglich eine reduzierte Expression oder ein vollständiger Verlust der Expression zugrunde liegt, ist noch unklar (Vankriekelsvenne et al., 2022). In humanen THP1-Makrophagen konnte gezeigt werden, dass Polysialinsäuren mit einem durchschnittlichen Polymerisierungsgrad von 20 via Interaktion mit Siglec-11 die Transkription von TNF α hemmen, die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies durch neuronalen Debris oder fibrilläres β -Amyloid verhindern und die Phagozytose-Aktivität senken. Es resultierte eine anti-entzündlicher Effekt mit Neutralisierung des neurotoxischen Effekts von β -Amyloid in einer Ko-Kultur von THP1-Makrophagen und Neuronen (Shahraz et al., 2015). In humanen Makrophagen mit fehlender Expression von Siglec-11 und Siglec-16 ließ sich dieser Effekt nicht nachweisen (Karlstetter et al., 2017).

1.4 Altern, Neuroinflammation und Neurodegeneration

1.4.1 Altern und altersassoziierte Veränderungen

Altern, als zeitgebundene Veränderung von Struktur und Funktion biologischer Systeme, ist ein universeller Prozess. In einer engeren Definition werden hiermit die zeitabhängigen Funktionsverluste innerhalb eines Organismus bezeichnet (Lopez-Otin et al., 2023). Es wurden von Lopez-Otin et al. 12 allgemeine Kennzeichen des Alterns identifiziert, welche altersabhängige Veränderungen auf molekularer und zellulärer Ebene kennzeichnen, und über die experimentell die Geschwindigkeit des Alterungsprozesses beeinflusst werden kann. Sie sind dabei nicht isoliert zu betrachten, sondern stehen in zahlreichen komplexen Wechselwirkungen. Sie umfassen die primären, als treibende Kräfte betrachteten Faktoren genomische Instabilität, Verlust der Telomere, epigenetische Veränderungen, Störungen der Protein-Homöostase und

Störungen der Autophagie. Als antagonistische, also initial dem Alterungsprozess entgegen gerichtete Mechanismen, im Verlauf jedoch zu diesem beitragend, werden Fehlregulationen in der Wahrnehmung von Nährstoffen, mitochondriale Dysfunktion und Zellalterung beschrieben. Und zuletzt als integrative Merkmale die Erschöpfung von Stammzellpopulationen, Veränderungen der interzellulären Kommunikation, eine gastrointestinale Dysbiose und chronische Entzündung, also jene, die vornehmlich als Effekt der Schädigung durch die oben genannten Prozesse entstehen, und die als maßgeblich für den resultierenden Funktionsverlust betrachtet werden (Lopez-Otin et al., 2023). Das Nervensystem ist aufgrund seiner Eigenschaften in unterschiedlichen Bereichen für einige der oben beschriebenen Prozesse besonders vulnerabel. So sind postmitotische Neurone besonders empfindlich gegenüber Auswirkungen von genetischen und epigenetischen Veränderungen (Madabhushi et al., 2014). Weiterhin haben sie einen hohen Energiebedarf und sind deshalb auf zahlreiche Mitochondrien angewiesen, deren Dysfunktion eine Rolle bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen spielt (Johri et Beal, 2012).

1.4.2 Neuroinflammation und inflammatorische Marker

Als Neuroinflammation werden alle inflammatorischen Prozesse des Nervensystems zusammengefasst, welche bei einer Störung der Homöostase durch endogene oder exogene Faktoren auftreten. Auf zellulärer Ebene sind im Rahmen dieser Prozesse vor allem die oben beschriebenen Mikroglia und einwandernde periphere Immunzellen relevant (Kölliker-Frers et al., 2021). Wichtige Mediatoren sind inflammatorische Zytokine und Chemokine sowie andere sekundäre Messenger wie NO und reaktive Sauerstoffspezies. Neuroinflammationsprozesse und die an ihnen beteiligten Zellen und Signalmoleküle sind dabei nicht pauschal als vorteilhaft oder nachteilig zu bewerten. Vielmehr ist eine differenzierte Betrachtung nötig, die unter anderem Lokalisation, Kontext, Art, Intensität und Dauer der Entzündungsreaktion einbezieht. Physiologische Aspekte schließen eine Rolle von Immunzellen und insbesondere Mikroglia bei der adulten Neurogenese und bei Gedächtnis- und Lernprozessen ein (Ziv et al., 2006). Nach LPS-induzierter Entzündung zeigte sich hingegen im Hippocampus des

Rattengehirns eine Mikroglia-Aktivierung und eine Hemmung der adulten Neurogenese (Ek Dahl et al., 2003). Für das inflammatorische Cytokin IL1 β konnte in der Zellkultur gezeigt werden, dass es zum Verlust von Synapsen führt (Mishra et al., 2012). TNF α war im Mausmodell einer chronischen Neuroinflammation bei Störungen kognitiver Funktionen bedeutsam (Belarbi et al., 2012). Für die Alzheimer-Erkrankung wurde eine synaptische Dysfunktion vor dem Untergang von Synapsen oder Neuronen gezeigt und war das beste pathologische Korrelat des Verlustes kognitiver Fähigkeiten (Coleman et al., 2004).

Um das Ausmaß der Neuroinflammation in den retinalen Proben zu erfassen, erfolgte neben der immunhistochemischen Färbung von Mikroglia und der Bestimmung der Gentranskription mikroglialer Marker die Quantifizierung der Transkription von TNF α und IL1 β in retinalem Gewebe. IL1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches an der Regulation einer Vielzahl von Prozessen insbesondere des angeborenen Immunsystems beteiligt ist. Effekte einer gesteigerten Expression von IL1 β umfassen unter anderem die Induktion von Fieber, die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, die Synthese von ROS und NO, sowie die Rekrutierung von Leukozyten. Bei der Neuroinflammation ließ sich weiterhin eine Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten nachweisen (Shaftel et al., 2008). Bei einer Reihe von degenerativen Netzhauterkrankungen (unter anderem feuchte AMD und diabetische Retinopathie) wurde eine erhöhte IL1 β -Menge in Glaskörperflüssigkeit und Serum nachgewiesen. Die gesteigerte Expression ließ sich primär durch Mikroglia und infiltrierende Makrophagen in den äußeren Retinaschichten und dem subretinalen Gewebe erklären (Wooff et al., 2019). TNF α ist ein weiterer potenter Entzündungsmediator. Er wird als Transmembranprotein synthetisiert und auf der Zelloberfläche von aktivierten Monozyten/Makrophagen, aktivierten Natürlichen Killerzellen, sowie T-Zellen, aber auch von Endothelzellen und Fibroblasten exprimiert. Er wird durch eine Metalloprotease von der Zelloberfläche gelöst und entfaltet in gebundener oder freier Form seine Wirkung über zwei TNF α -Rezeptoren. Zu den Funktionen von TNF α zählen die Induktion der Apoptose, die Induktion von Entzündungsprozessen mit Expression inflammatorischer Zytokine und Chemokine und

ihrer Rezeptoren, sowie anderer inflammatorischer Mediatoren und die Regulation von Leukozyten und ihrer Funktionen (Sedger et McDermott, 2014).

1.4.3 Altern und Neurodegeneration

Entzündliche Prozesse spielen eine wichtige Rolle im Erhalt der Homöostase, zur Abwehr endogener oder exogener Noxen und bei Reparations- und Regenerationsprozessen. Bei Persistenz des entzündlichen Stimulus oder der Entzündungsreaktion aufgrund unzureichender anti-inflammatorischer Prozesse oder unzureichender Kontrolle proinflammatorischer Prozesse ist jedoch eine Gewebeschädigung durch verschiedene Entzündungseffektoren möglich. Auf systemischer Ebene konnte gezeigt werden, dass im Rahmen des Alterungsprozesses komplexe Veränderungen des Immunsystems auf zellulärer Ebene stattfinden (Alpert et al., 2019). Die Beziehung zwischen der Expression verschiedener inflammatorischer Marker und dem Alterungsprozess ist dabei jedoch ebenfalls komplex und noch unzureichend verstanden (Morrisette-Thomas et al., 2014). In manchen Publikationen wird eine Assoziation des Alters mit der Menge zirkulierender inflammatorischer Marker wie TNF α , IL-6, IL1-Ra, sTNFR und CRP beschrieben (Bruunsgaard et al., 2001). In anderen Studien konnte nur auf der Ebene von Genmodulen für einige Menschen gezeigt werden, dass es altersabhängig zu einer höheren Expression von Genmodulen kommt, in denen unter anderem IL1 β und Inflammasom-Komponenten enthalten sind, und aus deren Expression eine stabile Expression von IL1 β sowie Störungen des Nukleotid-Stoffwechsels und vermehrter oxidativer Stress resultieren (Furman et al., 2017). Im Gehirn nimmt die Expression Mikroglia-spezifischer Gene in unterschiedlichen Gehirnregionen mit dem Alter zu (Soreq et al., 2017), und auch mittels PET-CT in vivo konnte eine Zunahme aktivierter Mikroglia mit dem Alter gezeigt werden (Schuitemaker et al., 2012). In der humanen Retina zeigte sich ebenfalls eine altersabhängige Zunahme der Anzahl von Mikroglia (Yi et al., 2020). Bei Alterungsprozessen wurde eine gesteigerte Expression inflammatorischer Marker im Gehirn vieler Spezies nachgewiesen, welche auch mit morphologischen Veränderungen der Zellen mit einem aktivierteren Phänotyp einherging, bei gleichzeitig gestörter Mikroglia-Regulation

(Norden et Godbout, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl transiente periphere Entzündungen als auch chronische Entzündungen zu einem sogenannten „priming“ von Mikroglia führen (Perry et Holmes, 2014). Dieser Zustand geht mit einer verstärkten und verlängerten Neuroinflammationsreaktion nach Stimulation des Immunsystems einher (Godbout et al., 2005), einer höheren basalen Expression inflammatorischer Marker und einer niedrigeren Aktivierungsschwelle (Norden et al., 2015). Die zirkulierenden inflammatorischen Zytokine und andere inflammatorische Mediatoren aus der Peripherie wirken über verschiedene Wege auf das zentrale Nervensystem und rufen dort eine Entzündungsreaktion hervor, welche zu einer Exazerbation neuronaler Schädigung führen kann (Perry et al., 2003). Im Kontext von Tiermodellen neurodegenerativer Erkrankungen (Alzheimer-Erkrankung, Parkinson-Erkrankung, Prionenerkrankungen und Multiple Sklerose) konnte durch die nach dem „priming“ erfolgte entzündliche Reaktion eine ausgeprägtere Gewebeschädigung gefunden werden (Perry et Holmes, 2014). Beim Menschen konnte für 45-65 Jährige mit erhöhten Blutspiegeln inflammatorischer Marker ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer neurodegenerativen Erkrankung gezeigt werden (Walker et al., 2019) sowie ein geringeres Hirnvolumen 24 Jahre später (Walker et al., 2017). In einer anderen Studie fand sich eine Assoziation zwischen viralen Infektionen und dem Risiko, an einer neurodegenerativen Erkrankung zu erkranken (Levine et al., 2023).

Neurodegeneration ist ein Prozess, bei dem es zum Untergang von Nervenzellen kommt. Bei neurodegenerativen Erkrankungen führt dies im Verlauf zu einer Vielzahl klinischer Syndrome. Das Alter ist dabei der wichtigste Risikofaktor für neurodegenerative Erkrankungen. Es wird angenommen, dass Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene in bestimmten Hirnregionen Jahre vor dem Auftreten klinischer Symptome stattfinden (Katsuno et al., 2018). Bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen lässt sich eine Dysregulation immunologischer Prozesse nachweisen, welche mit persistierender und chronischer Inflammation assoziiert ist. Die Genese und die kausalen Zusammenhänge dieser Veränderungen mit Neurodegenerationsprozessen sind in vielen Fällen noch nicht abschließend geklärt. Als kausal beitragende Faktoren werden Proteinaggregate, traumatische ZNS-Schädigung sowie systemische Infektionen diskutiert (Zhang et al., 2023). Bei vielen

neurodegenerativen Erkrankungen ist eine Aggregation von Proteinen nachweisbar, welche direkt oder über die Schädigung von Neuronen und deren Untergang zu einer chronischen Aktivierung von Mikroglia führt, welche dann durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine sowie die Synthese von ROS und NO eine persistierende Entzündung aufrechterhalten, was wiederum zu vermehrter Ablagerung von Proteinaggregaten und zum Untergang von Neuronen und anderen Zellen führt (Zhang et al., 2023). Neben ApoE als bekanntestem genetischem Risikofaktor für die Entwicklung einer Alzheimer-Demenz, konnte auch für TREM2, welches von Immunzellen exprimiert wird und an ihrer Aktivierung und der Stimulation der Phagozytose beteiligt ist, Mutationen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Alzheimer-Demenz gezeigt werden (Carmona et al., 2018). Weiterhin konnten durch genetische Analysen Alzheimer-Demenz-Risikogene identifiziert werden, welche Komponenten des angeborenen Immunsystems und die Mikroglia-Aktivierung steuern (Bellenguez et al., 2022). Für eine Vielzahl von inflammatorischen Signalwegen (unter anderem Toll-like-Rezeptoren, RAGE-Rezeptor, Inflammasomen,...) konnten Veränderungen bei neurodegenerativen Erkrankungen nachgewiesen werden.

1.5 Retina und Altersabhängige Makuladegeneration

Die Retina geht in der embryonalen Entwicklung aus Teilen der Anlage des Gehirns hervor und wird deshalb als Teil des zentralen Nervensystems angesehen. Sie gliedert sich in eine Pars caeca im vorderen Augenabschnitt und eine Pars optica. In letzterer wandeln Fotorezeptoren eingehende Lichtimpulse in elektrochemische Signale um, die teilweise direkt über Bipolarzellen und Ganglienzellen oder zusätzlich über retinale Interneurone in höhere visuelle Zentren geleitet werden. Die äußerste Schicht der Retina stellt das Pigmentepithel dar, welches zwischen der Choroidea und den Fotorezeptoren lokalisiert ist. Darauf folgt die Schicht der Fotorezeptoren. Dabei lassen sich Stäbchen mit hoher Lichtempfindlichkeit zur Wahrnehmung von Helligkeitsunterschieden und Zapfen insbesondere zur Wahrnehmung von Farbunterschieden differenzieren. Ihre Perikaryen befinden sich in der der äußeren Grenzschicht aufliegenden äußeren Körnerschicht. In der folgenden äußeren

plexiformen Schicht befinden sich die Synapsen zwischen den Fotorezeptoren und den Bipolarzellen, sowie den Horizontalzellen als retinalen Interneuronen. In der sich anschließenden inneren Körnerschicht finden sich die Perikaryen der Bipolarzellen, Horizontalzellen, sowie der amakrinen Zellen, einem weiteren Interneuronentyp, und der Müller-Zellen. Die Müller-Zellen sind die Gliazellen der Retina. In der folgenden inneren plexiformen Schicht sind die Synapsen zwischen Bipolarzellen und Ganglienzellen lokalisiert, sowie die Synapsen beider Zelltypen mit amakrinen Zellen. In der Ganglienzellschicht folgen die Perikarya der Optikusganglienzellen sowie eines Teils der amakrinen Zellen. Es folgen noch die Nervenfaserschicht mit den Axonen der Ganglienzellen und die innere Grenzschicht mit den Endfüßchen der Müller-Zellfortsätze und der Basallamina (Lüllmann-Rauch, 2015).

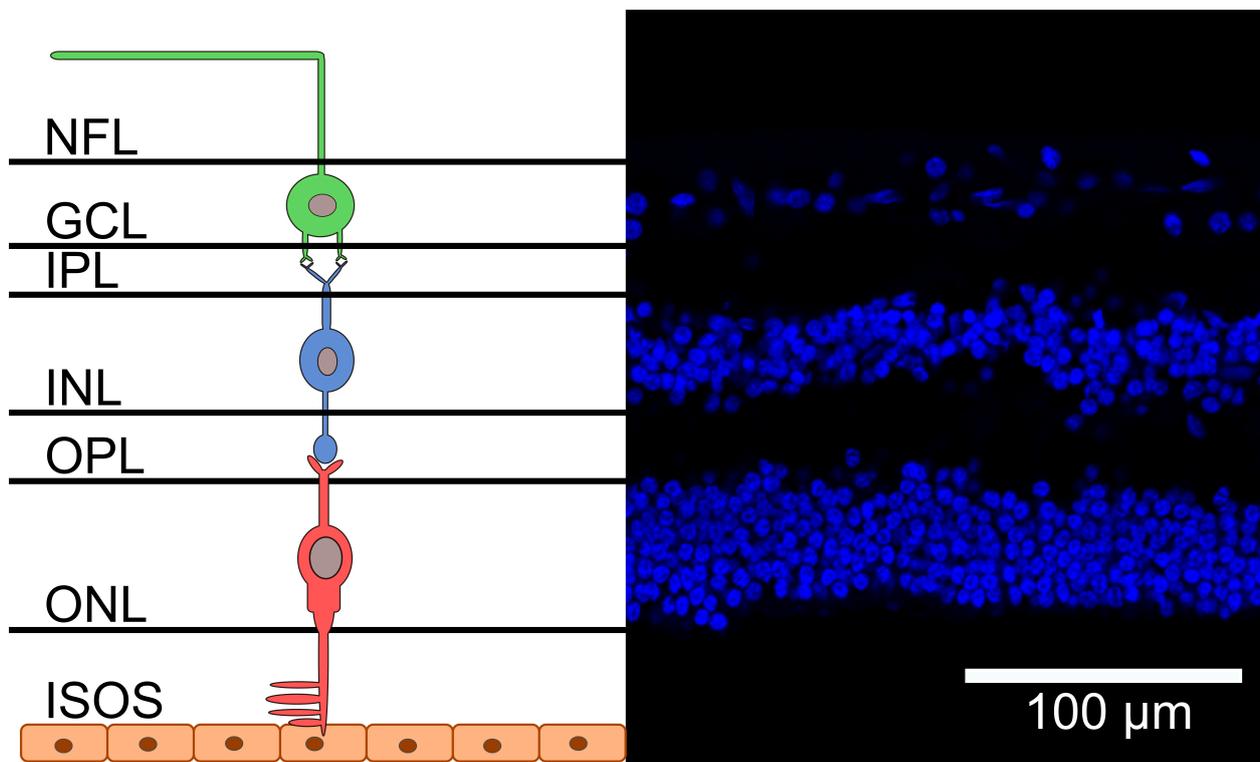


Abb. 2: Schematische Darstellung der ersten drei Neurone der Sehbahn und ihrer Lage in den retinalen Schichten (Nervenfaserschicht (NFL), Ganglienzellschicht (GCL), innerer plexiformer Schicht (IPL), innerer Körnerschicht (INL), äußerer plexiformer Schicht (OPL), äußerer Körnerschicht (ONL), und inneren und äußeren Segmenten der Fotorezeptoren (ISOS)). Auf der linken Seite ist schematisch eine Zapfenzelle (rot) gezeigt in der die photoelektrische Transduktion stattfindet. Es erfolgt eine Weiterleitung über die Bipolarzelle (blau) an eine Ganglionzelle (grün). Auf der rechten Seite ist eine konfokalmikroskopische Aufnahme der humanen Retina mit Färbung der Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol). Das Pigmentepithel war aufgrund der Präparation

der Proben meist nicht erhalten. Die schematische Darstellung erfolgt ohne Gliazellen und retinale Interneurone.

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist für 8,7 % der Erblindungen weltweit verantwortlich und die häufigste Ursache von Blindheit in industrialisierten Ländern (Wong et al., 2014). Dabei ist Alter ein wichtiger Risikofaktor. In einer Metaanalyse zur Prävalenz in Europa wurde im Alter vom 55.-59. Lebensjahr eine Prävalenz von 3,5 % ermittelt, welche im Alter von 85 oder älter auf 17,6 % stieg (Colijn et al., 2017). Weitere klinische Risikofaktoren bestehen im Rauchen, einer zurückliegenden Katarakt-Operation, sowie einer positiven Familienanamnese (Chakravarthy et al., 2010). Die wichtigsten genetischen Risikofaktoren sind Varianten in Genen des Komplementsystems, des HDL-Stoffwechsels, sowie des Bindegewebsstoffwechsels und der Angiogenese (Seddon, 2017). Ein zentraler Aspekt der Pathophysiologie ist eine Dysfunktion und im Verlauf Degeneration des retinalen Pigmentepithels. Es zeigen sich morphologische Veränderungen der Zellen des Pigmentepithels und Störungen des Zytoskeletts (Tarau et al., 2019), welche in späteren Stadien der AMD mit einer Störung der Blut-Retina-Schranke einhergehen, nachweisbar durch intraretinale Plasmaproteine (Schultz et al., 2019). In der Zellkultur gealterter Pigmentepithelzellen kommt es zu einer vermehrten Synthese proinflammatorischer Zytokine, welche mutmaßlich für die Entstehung eines proinflammatorischen Milieus verantwortlich sind (Sreekumar et al., 2022). In späten Stadien der AMD lassen sich Komplementproteine in Drusen nachweisen (Johnson et al., 2000) und die verstärkte lokale Expression verschiedener Chemokine (Agrawal et al., 2019). Ein weiterer zentraler Aspekt ist die Bildung von extra- und intrazellulären Ablagerungen. Diese werden durch eine bei AMD nachweisbare Störung der Autophagie und des Lipidstoffwechsels begünstigt. Durch die Ablagerungen und eine Verdickung der Bruch-Membran über die altersabhängige Verdickung hinaus kommt es zu einer Störung von Transportvorgängen mit konsekutiver Störung des Stoffaustauschs (Wong et al., 2022). Extrazellulär lassen sich zwischen Pigmentepithel und Choroidea sogenannte Drusen nachweisen, die aus zellulären Bestandteilen des Pigmentepithels, Proteinen u.a. des Immunsystems, sowie Lipiden und Kohlenhydraten zusammengesetzt sind. Ihre Ablagerung fördert die Rekrutierung von Mikroglia und von peripheren mononukleären Phagozyten in subretinalen

Gewebeschichten, welche eine weniger verzweigte Morphologie zeigen und durch ihre Akkumulation und die Synthese proinflammatorischer Zytokine zur Degeneration des Pigmentepithels beitragen können (Rashid et al., 2019). Intrazellulär finden sich in Pigmentepithelzellen Ablagerungen von Lipofuszin und Melanolipofuszin, welche über vermehrten oxidativen Stress zur Pigmentepithel-Dysfunktion beitragen (Rozanowska et al., 2004). Es wird eine trockene und eine feuchte Form der AMD unterschieden. Bei der trockenen Form lassen sich insbesondere eine Hypopigmentierung und eine Atrophie des Pigmentepithels nachweisen, sowie im Verlauf der Verlust von Fotorezeptoren. Bei der feuchten Form kommt es zusätzlich zur Entstehung abnormaler Gefäße in Choroidea oder Retina. Als Folge dessen können ein Makulaödem, subretinale Blutungen und im Verlauf fibröse Narben entstehen, was zu Dysfunktion und Degeneration der Fotorezeptoren beiträgt (Wong et al., 2022). In einem Mausmodell der feuchten AMD-Form mit laserinduzierter Schädigung der Retina von transgenen Siglec-11-exprimierenden- und wildtyp-Mäusen wurde die Wirkung einer niedrigen und einer höheren Dosis von intravitreal applizierten Polysialinsäuren mit einem durchschnittlichen Polymerisierungsgrad von 20 untersucht. Bezüglich der nach Laserschädigung auftretenden subretinalen Akkumulation und der Aktivierung von Mikroglia und Makrophagen zeigte sich bei den transgenen Mäusen eine signifikante Reduktion. In wildtyp-Tieren trat diese erst bei der höheren Dosis Polysialinsäuren auf. Bei der Gefäßleckage zeigte sich ein ähnliches Bild mit reduzierter Leckage nach intravitrealer Applikation von Polysialinsäuren. Die Komplement-vermittelte Ablagerung von Membranangriffskomplexen war effektiv und dosisabhängig reduziert, was jedoch vom Genotyp der Tiere unabhängig war (Karlstetter et al., 2017).

1.6 Ziele der Arbeit

Seit der erstmaligen Isolation von Sialinsäuren 1936 durch G. Blix (Blix, 1936) und ihrer ersten Untersuchung im menschlichen Auge und seinen Strukturen 1962 durch H. M. Haddad (Haddad, 1962) wurde eine Vielzahl von Verfahren entwickelt um Mono-, Oligo- und Polysialinsäuren nachzuweisen. Ein umfangreicheres Wissen zu dem Vorkommen von verschiedenen Mono-, Oligo- und Polysialinsäuren und damit assoziierten Prozesse

ist die Basis für ein besseres Verständnis ihrer Relevanz bei physiologischen und pathologischen Prozessen.

Ziel der Arbeit war die Untersuchung des Vorkommens von Sialinsäuren unterschiedlicher Kettenlänge in der humanen Retina mithilfe verschiedener Verfahren, welche teilweise neu etabliert wurden. Es sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Alter und der Oligo-/Polysialinsäurekonzentration besteht, und ob das Transkriptionsmuster von Sialyltransferasen einen Hinweis auf den Mechanismus möglicher Veränderungen gibt. Zudem war es von Interesse, eine Beziehung herzustellen zwischen einerseits der Entzündungsaktivität in retinalem Gewebe, welche durch Anzahl und Aktivität von Mikroglia, sowie der Transkription inflammatorischer Zytokine erhoben wurde, und andererseits der Oligo-/Polysialinsäurekonzentration. Die primäre Arbeitshypothese war, dass es mit dem Alter und einer damit einhergehenden Zunahme von entzündlichen Reaktionen im Körper zu einer Abnahme insbesondere langkettiger Sialinsäure-Polymere kommt. Mit der Analyse von inflammatorischen Markern und der Transkription von Sialyltransferasen sollten Hinweise auf mögliche zugrundeliegende Mechanismen untersucht werden.

Konkret sollten erste Hinweise zur Beantwortung folgender Fragen an einer Stichprobe gewonnen werden:

-Ist im Alter das Vorkommen von Sialinsäuren unterschiedlicher Kettenlänge in der humanen Retina reduziert?

-Hat das Geschlecht Einfluss auf das Vorkommen von Sialinsäuren unterschiedlicher Kettenlänge in der humanen Retina?

-Welche Beziehung besteht zwischen der Transkription von Sialyltransferasen und dem Vorkommen von Oligo-/Polysialinsäuren? Besteht ein Zusammenhang der Transkription von Sialyltransferasen mit Alter, Geschlecht, dem Vorkommen von Mikroglia oder der Transkription inflammatorischer Marker?

-Welche Beziehung besteht zwischen der Anzahl und Aktivität von Mikroglia und dem Vorkommen verschiedener Sialinsäurepolymere?

-Ist die Gentranskription inflammatorischer Zytokine mit der Transkription von verschiedenen Sialinsäurepolymeren assoziiert?

2. Material und Methoden

2.1 Material

Tab. 1: Chemikalien und Reagenzien

Ampuwa	Fresenius GmbH, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
AquaPoly/Mount	Polysciences Europe GmbH, Hirschberg, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
1-Butanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Deoxynucleotide triphosphates (dNTP) 10 mM	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Double-distilled water (ddH ₂ O)	im Institut gefiltert und autoklaviert
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
N-Acetyl-Neuraminsäure	BioSynth CarboSynth, Staad, Schweiz
Natriumarsenit	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumazid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumperiodat	Honeywell International Inc, Morristown, USA
Normal goat serum (NGS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
O.C.T. TM Compound, Tissue Tek [®]	Sakura Finetek Germany GmbH, Umkirch, Deutschland
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
Paraformaldehyde (PFA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Periodsäure	Honeywell International Inc, Morristown, USA
Phenylmethylsulfonylflourid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

(PMSF)	
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
langkettige α 2-8-Polysialinsäuren	Produktion im Institut
Primer random p(dN) ₆	Roche, Basel, Schweiz
Proteinase-K	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
RIPA (Radioimmunoprecipitation assay)-Puffer	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Salzsäure, 1 M	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure, 12 N (37 %)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure	Honeywell International Inc, Morristown, USA
Streptavidin, HRP-Konjugat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sucrose	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
SuperScript [®] III Reverse Transcriptase	Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, USA
SYBR [®] Green ERTM qPCR Super Mix	Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, USA
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System for ELISA	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
2-Thiobarbitursäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trichloromethan/Chloroform	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)-HCl	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tween 20	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ultra-Pure DEPC treated water	Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, USA

Tab. 2: Puffer und Lösungen

1 M NaOH	40 g NaOH in 1 l deionisiertem Wasser
10x BSA	10 g BSA in 100 ml PBS
Aminoff: Oxidationslösung	25 mM Natriumperodat in 70 mM Schwefelsäure; pH 1-2
Aminoff: Reduktionslösung	2 % Natriumarsenit in 0,5 M HCl
Aminoff: TBA-Lösung	0,1 M Thiobarbitursäure in ddH ₂ O; pH 9
acidic n-butanol	5 ml HCl (37 %), 45 ml 1-butanol
ELISA: Beschichtungspuffer	0,2 M Natriumbicarbonat in sterilem Wasser, pH 9,4
ELISA: Blockingpuffer	0,5 % Gelatine aus Fischhaut in Waschpuffer
ELISA: Waschpuffer	0,15 M Natriumchlorid, 25 mM TRIS-Hydrochlorid, 0,05 % Tween20 in zweifach destilliertem Wasser, pH = 7,2

4 % Paraformaldehyd, pH 7,3	20 g PFA 30 ml 1M NaOH 50 ml PBS (10 x) ad 1 l ddH ₂ O
30 % Sucrose	30 g Sucrose in 100 ml 1 x PBS 0,1 % Natriumazid
Sialinsäurefärbungen: Blockinglösung	10 % Rinderserumalbumin, 5 % Ziegenserum und 0,1 % Triton X-100 in PBS
Iba-1/CD68-Kofärbung: Blockinglösung	10 % BSA und 0,25 % Triton-X-100 in PBS
Iba-1/CD68-Kofärbung: Inkubationslösung	5 % BSA und 0,05 % TritonX-100 in PBS

Tab. 3: Primer

Primer	Vorwärts-Primer (5'-3'-Richtung)	Rückwärts-Primer (5'-3'-Richtung)	Effizienz (%)	Quelle
GAPDH	CTGCACCACCAACT GCTTAG	TTCAGCTCAGGGATG ACCTT	98,49	Jannis Wißfeld
ST3GAL5	AGGAAACCCTGCCA TTCTGG	ACCCGCCAAACTGAC TTCAT	102,23	Primer-BLAST
ST6GAL1	CCTCTGGGATGCTT GGTATCAT	CATAGAGCAGCGGGT GGTAG	100,09	
ST6GALN AC6	CCTCGTGCGTGTGA TCCAG	CTGGCTGCAGTAGTT GGGG	98,66	
ST8SIA1	CATTGAAGAAATGC GCGGTGGTG	CTGAAACCTTTGCCG AATTATGCTGG	102,23	
ST8SIA2	CTTCGTCATCAGGT GCAACC	TTGACCCACTCAACA CGCT	100,32	
ST8SIA3	GGGATTCCGGTCAC AATTTGC	GTGCATCAGTTGTCC AATCCG	101,73	
ST8SIA5	GGATTTGTTGGGGA GCCG AA	GCTCTGCACTGCTGG ATCAT	104,51	
Iba-1	GATGATGCTGGGCA AGAGAT	CCTTCAAATCAGGGC AACTC	101,45	
CD68	GCAACTCGAGCATC ATTCTTTCACC	GATGAGAGGCAGCAA GATGGAC	99,07	Gottfried et al., 2008
TMEM119	CTGGCCTTTCTGCT GATGTTT	TCACTCTGGTCCACG TACTTC	100,75	Jiang et al., 2017
TNF α	CCCTGGTATGAGCC CATCTATC	AAAGTAGACCTGCC AGACTCG	112,7	Sulzbach de Oliveira et al., 2016
IL1 β	CCAGCTACGAATCT CCGACC	TCGTGCACATAAGCC TCGTT	104,84	Jonas Winkler

Tab. 4: Primär-Antikörper

Antigen	Klon	Reaktivität	Wirt	Hersteller
NCAM/CD56	12F8	Maus, Mensch, Ratte	Ratte	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
NCAM/CD56	735	Maus, Mensch, Ratte	Maus	Novus Biologicals, Littleton, USA
Polysialinsäure-NCAM	2-2B	Wirbeltiere	Maus	Millipore, Billerica, USA
A2B5	105	Hund, Huhn, Mensch, Maus, nicht-humane Primaten, Kaninchen, Ratte	Maus	Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, USA
Iba-1	poly-klonal	Maus, Mensch, Schwein	Kaninchen	SynapticSystems, Göttingen, Deutschland
CD68	EBM11	Mensch, Rind, Schaf, Kaninchen	Maus	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark

Tab. 5: Sekundär-Antikörper

Antigen	Konjugat	Reaktivität	Wirt	Hersteller
IgG	Alexa647	Kaninchen	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland
IgG	Biotin	Maus	Ratte	Dianova, Hamburg, Deutschland
IgG	Cy3	Maus	Ziege	Jackson ImmunoResearch Europe LTD., Ely, UK
IgG	Cy3	Ratte	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland

Tab. 6: Kits

Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
SuperScript III Reverse Transcriptase	Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, USA

Tab. 7: Verbrauchsmaterial

Falcon Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt Ag & CoKG, Nümbrecht, Deutschland
Glassflaschen (100, 500, 1000 ml)	Schott-Duran, Mainz, Deutschland
Mikroskop Deckgläser (24 x 60 mm)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Nunc™ Kryoröhrchen 1,8ml	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Nitrilhandschuhe	Ansell Healthcare Europe NV, Anderlecht, Belgien

Nunc MaxiSorp, flacher Boden, 96-Well-ELISA-Platte	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pasteur Pipetten	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Polymerase chain reaction (PCR)-Reaktionsgefäße, 500 µl	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
QPCR Seal optical clear film	PeqLab, Erlangen, Deutschland
QPCR Semi-skirted 96 well PCR-Platte	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Reaktionsgefäße (0.5, 1.5, 2 ml)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Safe-seal micro Reaktionsgefäße (0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml)	Sarstedt Ag & Co KG, Nümbrecht, Deutschland
Stahlkugel (7 mm)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
SuperFrost® Plus Objektträger	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Vacuum driven disposable bottle top filter	Millipore Corporation, Bitterica, USA

Tab. 8: Technische Ausrüstung

-20 °C Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
+4 °C Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
-80 °C Kühlschrank (Hera freeze)	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Biofuge Fresco/ pico (Zentrifuge)	Heraeus GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland
Cell Matell (Pipettierhelfer)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Fluoview1000 Confocal microscope	Olympus, Shinjuku, Japan
HI 9321 Microprocessor pH-Meter	Hanna Instruments, Vöhringen, Deutschland
Megafuge, 1.0 R. (Zentrifuge)	Heraeus, GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland
Microm Cryo Star HM 560	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
NanoDrop 2000c spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Platten-Reader Infinite® 200 Pro	Tecan, Männedorf, Schweiz
Pipetten 2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schüttelgerät (KS-15 Control)	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Deutschland
SP8 Konfokalmikroskop	Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland
Thermocycler T3 (PCR Maschine)	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tissue Lyser LT	Qiagen, Hilden, Deutschland
Vortex Genie2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Waage AC 211S	Sartorius, Göttingen, Germany

Tab. 9: Software

Fiji (Fiji is just ImageJ), Version 1.51s	National Institute of Health, Bethesda, USA
Leica Application Suite X Version 3.5.7.23225	Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland
LibreOffice, Version 7.6.4.1	The Document Foundation, Berlin, Deutschland
NanoDrop 2000/2000c	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Olympus FluoView V3.1	Olympus, Shinjuku, Japan
SPSS, Version 25	IBM, Armonk, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Humanes Retinagewebe

Die menschlichen Retinaprobe n stammen aus der Hornhautbank des Zentrums für Augenheilkunde der Universitätsklinik Köln. Dort werden die Augäpfel nach Explantation der Hornhaut mit dem Einverständnis der Angehörigen zu Forschungszwecken verwendet. Insgesamt wurden Proben von fünf Gewebespendern mit einem Durchschnittsalter von 68,65 Jahren untersucht. Es handelte sich um Proben von zwei weiblichen (Durchschnittsalter 75,92 Jahre) und drei männlichen Gewebespendern (Durchschnittsalter 63,88 Jahre). Von jedem Spender wurden zwei retinale Gewebeprobe n entnommen, eine aus dem rechten und eine aus dem linken Auge. Für die Spender Don #1 und Don #3 liegt eine eindeutige Zuordnung der Proben zu den jeweiligen Augen vor; bei den übrigen Spendern ist die Zuordnung der Proben zu den jeweiligen Augen nicht dokumentiert. Die menschlichen Netzhautproben wurden 7-26h postmortem in Köln durch Mitarbeiter der kollaborierende Arbeitsgruppe von Herrn Professor Langmann (Lehrstuhl für experimentelle Immunologie des Auges) gewonnen und entweder in flüssigem Stickstoff gefroren oder für die histologische Aufarbeitung fixiert. Der Transport nach Bonn erfolgte auf Trockeneis oder normalem Eis.

Die Arbeit wurde in Übereinstimmung mit den Grundsätzen der 2013 revidierten Fassung der ‚Deklaration von Helsinki‘ und dem „Medical Research Involving Human Subjects Act“ durchgeführt. Es liegen Genehmigungen, sowohl der lokalen Ethikkommission des Universitätsklinikums Köln zur Untersuchung der Expression von

Polysialinsäuren in der humanen Retina (Nr. 14/247) als auch des Universitätsklinikums Bonn zur Analyse von krankheitsrelevanten Genen und Proteinen an humanen Geweben des zentralen Nervensystems zur Erforschung von neurodegenerativen Erkrankungen (Nr. 175/14) und der Erforschung von Immunprozessen bei Netzhauterkrankungen (Aktenzeichen: 500/22-EP) vor.

Tab. 10: Vorliegende Informationen zu den Spendern der humanen Retinaproben

Gewebe #	Spender #	Geschlecht	Alter	Todesursache
170900711	Don #1 R	♀	71	Lungenarterienembolie
170890711	Don #1 L			
170932211	Don #2 3	♂	52	Subarachnoidalblutung
170942211	Don #2 4			
180152602	Don #3 R	♂	69	Intracerebrale Blutung
180162602	Don #3 L			
180372106	Don #4 7	♂	69	Schädel-Hirn-Trauma, Subarachnoidalblutung
180382106	Don #4 8			
180511808	Don #5 1	♀	80	Subduralhämatom, Sepsis
180521808	Don #5 2			

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Probenvorbereitung für die biochemischen Analysen

Das Netzhautgewebe wurde in Köln in kleine Stücke geschnitten und in 1 ml RIPA-Puffer gegeben, anschließend auf Trockeneis transportiert und bei -80 °C gelagert. Nach dem schonenden Auftauen auf Eis wurde das Gewebe durch eine 7 mm Stahlkugel mithilfe eines TissueLyser mit 50 Hz für 6 min lysiert.

2.2.2.2 Quantifizierung der gesamten Sialinsäuren

Die Quantifizierung der gesamten Sialinsäuren erfolgte durch die Aminoff Methode. Für die folgenden Schritte wurden 200 µl des Gewebehomogenats verwendet. Die saure Hydrolyse der Sialinsäureketten zu Sialinsäuremonomeren erfolgte durch Zugabe von 28 µl ml einer 1 molaren Salzsäure und anschließender Inkubation bei 80 °C und einer

Drehzahl von 600 Umdrehungen pro Minute für 1 h in einem Thermomixer. Anschließend erfolgte die Kühlung der Proben auf Raumtemperatur auf Eis und die Zentrifugation mit 7200 Umdrehungen pro Minute für 5 min bei Raumtemperatur. Es wurden für jede Probe jeweils dreimal 50 µl des so gewonnenen Überstands für die anschließenden Schritte verwendet. Die Standardkurve wurde durch die Zubereitung von Standards mit 0, 1, 5, 10 und 15 µg Neu5Ac in 50 µl sterilem Wasser erzeugt und bei jedem Experiment repliziert. Alle weiteren Schritte erfolgten parallel für die Proben und die Standards. Zur Oxidation der Sialinsäuren wurden 25 µl einer 25 mM Natriumperiodat-Lösung (25 mM Natriumperiodat in 70 mM Schwefelsäure, pH 1-2) zugegeben und bei 37 °C und 600 Umdrehungen pro Minute für 30 min in einem Thermomixer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl Natriumarsenit (2 % Natriumarsenit in 0,5 M Salzsäure) gestoppt und die Lösung gründlich bis zum Verschwinden einer nach der Zugabe auftretenden gelben Färbung gemischt. Es erfolgte die Zugabe von 200 µl einer 0,1 M 2-Thiobarbitursäure (0,1 M 2-Thiobarbitursäure in zweifach destilliertem Wasser, pH 9) und die sofortige Inkubation bei 98 °C und 600 Umdrehungen pro Minute für 7,5 min in einem Thermomixer zur Induktion der Bildung eines roten Farbstoffs. Dieser wurde anschließend durch Zugabe von 400 µl Butanol (10 % 6 M Salzsäure in 1-Butanol) und gründliches Mischen mit anschließender Zentrifugation mit 4000 Umdrehungen pro Minute für 2 min in der oberen, organischen Phase extrahiert, und es wurden dreimal je 100 µl in die Wells einer 96 Well-Platte gegeben. Die Extinktion wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen und die Konzentration der gesamten Sialinsäuren mithilfe der Standardkurve berechnet. Alternativ wurde für Bereiche geringer Sialinsäuremengen bei einer Anregungswellenlänge von 555 nm die Fluoreszenz bei 585 nm gemessen. Bei der Analyse der menschlichen Retinaproben wurde aufgrund der geringen Sialinsäurequantitäten die Fluoreszenzmessung durchgeführt.

2.2.2.3 Quantifizierung der Polysialinsäuren

Die langkettigen Sialinsäuren wurden mit einem Sandwich-ELISA quantifiziert. Es wurden 400 µl des Gewebehomogenats mit 13.000 Umdrehungen pro Minute für 20 min

zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend einem Proteinase-K-Verdau unterzogen, bei dem zu 350 µl des Überstands 3,5 µl einer Proteinase-K-Lösung (20 µg/µl) gegeben wurden und die Lösung für 2 h bei 37 °C und 400 Umdrehungen pro Minute in einem Thermomixer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 17,5 µl Phenylmethylsulfonylflourid (0,1 PMSF in Ethanol) gestoppt und die Probe bei -80 °C gelagert. Am ersten Tag des Experiments wurde der Capture-Antikörper (Ratte anti Maus CD56 IgM, Klon 12F8, 1:500, 100 µl pro Well in Beschichtungspuffer), verdünnt in einem Beschichtungspuffer (0,2 M Natriumbicarbonat in sterilem Wasser, pH 9,4) in die Wells der ELISA-Platte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am zweiten Tag erfolgte nach Entfernung der Lösung ein Waschschrift, bei dem dreimal für 5 min mit 200 µl eines Waschpuffers (0,15 M Natriumchlorid, 25 mM TRIS-Hydrochlorid, 0,05 % Tween20 in zweifach destilliertem Wasser, pH = 7,2) pro Well auf einem Laborschüttler mit 40 Umdrehungen pro Minute gewaschen wurde. Nach den Waschschriften wurde die Flüssigkeit jeweils durch Klopfen aus der Platte entfernt. Nach dem letzten Waschschrift wurden letzte Reste des Waschpuffers sorgfältig mit einer Pipette aus den Wells entfernt. Anschließend erfolgte zur Reduktion der unspezifischen Bindung die Zugabe von 300 µl eines Blockingpuffers (0,5 % Gelatine aus Fischhaut in Waschpuffer) pro Well für 1 h bei Raumtemperatur. Zur genauen Quantifizierung mithilfe einer Standardkurve wurden in jedem Experiment Standards mit Konzentrationen von 0 bis 10 ng/ml Polysialinsäuren analysiert. Diese wurden durch Verdünnung eines von Jonas Winkler (Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universitätsklinikum Bonn) zur Verfügung gestellten Standards mit Polysialinsäuren mit einem durchschnittlichen Polymerisierungsgrad von 60 (Bestimmung durch Vibha Anantha Simha) mit Waschpuffer gewonnen. Nach der Entfernung des Blockingpuffers erfolgte die Zugabe von 100 µl des Überstands oder der Standards pro Well und eine Inkubation über Nacht bei 4 °C. Am dritten Tag erfolgte, nach einem Waschschrift (wie oben beschrieben) die Zugabe des ersten Detektions-Antikörpers (Maus anti Polysialinsäure IgG2a, Klon 735, 1:200, 100 µl pro Well in Blockingpuffer) und eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur. Nach einem erneuten Waschschrift (siehe oben) erfolgte die Inkubation mit dem zweiten, Biotin-konjugierten Detektions-Antikörper (Biotin-SP-konjugiert Ratte anti Maus IgG AffiniPure, 1:8418,37, 100 µl pro Well in Blockingpuffer) für 1 h bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschschrift (siehe oben) erfolgte die

Zugabe von Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Streptavidin (Streptavidin HRP-Konjugat, 1:1000, 100 µl pro Well in Blockingpuffer) für 1 h bei Raumtemperatur, welches mit hoher Affinität an Biotin bindet. Nach einem erneuten Waschschriff (siehe oben) wurden 100 µl Tetramethylbenzidin (TMB), ein Substrat der Meerrettichperoxidase aus dem sie einen blauen Farbstoff bildet, zugegeben. Die Reaktion wurde nach 10 min durch die Zugabe von 100 µl 1 M HCl gestoppt, die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm spektrophotometrisch bestimmt und die Menge der langkettigen Sialinsäuren mithilfe der Standardkurve berechnet.

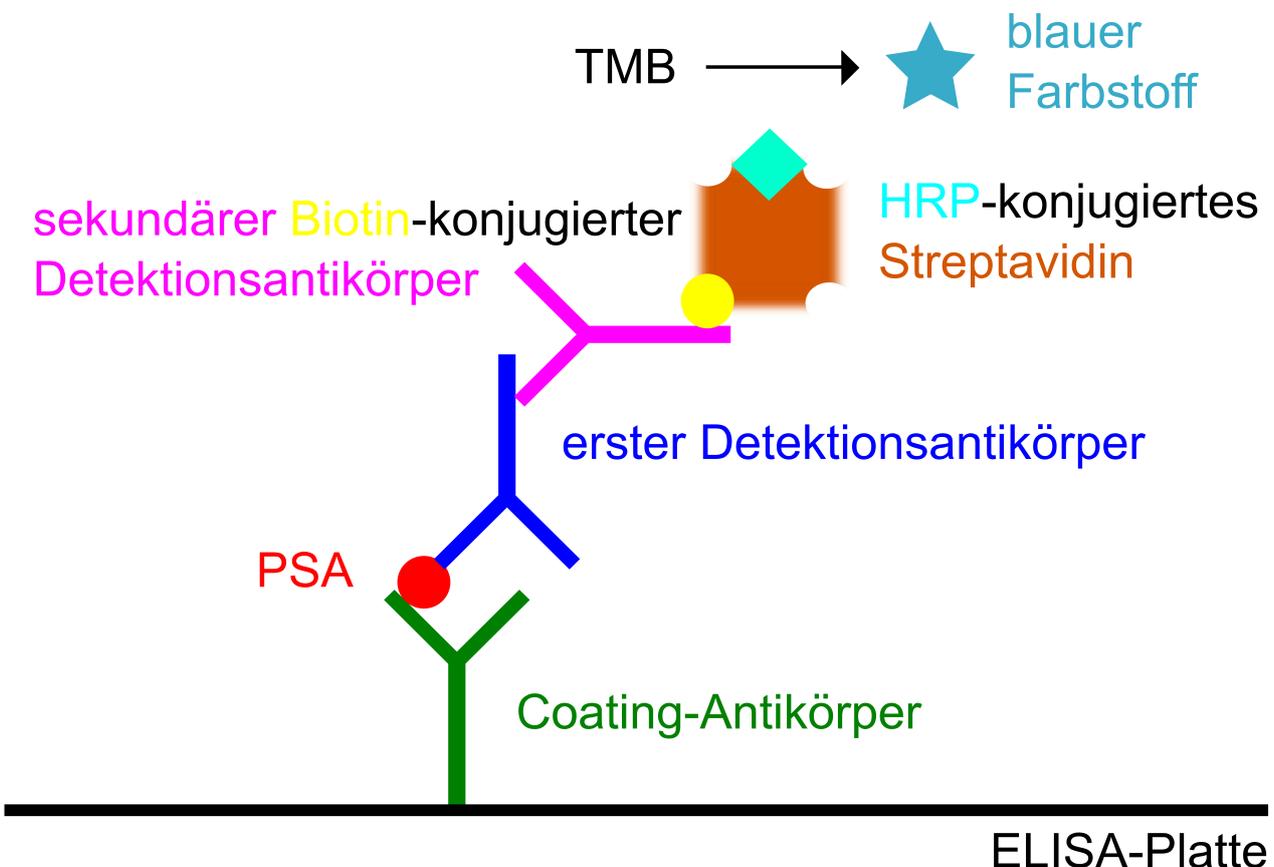


Abb. 3: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA zur Detektion von Polysialinsäuren (polysialic acid; PSA). Es wurde eine 96-well Platte mit hydrophiler Oberfläche gewählt um eine optimale Adsorption des Coating-Antikörpers (grün) zu ermöglichen. Da zur abschließenden Analyse die Extinktion beziehungsweise die Fluoreszenz bestimmt wurde, wurde eine Platte mit flachen, transparenten Wells verwandt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Coating-Antikörpers mit spezifischer Bindung an Polysialinsäuren, welche zum Beispiel an Neutrales Zelladhäsionsmolekül 1 (neural cell adhesion molecule; NCAM-1), auch CD56 (Cluster of differentiation 56) genannt, gebunden sein können. Nach entsprechender Vorbereitung des Gewebes erfolgte dann die Zugabe der biologischen Probe mit enthaltenen Polysialinsäuren

beziehungsweise verdünnter Polysialinsäure-Standards mit einem durchschnittlichen Polymerisierungsgrad von 60. Im nächsten Schritt wurde ein erster Detektionsantikörper (blau) aufgebracht, welcher ebenfalls Polysialinsäuren bindet, jedoch an einem vom Coating-Antikörper verschiedenem Epitop. Dann wurde ein sekundärer Biotin-konjugierter-Detektionsantikörper (pink), welcher spezifisch an den ersten Detektionsantikörper bindet hinzugegeben. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiertem Streptavidin, welches mit hoher Affinität an das Biotin des sekundären Detektionsantikörpers bindet. Im vorletzten Schritt wurde Tetramethylbenzidin (TMB), das Substrat der Meerrettich-Peroxidase hinzugegeben und die Reaktion in der ein anschließend messbarer Farbstoff entstand, nach einer Zeit von 10 Minuten durch Zugabe von 1 molarer Salzsäure gestoppt. Zur abschließenden Quantifizierung erfolgte die spektrophotometrische Bestimmung der Extinktion der farbigen Lösung bei einer Wellenlänge von 450 nm und die Menge der langkettigen Polysialinsäuren wurde mithilfe einer Standardkurve berechnet.

2.2.2.4 Quantifizierung der Proteine

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem bicinchoninic acid assay (BCA Assay). Der BCA Assay ist eine Methode zur Quantifizierung der gesamten Proteinmenge in einer Probe, welcher auf zwei chemischen Reaktionen basiert. Durch die reduzierende Wirkung der Proteinbindungen findet in alkalischer Lösung die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} statt (Biuretreaktion). Die Bildung von Cu^{1+} ist dabei proportional zur Menge an Proteinen. In einer folgenden Reaktion bilden zwei Moleküle der Bicinchoninsäure einen violetten Chelatkomplex mit dem einwertigen Kupfer, dessen Extinktion spektrophotometrisch bei 562 nm bestimmt werden kann. Zur Proteinbestimmung wurden 400 μl des Gewebehomogenats mit 13.000 Umdrehungen pro Minute für 20 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. 20 μl des Überstands wurden mit 80 μl sterilem Wasser gemischt und die Probe anschließend mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit analysiert. Es wurde nach Angaben des Herstellers (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) verfahren. Die Quantifizierung erfolgte durch Messung der Extinktion mit einem Mikrovolumen-Spektralphotometer bei 562 nm. Die in mg/ml gemessene Proteinkonzentration wurde mit fünf multipliziert um die ursprüngliche Proteinkonzentration in dem Überstand vor der Verdünnung zu erhalten.

2.2.3 Immunhistochemie

2.2.3.1 Probenvorbereitung für die Immunhistochemie

Die menschlichen Retinaprobe der Gewebespende wurden post-mortem präpariert und in 4 % PFA bei 4 °C für 24 h fixiert. Die anschließende Lagerung bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte in PBS mit 30 % Sucrose bei 4 °C. Das Gewebe wurde in OCT Compound eingebettet und mit einem Cryostat in 20 µm dicke Schnitte geschnitten, welche auf Objektträger aufgenommen und anschließend bei -20 °C gelagert wurden. Vor der Färbung wurden die Schnitte für 10-15 min luftgetrocknet und mit PBS rehydriert.

2.2.3.2 Färbung von Sialinsäuren unterschiedlicher Kettenlänge

Initial erfolgte ein Blocking-Schritt mit einer Blocking-Lösung aus 10 % Rinderserumalbumin, 5 % Ziegen Serum und 0,1 % Triton X-100 in PBS für 20-30 min bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden anschließend mit primären Antikörpern gegen Polysialinsäuren (Maus anti Maus PSA-NCAM, Klon 2-2B; 1:500 in PBS, sowie Ratte anti Maus CD56, Klon 12F8; 1:200 in PBS) oder Trisialinsäuren (Maus anti A2B5, Klon 105; 1:200 in PBS) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Eine Sekundärantikörper-Kontrolle wurde durch Inkubation mit PBS statt mit den primären Antikörpern durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte nach drei fünfminütigen Waschschritten mit PBS mit den sekundären Antikörper (Cy3 Ziege anti Maus-IgG; 1:250 in PBS oder Cy3 Ziege anti Ratte-IgG; 1:500 in PBS) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten wurden die Zellkerne mit DAPI (1:10.000 in PBS) gefärbt und die Schnitte mit AquaPoly/Mount und einem Deckglas bedeckt. Für jede Färbung wurden jeweils drei Schnitte aus den beiden Proben der rechten und linken Augen eines jeden Gewebespenders angefärbt. Mit einem konfokalen Mikroskop wurden von jedem der Schnitte drei Bilder aufgenommen. Die verschiedenen Retinaschichten wurden mithilfe von Fiji eingekreist und die hintergrundkorrigierte Dichte der Färbung bezogen auf die Fläche bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mithilfe von LibreOffice Calc berechnet.

2.2.3.3 Kofärbung von Iba-1 und CD68

Zuerst wurde ein Blocking-Schritt mit einer Blocking-Lösung (10 % Rinderserumalbumin und 0,25 % Triton-X-100 in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte mit primären Antikörpern gegen Iba-1 (Kaninchen anti Iba-1/AIF1, polyklonal; 1:500) und CD68 (Maus anti Mensch CD68, Klon EBM11; 1:500), jeweils verdünnt in einer Inkubationslösung (5 % Rinderserumalbumin und 0,05 % Triton-X100 in PBS) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Eine Sekundärantikörper-Kontrolle wurde durch Inkubation nur mit Inkubationslösung ohne vorherige Zugabe eines primären Antikörpers durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte fünfmal für je 5 min mit PBS gewaschen und mit sekundären Antikörpern (Cy3 Ziege anti Maus-IgG, 1:250 und Alexa647 konjugierter Ziege anti Kaninchen-IgG, 1:500) verdünnt in PBS für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten dreimaligen Waschschrift wurden die Zellkerne mit DAPI (1:10.000 in PBS) gefärbt und die Schnitte mit AquaPolymount und einem Deckglas bedeckt. Von jedem Gewebespender wurden drei Schnitte gefärbt und mithilfe eines konfokalen Mikroskops analysiert. Dazu wurden von jedem Schnitt drei z-stacks mit je fünf Bildern im Abstand von 2 μm angefertigt. Für die Analyse wurden eine z-Projektion der z-stacks verwendet. Zur Quantifizierung der CD68-Färbung wurden die verschiedenen Retinaschichten mithilfe von Fiji umrahmt und die hintergrundkorrigierte Intensität der Färbung bezogen auf die Fläche gemessen. Zur Quantifizierung der Iba-1-Färbung wurden die Iba-1-positiven Zellen in den einzelnen Schichten manuell gezählt und zum Volumen ins Verhältnis gesetzt. Daraus wurde die Zahl der Iba-1-positiven Zellen pro 800.000 μm^3 berechnet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mithilfe von LibreOffice Calc berechnet.

2.2.4 Gentranskriptionsanalysen

2.2.4.1 Probenvorbereitung für die Gentranskriptionsanalysen

Das Netzhautgewebe wurde in Köln in 1 ml Qiazol gegeben. Der Transport erfolgte auf Trockeneis und die Lagerung bei -80 °C. Nach dem schonenden Auftauen auf Eis wurde

die Probe mit dem TissueLyser durch eine 7 mm Stahlkugel bei 50 Hz zweimal für 3 min homogenisiert.

2.2.4.2 Isolation der RNA

Die Isolation der RNA erfolgte mithilfe des RNeasy Kits nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die genomische DNA wurde mithilfe des RNase free DNase-Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit Hilfe von DNase I entfernt. Die RNA wurde anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.4.3 Reverse Transkription

Die RNA wurde auf Eis aufgetaut. Es wurden je 1 µl zufällige, hexamere Primer und 1 µl Desoxyribonukleotid-Mix in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden 11 µl der RNA zugegeben und die Proben wurden mit einem Thermocycler revers transkribiert. Das Programm beinhaltete zwei initiale Inkubationsschritte (65 °C für 5 min und 4 °C für 5 min) zur Anlagerung der zufälligen Primer an die RNA. Dann erfolgte die Zugabe von 4 µl eines Einzelstrang-Puffers, 2 µl 0,1 M Dithiothreitol, sowie 1 µl der Superscript III reversen Transkriptase. Anschließend erfolgte die DNA-Polymerisation durch Inkubation bei 25 °C für 5 min und anschließend bei 50 °C für 1 h. Die Enzyme wurden abschließend durch 15 min Erhitzung auf 70 °C inaktiviert. Die cDNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

2.2.4.4 Quantitative real-time PCR

Die cDNA wurde auf Eis aufgetaut und die Konzentration mit einem Mikrovolumen-Spektralphotometer bestimmt. Die Primer wurden mit sterilem Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/µl verdünnt. Anschließend wurde die DNA mit DEPC-behandeltem Wasser auf eine Konzentration von 100 ng/µl verdünnt und je 2 µl in die Wells einer PCR-Platte gegeben. Eine negative Kontrolle enthielt steriles Wasser ohne

cDNA. Dann wurden pro Well je 1 μ l Vorwärts-Primer, 1 μ l Rückwärts-Primer, 8,5 μ l DEPC-behandeltes Wasser, sowie 12,5 μ l SYBR-Green hinzugegeben. Nach Versiegelung und Zentrifugation der Platte erfolgte die PCR-Reaktion in einem PCR-Gerät. Das Programm des Geräts beinhaltete nach einem initialen Denaturierungsschritt (8,5 min bei 95 °C) 38 Zyklen aus Denaturierung (95 °C für 15 sec), Annealing (60 °C für 30 sec) und Elongation (72 °C für 30 sec). Abschließend erfolgte die Bestimmung der Schmelzkurve (95 °C für 1 min, 55 °C für 15 sec, 95 °C für 15 sec) bei einer Rampen-Anstiegsrate von 20 min. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt und Mittelwert und Standardabweichung der CT-Werte wurden mit LibreOffice Calc berechnet. Anschließend erfolgte die Berechnung des delta-CT-Werts (Δ CT-Wert) durch Subtraktion des CT-Werts von GAPDH (Haushaltsgen) vom CT-Wert des Gens von Interesse.

2.2.5 Statistische Analyse

Zum Vergleich der Mittelwerte von zwei Gruppen wurde der t-Test verwendet. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Alternativ wurde bei fehlender Varianzhomogenität der Welch-Test als robustes Testverfahren angewandt. Zur Testung auf Normalverteilung wurden der Kolmogorow-Smirnov- und der Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Zur Überprüfung der Voraussetzungen der Varianzhomogenität kam der Levene-Test zum Einsatz. Als Post-Hoc-Test wurde bei gegebener Varianzhomogenität der Bonferroni-Test eingesetzt, bei fehlender Varianzhomogenität wurde der Games-Howell-Test verwendet. Bei den Korrelationsanalysen wurden ebenfalls der Kolmogorow-Smirnov- und der Shapiro-Wilk-Test verwandt, um auf Normalverteilung zu prüfen. Anschließend wurde je nach Erfüllung der Voraussetzungen entweder der Pearson-Korrelationskoeffizient (Intervallskala/Rationalskala, Normalverteilung und Linearität gegeben) oder der Spearman-Korrelationskoeffizient (Ordinalskala, Voraussetzungen (Normalverteilung, Linearität) nicht erfüllt) berechnet. Der Vergleich von Korrelationskoeffizienten erfolgte mittels einer Fisher-z-Transformation. Es ist immer ein zweiseitiger p-Wert angegeben. Die statistischen Analysen wurden mit SPSS Version 25 durchgeführt.

Es gelten folgende Signifikanzintervalle:

*** $p < 0,001$

** $p < 0,01$

* $p < 0,05$

n.s. $p \geq 0,05$

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung der Analysemethoden

3.1.1 Etablierung der Aminoff-Methode zur Quantifizierung der gesamten Sialinsäuren in Gewebeproben der Retina

Die Aminoff-Methode (Aminoff, 1961) zur Bestimmung der Gesamtsialinsäurekonzentration war bereits laborintern als Standardmethode etabliert, weshalb nur noch ein Protokoll für die Vorbereitung von Gewebeproben der Retina für die Analyse mittels Aminoff-Methode erarbeitet werden musste. Die für die Experimente verwandten Mäuseorgane wurden von Dr. Anahita Shahraz, Dr. Jannis Wißfeld und Dr. Christine Klaus (Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universitätsklinikum Bonn) zur Verfügung gestellt. Zur Freisetzung der Sialinsäuren aus dem Gewebe wurde die schon in der Erstbeschreibung von Aminoff 1961 genannte Methode der sauren Hydrolyse unter Hitzeeinwirkung angewandt. Es konnte gezeigt werden, dass sich durch die Kombination aus Hitze und einem sauren Milieu die in biologischen Proben gemessene Sialinsäuremenge steigern ließ.

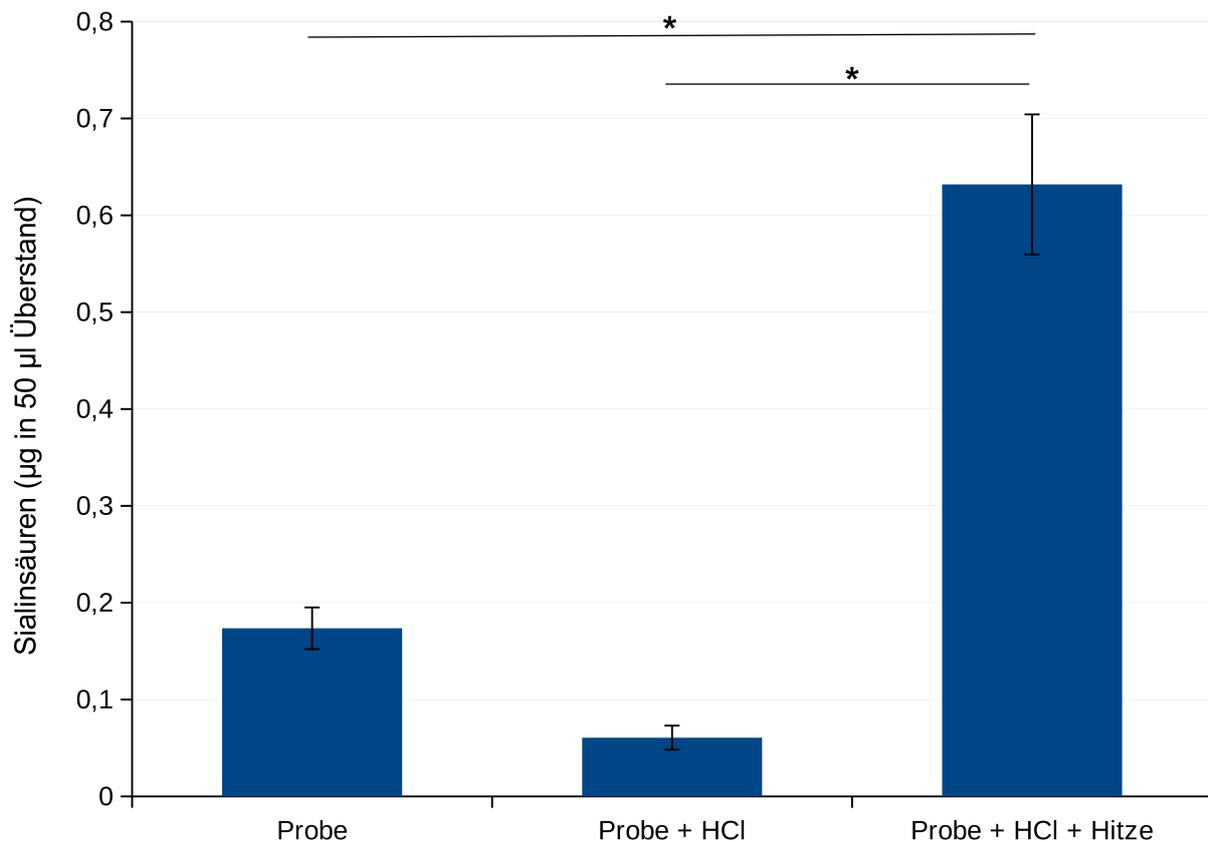


Abb. 4: Wirkung des Hydrolyse-Schritts auf die mit der Aminoff-Methode detektierte Sialinsäuremenge in einer Mausleberprobe. Nach der Homogenisierung des Gewebes wurde je 200 µl des Gewebehomogenats für die weitere Analyse verwendet. Bei der ersten Probe (Probe) wurde lediglich eine Zentrifugation des Gewebehomogenats durchgeführt. Bei der zweiten Probe erfolgte zusätzlich die Zugabe von 28 µl einer 1 molaren Salzsäure (Probe + HCl). Die dritte Probe wurde nach Zugabe der Salzsäure zusätzlich für 1 h auf 80 °C erhitzt (Probe + HCl + Hitze). Anschließend wurde mit dem Überstand aller Proben die Aminoff-Methode durchgeführt und die Sialinsäurekonzentration anhand einer Standardkurve bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen \pm Standardabweichung. Bei gegebener Normalverteilung aber fehlender Varianzhomogenität wurde eine Welch-ANOVA (Analysis of variance) ($F = 63,190$, $p = 0,002$) mit anschließendem Games-Howell post-hoc durchgeführt. Es zeigte sich, dass nach saurer Hydrolyse unter Hitzeeinwirkung im Vergleich zur reinen sauren Hydrolyse ohne Hitze oder keiner Vorbehandlung eine signifikant höhere messbare Sialinsäuremenge in der Probe resultierte.

Um die Auswirkungen des Hydrolyse-Schritts auf die Detektion freier Sialinsäuren zu untersuchen, erfolgte die Analyse zweier Standardkurven mit Neu5Ac-Standards. Die Standards wurden entweder der Prozedur zur Gewebepreparation unterzogen, indem eine saure Hydrolyse unter Hitzeeinwirkung durchgeführt wurde, oder ohne vorbereitende Schritte analysiert. Das detektierte Fluoreszenz-Signal lag bei den

Standards, welche den Schritten zur Gewebepvorbereitung unterzogen wurden, im gesamten Konzentrationsbereich signifikant unterhalb des Signals, welches ohne die Durchführung der vorbereitenden Schritte gemessen wurde. Somit wurde gezeigt, dass die saure Hydrolyse, welche zur Freisetzung von Sialinsäuren aus dem Gewebe genutzt wurde, die Quantität an messbarem freien Neu5Ac reduzierte. Die ausführlichen Ergebnisse sind im Anhang S. 91 dargestellt. Um einen möglichen Effekt des Mediums, in dem die Probe gelöst wurde, auf die gemessene Sialinsäurekonzentration zu überprüfen, wurden verschiedene Neu5Ac-Standards in sterilem Wasser, einer 0,1 molaren Salzsäure oder in RIPA-Puffer mit Salzsäure in dem für die Experimente verwandten Verhältnis gelöst und mit der Aminoff-Methode analysiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den gemessenen Sialinsäurekonzentrationen in verschiedenen Medien. Eine ausführlichere Darstellung der Ergebnisse findet sich im Anhang S. 92. In den Experimenten wurde RIPA-Puffer verwendet, da dieser besonders geeignet ist, um die gesamte Proteinmenge in den Proben zu quantifizieren, welche dann zur Normierung der Sialinsäuremenge verwendet wurde. Da schon in der Erstbeschreibung der Methode erwähnt wird, dass Desoxyribose, ein Bestandteil der DNA, ebenfalls in den Prozessen der Aminoff-Methode reagiert und so zu einem interferierenden Signal beiträgt, wurde die Auswirkung einer Konzentration von 85,33 µg cDNA auf das Extinktionssignal getestet. Diese Konzentration ist höher als die aufgrund der geringen Größe in den Retinaprobe zu erwartende DNA-Konzentration in den menschlichen Retinaprobe. Es zeigt sich eine sich nicht signifikant vom Hintergrundsignal unterscheidende Extinktion der cDNA-Probe, weshalb der Einfluss von Desoxyribose auf das Signal in weiteren Versuchen nicht mit einbezogen wurde (siehe Anhang S. 93). Zur weiteren Optimierung des Verfahrens insbesondere zur Messung geringer Sialinsäurekonzentrationen erfolgte die Umstellung der Detektion von der Messung der Extinktion bei 550 nm, hin zur Messung der Fluoreszenz bei einer Emissionswellenlänge von 585 nm nach einer Anregung mit Licht der Wellenlänge 555 nm. Diese Art der Messung findet in verschiedenen kommerziell erhältlichen Kits Anwendung (z. B. Sialic Acid Assay Kit der Firma Sigma Aldrich). Es zeigte sich eine Verbesserung der Sensitivität der Methode im Bereich geringer Sialinsäurekonzentrationen, sowie eine geringere Streubreite der Fluoreszenz-Werte um den Mittelwert insbesondere im Bereich hoher Sialinsäurekonzentrationen.

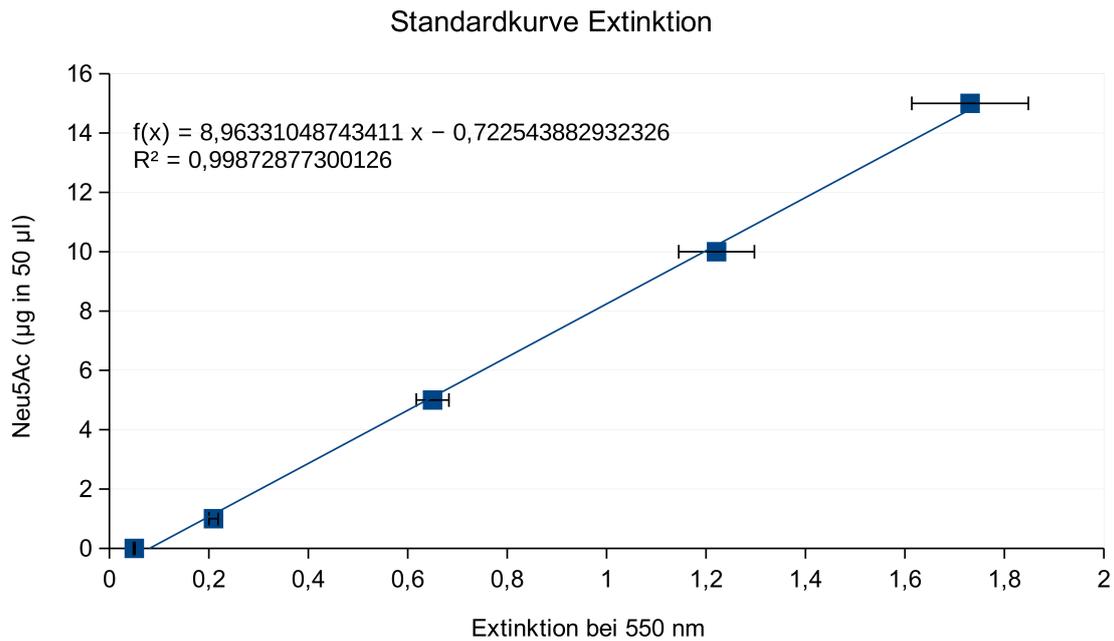


Abb. 5: Extinktion von mittels Aminoff-Methode analysierter Neu5Ac- (5-N-Acetyl-Neuraminsäure) Standards unterschiedlicher Konzentration bei 550 nm. Es zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen Sialinsäurekonzentration und gemessener Extinktion. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen \pm Standardabweichung, sowie die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß.

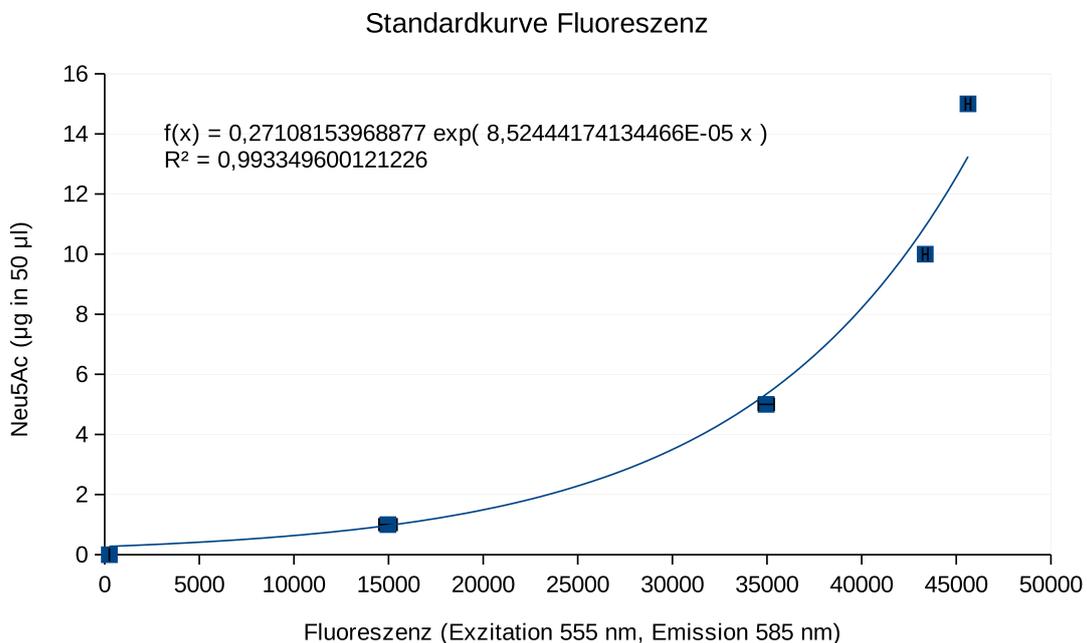


Abb. 6: Fluoreszenz von Neu5Ac- (5-N-Acetyl-Neuraminsäure) Standards unterschiedlicher Konzentration bei 585 nm nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 555 nm. Es zeigte sich ein exponentieller Zusammenhang zwischen Sialinsäurekonzentration und Fluoreszenz. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen \pm Standardabweichung (innerhalb der Punkte), sowie die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß.

3.1.2 Etablierung eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Analyse der langkettigen Polysialinsäuren in Gewebeproben

Da Sialinsäuren, abhängig von den Verbindungen, in denen sie vorkommen, unterschiedliche biologische Funktionen erfüllen und nach aktuellem Wissensstand besonders Polysialinsäuren in der Modulation der Funktion von Immunzellen von Relevanz sind, wurde ein Sandwich-ELISA-System zur Detektion von Polysialinsäuren entwickelt.

Ein initiales Musterprotokoll für einen Sandwich-ELISA wurde aus dem Handbuch „ELISA technical guide and protocols“ der Firma Thermo Fisher Scientific bezogen. Die Etablierung des Verfahrens erfolgte durch Modifikation der einzelnen Schritte. Die Zusammensetzung des Waschpuffers hatte starke Auswirkungen auf das am Ende detektierte Extinktionssignal. Es wurden verschiedene pH-Werte des Waschpuffers und die Wirkung der Zugabe eines Detergens getestet. Es zeigte sich eine starke pH-Abhängigkeit des gemessenen Extinktionssignals mit einer Zunahme des Signals bei niedrigeren pH-Werten. Dieser Effekt war bereits ohne die Zugabe von Sialinsäuren bei Messung des Hintergrundsignals nachweisbar. Weiterhin zeigte sich ein deutlicher Einfluss des pH-Werts auf die Konzentrationsabhängigkeit des gemessenen Extinktionssignals. Während bei pH-Werten von 5 und 8 Änderungen der Polysialinsäurekonzentrationen einen geringeren Einfluss auf die gemessene Extinktion hatten, zeigte sich bei pH 6 und pH 7,2 eine Zunahme der Extinktion bei höheren Polysialinsäurekonzentrationen. Im Bereich von pH 6 und pH 7,2 wurde auch am besten zwischen unterschiedlichen Polysialinsäurekonzentrationen diskriminiert. Eine gut sichtbare Konzentrationsabhängigkeit des Signals insbesondere im für die Experimente besonders relevanten Bereich geringer Sialinsäurekonzentrationen bei gleichzeitig niedrigem Hintergrundsignal lag bei einem pH-Wert von 7,2 vor, weshalb dieser für weitere Experimente verwandt wurde.

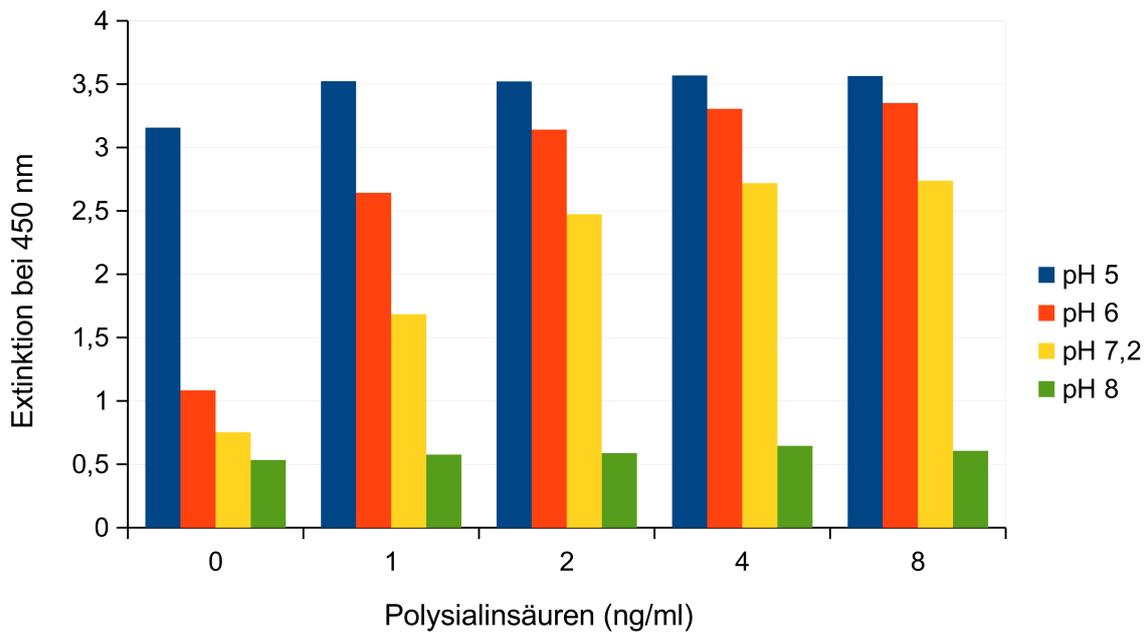


Abb. 7: Einfluss des pH-Werts des Waschpuffers auf das gemessene Extinktionssignal. Der ELISA wurde mit verschiedenen Waschpuffern mit pH 5, pH 6, pH 7,2 und pH 8 durchgeführt. Es zeigten sich deutliche Unterschiede des Hintergrundsignals mit Abnahme des gemessenen Extinktionssignals bei steigendem pH-Wert. Weiterhin zeigten sich Unterschiede in der Konzentrationsabhängigkeit des Signals. Dargestellt sind die Werte einer Messung. In der Korrelationsanalyse wurde bei in der Mehrzahl der Fälle gegebener Normalverteilung (bis auf die Werte bei pH 5, welche nicht normalverteilt waren) und gegebener Linearität der Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet, welcher in allen Fällen einen starken positiven, jedoch nicht signifikanten Zusammenhang zeigte (pH 5: $r = 0,612$, $p = 0,272$), pH 6: $r = 0,699$ ($p = 0,189$), pH 7,2: $r = 0,770$ ($p = 0,128$), pH 8: $r = 0,645$ ($p = 0,239$)). Zum Vergleich der Korrelationskoeffizienten wurde eine Fisher-z-Transformation durchgeführt. Es ergaben sich im Vergleich der Korrelation bei einem pH 7,2 zu den anderen pH-Werten keine signifikanten Unterschiede (pH 5: $z = 0,308$ ($p = 0,757$), pH 6: $z = 0,155$ ($p = 0,873$), pH 8: $z = 0,254$ ($p = 0,803$)).

Es wurde zusätzlich der Einfluss der Zugabe des Detergens Triton X-100 zum Waschpuffer mit einem pH 7,2 auf das resultierende Extinktionssignal untersucht. Es zeigte sich, dass durch Zugabe von Triton X-100 zum Waschpuffer im Bereich geringer Sialinsäurekonzentrationen eine genauere Abhängigkeit des Extinktionssignals von der Sialinsäurekonzentration erreicht wurde. Zudem zeigte sich im Bereich hoher Sialinsäurekonzentrationen ein proportionaler Zusammenhang zwischen Sialinsäurekonzentration und gemessener Extinktion bis zu Polysialinsäurekonzentrationen von 64 ng/ml. Eine ausführlichere Darstellung der Ergebnisse findet sich im Anhang S. 94. In den weiteren Experimenten wurde statt Triton X-100 das Detergens Tween20 verwendet.

Zur Reduktion des unspezifischen Hintergrundsignals wurde ein Blocking-Puffer eingesetzt. Es wurden neun verschiedene Lösungen (0,025 % bovines Serumalbumin, 0,25 % bovines Serumalbumin, 1 % bovines Serumalbumin, 2,5 % bovines Serumalbumin, 0,5 % Polyvinylalkohol, 2 % Polyvinylalkohol, 0,5 % Gelatine aus Fischhaut, 2 % Gelatine aus Fischhaut und 0,5 % Casein jeweils gelöst in Waschpuffer) bezüglich ihrer Eignung als Blocking-Puffer getestet. Drei der Lösungen (2,5 % bovines Serumalbumin, 0,5 % Polyvinylalkohol, 0,5 % Gelatine aus Fischhaut) zeigten aufgrund der Reduktion des Hintergrundsignals und einer Zunahme der Extinktion mit zunehmender Polysialinsäurekonzentration prinzipiell eine Eignung. In den Experimenten bestanden keine signifikanten Unterschiede des Hintergrundsignals bei den betrachteten Waschpuffern aus 2,5 % Rinderserumalbumin, 0,5 % Polyvinylalkohol und 0,5 % Fischgelatine gelöst in Waschpuffer. Bei Vergleich des Extinktionssignals bei Zugabe von Polysialinsäuren zeigten sich im Bereich geringer Sialinsäurekonzentrationen signifikante Unterschiede. Insgesamt zeigte sich bei Verwendung des Blocking-Puffers mit 0,5 % Fischgelatine die stärkste und einzig signifikante positive Korrelation zwischen Polysialinsäurekonzentration und gemessener Extinktion, weshalb dieser für die weiteren Experimente verwendet wurde.

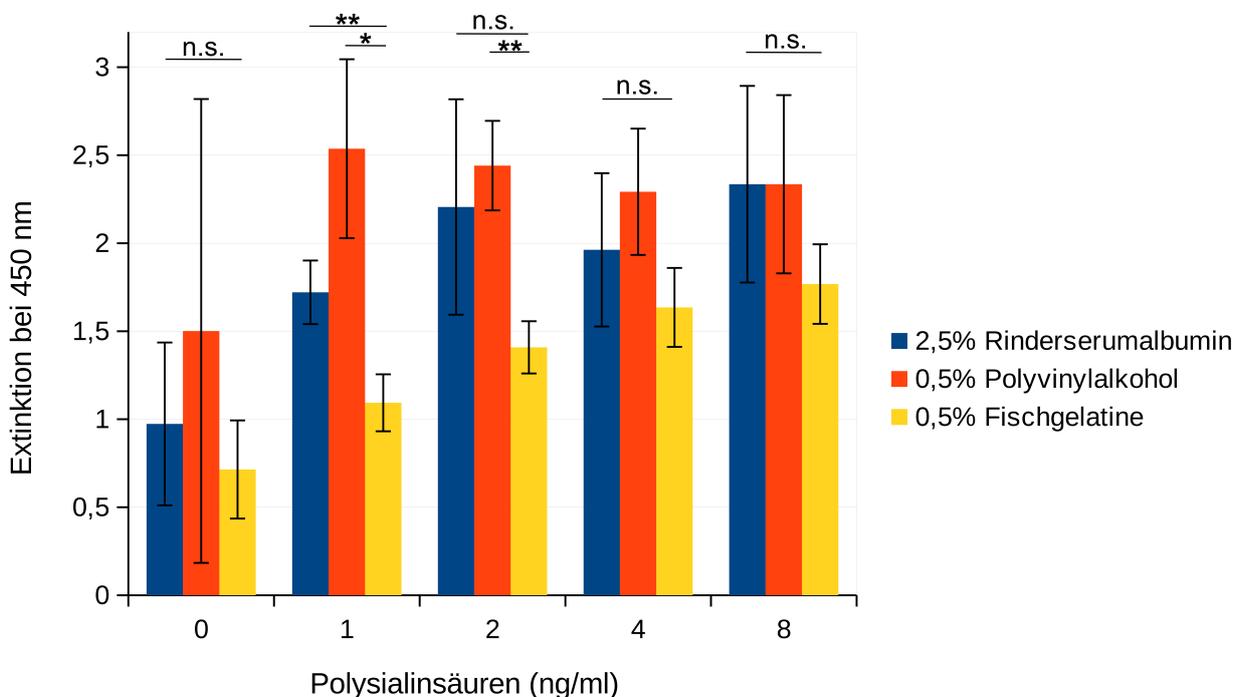


Abb. 8: Standardkurve bei Verwendung unterschiedlicher Blocking-Puffer. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier Messungen \pm Standardabweichung. Für die statistische

Auswertung wurde bei erfüllter Normalverteilungsvoraussetzung für alle Variablen im Falle einer nicht erfüllten Varianzhomogenitätsvoraussetzung (Polysialinsäurekonzentrationen 0 ng/ml, 1 ng/ml und 2 ng/ml) eine Welch-ANOVA mit Games-Howell post hoc durchgeführt. Bei den Polysialinsäurekonzentrationen 4 ng/ml und 8 ng/ml war die Varianzhomogenität gegeben, weshalb eine ANOVA (Analysis of variance) durchgeführt wurde, bei fehlender Signifikanz wurde auf einen post-hoc-Test verzichtet. Zur Berechnung der Korrelation wurde bei Normalverteilung aller Variablen der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet. Es ergaben sich Korrelationskoeffizienten zwischen Polysialinsäurekonzentration und Extinktion von $r = 0,411$ ($p = 0,072$) bei 2,5 % Rinderserumalbumin, $r = 0,194$ ($p = 0,412$) bei 0,5 % Polyvinylalkohol, sowie $r = 0,791$ ($p = 0,000$) bei Verwendung von 0,5 % Fischgelatine.

Im letzten Schritt entstand durch die Reaktion der Meerrettichperoxidase mit ihrem Substrat ein Farbstoff, dessen Extinktion anschließend bestimmt wurde. Die Quantität des entstehenden farbigen Reaktionsprodukts war dabei unter anderem davon abhängig, wie lange die Reaktion ablaufen konnte, bevor sie durch Zugabe von Salzsäure gestoppt wurde. Es wurden verschiedene Inkubationszeiten untersucht. Nach Angaben des Herstellers des TMB-Substrats sollen die gemessenen Extinktionswerte den Wert 2 nicht überschreiten. Bereits bei diesem Wert wird aufgrund des logarithmischen Zusammenhangs von Extinktion und Transmission nur noch 1 % des eingestrahnten Lichts nach Durchstrahlung der Probe detektiert. Da sich für eine Inkubationszeit von 10 Minuten ein signifikanter positiver Korrelationskoeffizient ergab und sich das Extinktionssignal im Bereich geringer Polysialinsäurekonzentrationen, welche für die Analyse der Retinaproben besonders relevant waren, in einem Bereich unter 2 befand wurde diese Inkubationsdauer für die folgenden Experimente gewählt. Eine ausführlichere Darstellung der Ergebnisse findet sich im Anhang S. 95.

Um zu untersuchen, ob eine unspezifische Bindung der verschiedenen Komponenten des ELISA relevant zum detektierten Signal beiträgt, wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem lediglich die Komponenten des ELISA zugegeben wurden, welche sonst nach Zugabe der Polysialinsäuren zugegeben wurden. Es zeigte sich, dass sich die gemessene Extinktion statistisch nicht signifikant von dem Signal einer Probe, in welcher der Coating-Antikörper vorher zugegeben wurde, unterschied. Somit konnte gezeigt werden, dass keine unspezifische Bindung der Komponenten des Detektionssystems mit dem Coating-Antikörper signifikant zum gemessenen Signal beiträgt. Eine ausführlichere Darstellung der Ergebnisse findet sich im Anhang S. 96.

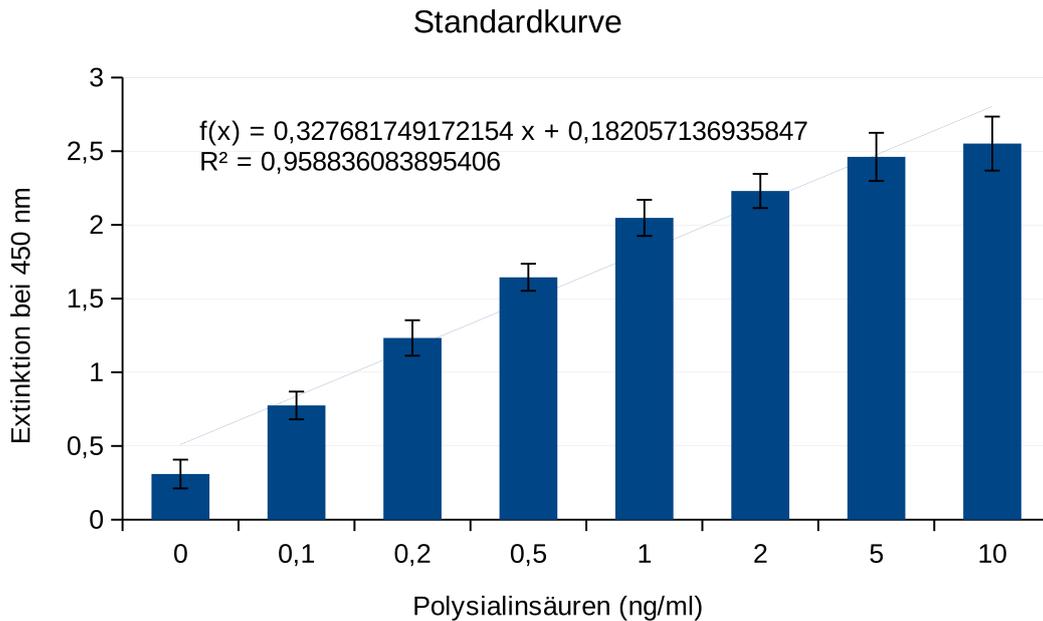


Abb. 9: Standardkurve mit den Extinktionswerten von den für die Standardkurve jeweils verwandten Polysialinsäurekonzentrationen. Es zeigte sich bei ein linearer Zusammenhang zwischen Polysialinsäurekonzentration und gemessenem Signal. Abgebildet ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei technischen Replikaten mit der Standardabweichung als Y-Fehlerbalken unter Abbildung der Regressionsgerade mit Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß.

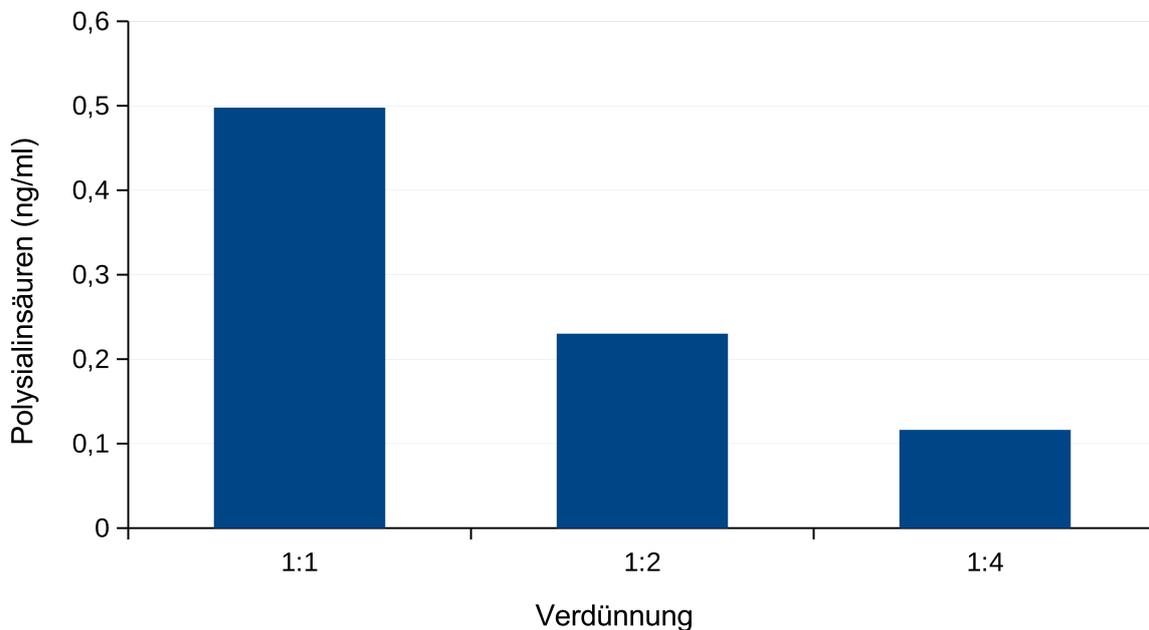


Abb. 10: Detektion von Polysialinsäuren mittels Sandwich-ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) in Gewebeproben. Um die Fähigkeit des Sandwich-ELISA-Systems zur Detektion von Polysialinsäuren in Gewebeproben zu testen, wurde eine Mausleber-Probe mit sterilem Wasser verdünnt und anschließend die

Sialinsäurekonzentration mittels des Sandwich-ELISA bestimmt. Es zeigte sich eine Reduktion der anhand einer Standardkurve berechneten Sialinsäurekonzentration. Dargestellt ist das Ergebnis einer Messung. Es zeigte sich eine abnehmende Polysialinsäuremenge bei Verdünnung der Probe. Bei einer 1:2-Verdünnung ließen sich noch 46,23 % der Sialinsäuren nachweisen, bei der 1:4-Verdünnung noch 23,34 %.

Es wurde weiterhin gezeigt, dass insbesondere in einem Polysialinsäurekonzentrationsbereich bis 3 ng/ml eine zuverlässige Detektion von Polysialinsäuren in biologischen Proben möglich ist, und dass die Schritte, welche zur Gewebepreparation eingesetzt wurden, keinen signifikanten Einfluss auf die messbare Polysialinsäurekonzentration hatten. Eine ausführlichere Darstellung der Ergebnisse findet sich im Anhang S. 97.

3.2 Ergebnisse der Analysen humaner Retinae

3.2.1 Quantitativer Nachweis der gesamten Sialinsäuren mittels Aminoff Methode

Der Mittelwert aller Proben ergab eine Sialinsäurekonzentration von 7,51 µg Sialinsäuren pro mg Protein mit einer Standardabweichung von 1,88 µg Sialinsäuren pro mg Protein.

Tab. 11: Mittelwerte der Sialinsäurekonzentration in humanen Retinaprobe

Probe	Mittelwert Gesamtsialinsäurekonzentration (µg/mg Protein)	Standardabweichung des Mittelwerts
Don #1 R	8,21	0,81
Don#1 L	8,25	0,61
Don#2 3	7,48	0,85
Don#2 4	8,56	0,61
Don #3 R	4,58	0,51
Don#3 L	8,59	0,8
Don #4 7	4,39	0,49
Don #4 8	6,87	0,54
Don #5 1	7,72	0,73
Don #5 2	10,46	0,99

Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten für jede analysierte Retinaprobe unter Angabe der Standardabweichung. Es wurde jeweils auf die Proteinkonzentration normiert. Es zeigten sich nicht nur Unterschiede im

Sialinsäuregehalt der Proben verschiedener Gewebespenders sondern auch teilweise zwischen den beiden Netzhautproben der beiden Augen eines Gewebespenders. Zum Vergleich der einzelnen Proben wurde bei erfüllter Normalverteilungs- und Varianzhomogenitätsvoraussetzung eine ANOVA durchgeführt mit post-hoc Bonferroni. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Retinaprobe (F = 20,305, p = 0,000). Für die Gewebespenders #3 (p = 0,000) , #4 (p = 0,017) und #5 (p = 0,006) ergab sich auch zwischen den Retinaprobe von rechtem und linkem Auge ein signifikanter Unterschied.

Weiterhin zeigten die Probe des rechten Auges von Spender #3 und die Probe 7 von Spender #4 im Vergleich mit den anderen Proben eine signifikant geringere Gesamtsialinsäurekonzentration. Die Gesamtsialinsäurekonzentration in Probe 2 von Spender #5 war signifikant höher als die der anderen Spender bis auf Probe 4 von Spender 2 und die Probe des linken Auges von Spender #3.

3.2.2 Quantitativer Nachweis von Polysialinsäuren mittels Sandwich-ELISA

Die Bestimmung der Polysialinsäure-Konzentration in humanen Retinaprobe mittels Sandwich-ELISA zeigt sowohl Unterschiede der Polysialinsäuremenge im Gewebe verschiedener Spender als auch Unterschiede zwischen den beiden Retinaprobe eines Spenders. Es wurden für jede Probe drei unabhängige Experimente mit je zwei technischen Replikaten durchgeführt. Im ersten und dritten Experiment zeigte sich eine gute Übereinstimmung der relativen Unterschiede im Polysialinsäuregehalt zwischen den verschiedenen Proben. Die im zweiten Experiment gemessenen Extinktionswerte von Proben und Standards wichen deutlich von den in den anderen Experimenten ermittelten Werten ab. Zur Bestimmung der Reliabilität der Messungen wurde die Test-Retest-Reliabilität mittels Korrelationen und Crohnbachs α berechnet. In der Korrelationsanalyse ergaben sich Korrelationen zwischen Experiment 1 und Experiment 2 von $r = 0,514$ (p = 0,020), sowie Experiment 1 und 3 von $r = 0,796$ (p = 0,000). Zwischen den Werten von Experiment 2 und 3 ergab sich $r = 0,647$ (p = 0,002). Es ergab sich ein Crohnbachs α von 0,800 und somit eine hohe Reliabilität. Der Mittelwert

aller Proben ergab 0,069 ng Polysialinsäuren pro mg Protein mit einer Standardabweichung von 0,048 ng Sialinsäuren pro mg Protein.

Tab. 12: Mittelwerte der Polysialinsäurekonzentration in humanen Retinaproben

Probe	Mittelwert Polysialinsäurekonzentration (ng/mg Protein)	Standardabweichung des Mittelwerts
Don #1 R	0,07	0,05
Don#1 L	0,1	0,06
Don#2 3	0,1	0,04
Don#2 4	0,08	0,04
Don #3 R	0,05	0,03
Don#3 L	0,05	0,04
Don #4 7	0,08	0,06
Don #4 8	0,07	0,06
Don #5 1	0,06	0,04
Don #5 2	0,03	0,03

Tabellarisch dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit je zwei technischen Replikaten unter Angabe der Standardabweichung des Mittelwerts. Bei gegebener Normalverteilung und Varianzhomogenität wurde eine ANOVA durchgeführt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($F = 1,246$, $p = 0,290$), weshalb kein post-hoc-Test durchgeführt wurde.

3.2.3 Immunhistochemie von Tri-, und Polysialinsäuren

Zur genaueren Analyse der in den Retinaproben vorhandenen Sialinsäuren erfolgte die Darstellung von Poly- und Trisialinsäuren durch immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten mit drei verschiedenen primären Antikörpern gegen Sialinsäuren unterschiedlicher Kettenlänge. Exemplarische Bilder der verschiedenen Sialinsäure-Färbungen zeigten sichtbare Unterschiede in der Verteilung von Sialinsäuren verschiedener Kettenlänge in den retinalen Schichten. Die mit den beiden Antikörpern gegen Polysialinsäuren (Klon 2-2B und Klon 12F8) anfärbbaren Strukturen waren vor

allein in den inneren Retinaschichten (der Nervenfaserschicht, der Ganglienzellschicht und der inneren plexiformen Schicht) nachweisbar, sowie in geringerem Umfang auch in der inneren und äußeren Körnerschicht. Bei beiden Antikörpern gegen Polysialinsäuren (Klon 2-2B und Klon 12F8) zeigte sich große Ähnlichkeit bezüglich der relativen Färbungsintensitäten in den retinalen Schichten. Die Färbung kurzkettiger Trisialinsäuren mit einem Antikörper gegen A2B5 (Klon 105) zeigte die höchsten Intensitäten in der Ganglien- und Nervenfaserschicht, sowie in den inneren und äußeren Segmenten der Fotorezeptoren.

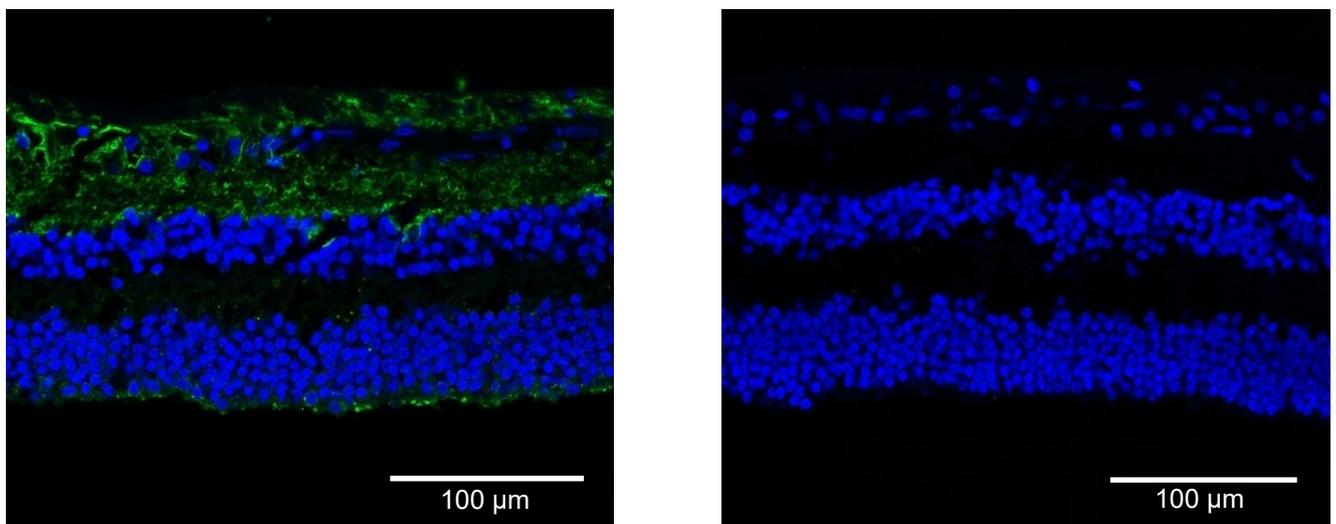


Abb. 11: Konfokalmikroskopische Bilder der Polysialinsäure-Immunfärbung der humanen Retina (Klon 2-2B). Auf dem linken Bild ist die Färbung von Polysialinsäuren zu sehen. Ein starkes Signal für Polysialinsäuren war in der Ganglienzellschicht und der inneren plexiformen Schicht erkennbar. In der Sekundärantikörper-Kontrolle (rechts) war keine spezifische Färbung zu sehen. Blau: DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), grün: Polysialinsäuren (Klon 2-2B)

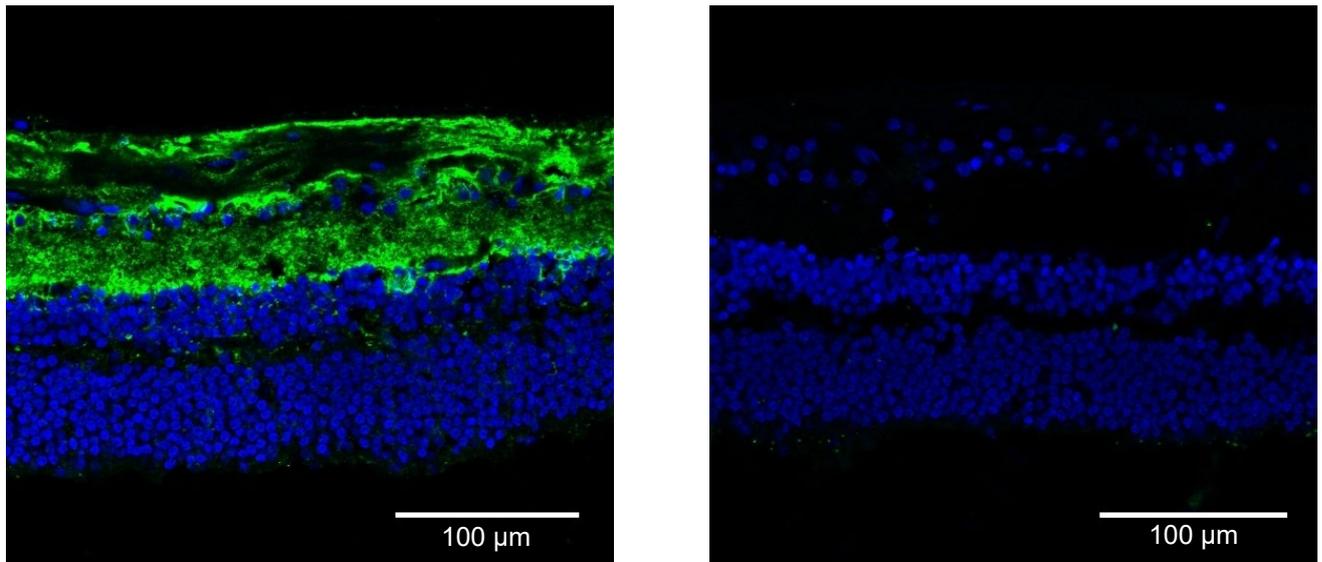


Abb. 12: Konfokalmikroskopische Bilder der Polysialinsäure-Immunfärbung der humanen Retina (Klon 12F8). Das linke Bild zeigt die CD56-Färbung von Polysialinsäuren. Es zeigte sich ein starkes Signal der Färbung in der Nervenfaserschicht, der Ganglienzellschicht, sowie der inneren plexiformen Schicht. In der Sekundärantikörper-Kontrolle (rechts) war keine spezifische Färbung zu sehen. Blau: DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), grün: CD56 (Cluster of differentiation 56)

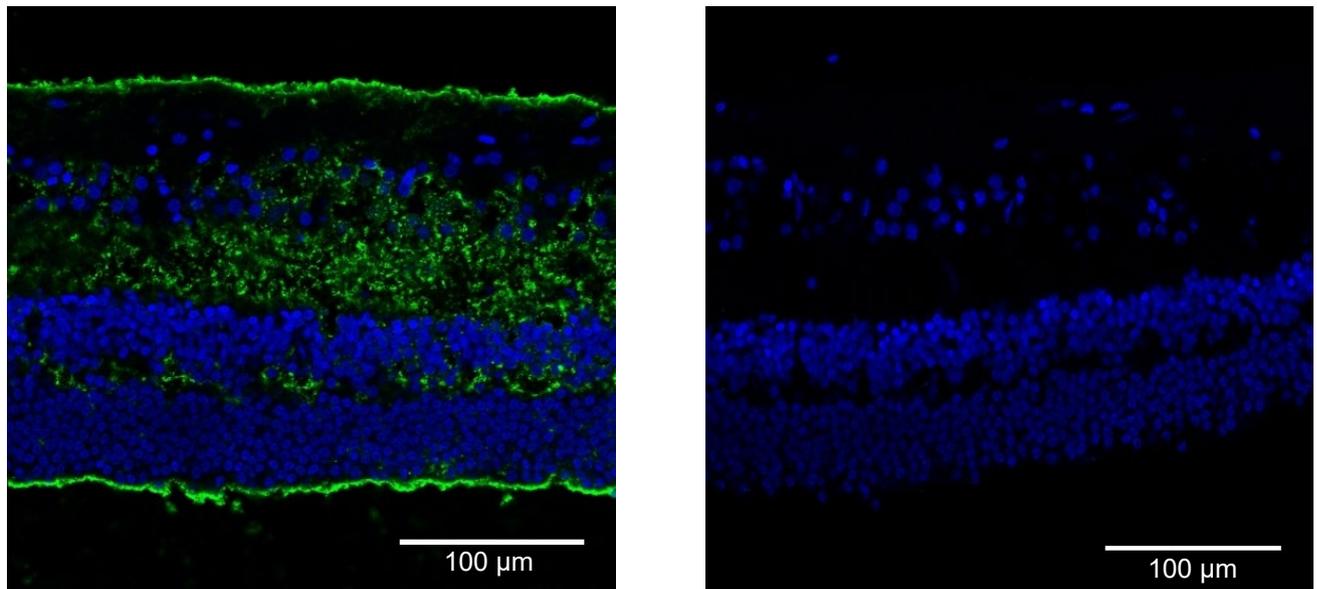


Abb. 13: Konfokalmikroskopische Bilder der Trisialinsäure-Immunfärbung der humanen Retina (Klon 105). Das linke Bild zeigt die A2B5-Färbung mit der Trisialinsäuren angefärbt wurden. Es zeigte sich insgesamt eine fleckige Färbung in der gesamten Retina. Besonders intensiv war das Signal in der Nervenfaserschicht. In der Sekundärantikörper-Kontrolle auf dem rechten Bild war keine spezifische Färbung zu erkennen. blau: DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), grün: A2B5

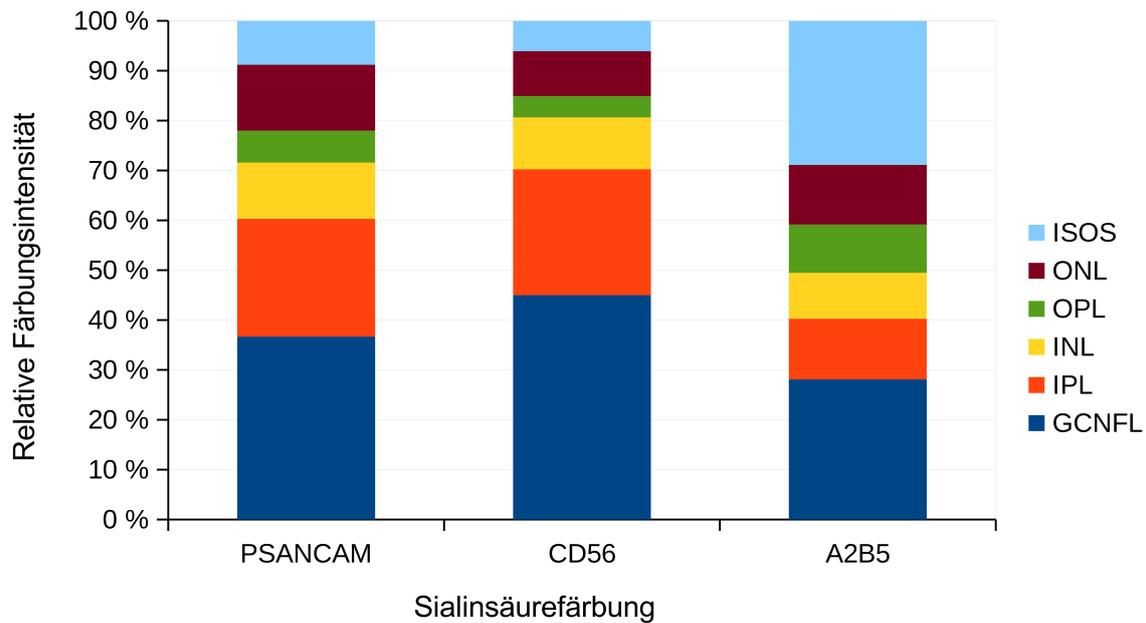


Abb. 14: Darstellung der relativen Färbungsintensität der einzelnen Retinaschichten in Relation zur gemessenen Intensität der gesamten Retina für die verschiedenen Sialinsäurekettenlängen, Mittelwerte der Intensitäten der verschiedenen Färbungen aller Spender. Die unterschiedliche Verteilung der Sialinsäuren in der humanen Retina wird besonders in der obigen Darstellung der Intensität der einzelnen Schichten (Ganglionzell- und Nervenfaserschicht (GCNFL), innere plexiforme Schicht (IPL), innere Körnerschicht (INL), äußere plexiformer Schicht (OPL), äußere Körnerschicht (ONL), und innere und äußere Segmente der Fotorezeptoren (ISOS)) als relativer Anteil der Intensität der gesamten Retina deutlich. Eine bei fehlender Varianzhomogenität durchgeführte Welch-ANOVA (Analysis of variance) ergab für alle drei Färbungen signifikante Unterschiede der relativen Färbungsintensitäten der verschiedenen retinalen Schichten (Polysialinsäure: PSA-NCAM (Polysialic acid-neural cell adhesion molecule) (Klon 2-2B): $F = 36,849$, $p = 0,000$; Polysialinsäure: CD56 (Cluster of differentiation 56) (Klon 12F8): $F = 234,394$, $p = 0,000$; Trisialinsäure: A2B5 (Klon 105): $F = 76,773$, $p = 0,000$).

Zur Darstellung des Sialinsäure-Profiles der einzelnen Schichten und um die verschiedenen Proben weiter vergleichen zu können, wurde eine z-Transformation der gemessenen integrierten, hintergrundkorrigierten Intensitäten durchgeführt. Dieser Schritt war aufgrund der Nutzung von zwei unterschiedlichen Mikroskopen zur Aufnahme der Bilder nötig. Die Gesamtheit der gemessenen Intensitäten der Bilder eines Mikroskops wurde jeweils z-standardisiert, um eine Vergleichbarkeit zu erreichen.

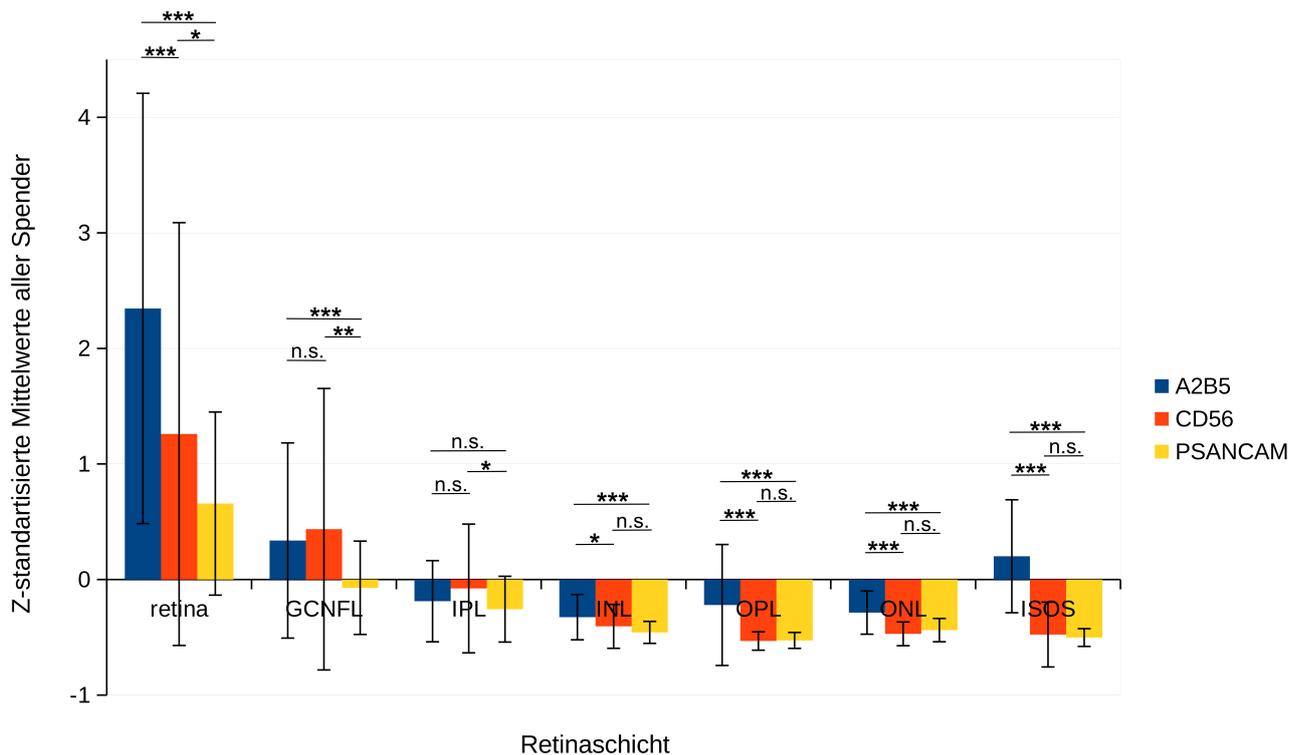


Abb. 15: Darstellung der Sialinsäuren verschiedener Kettenlänge in den Retinaschichten. Es sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der z-standardisierten, hintergrundkorrigierten, integrierten Färbungsintensitäten aller Spender in den verschiedenen Retinaschichten (Ganglionzell- und Nervenfaserschicht (GCNFL), innere plexiforme Schicht (IPL), innere Körnerschicht (INL), äußere plexiformer Schicht (OPL), äußere Körnerschicht (ONL), und innere und äußere Segmente der Fotorezeptoren (ISOS)) dargestellt. Zum Vergleich der retinalen Schichten bei jeweils einer Färbung wurde bei in allen Fällen fehlender Normaverteilung und Varianzhomogenität eine Welch-ANOVA (Analysis of variance) durchgeführt. Es ergab sich bei allen Färbungen ein signifikanter Wert. Polysialinsäure PSA-NCAM (Polysialic acid-neural cell adhesion molecule) (Klon 2-2B) ($F = 66,288$, $p = 0,000$). Polysialinsäure CD56 (Cluster of differentiation 56) (Klon 12F8) ($F = 37,844$, $p = 0,000$), Trisialinsäure A2B5 (Klon 105) ($F = 51,661$, $p = 0,000$). Zum Vergleich der Färbungsintensitäten verschiedener Färbungen innerhalb der retinalen Schichten wurde bei in allen Fällen fehlender Normalverteilung und Varianzhomogenität ebenfalls eine Welch-ANOVA mit Games-Howell post-hoc durchgeführt, deren Ergebnisse in der Grafik abgebildet sind. In den inneren Schichten ab der inneren Körnerschicht zeigten sich ähnliche Unterschiede mit einer jeweils signifikant höheren Intensität der A2B5-Färbung kurzkettiger Sialinsäuren im Vergleich zu den Färbungen längererkettiger Sialinsäuren, welche sich untereinander nicht signifikant unterschieden. In der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht, sowie der inneren plexiformen Schicht zeigte sich eine davon abweichende Verteilung. In der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht zeigte sich ein gestaffeltes Vorkommen der Sialinsäuren mit Färbung von signifikant weniger langkettigen mittels PSA-NCAM-Antikörper anfärbbaren Polysialinsäuren – als kurzkettigen Sialinsäuren. In der inneren plexiformen Schicht ließen sich vor allem die mittels dem anti-CD56-Antikörper anfärbbaren Polysialinsäuren nachweisen. In der gesamten Retina ergab sich eine nach Sialinsäurekettenlänge gestaffeltes Vorkommen, kürzere Sialinsäuren zeigten eine höhere Färbungsintensität

bezogen auf die gesamte Retina.

3.2.4 Zusammenhänge zwischen den verschiedenen analysierten Sialinsäuren

Zwischen der mittels Aminoff-Methode ermittelten Gesamtsialinsäurekonzentration und den immunhistochemisch bestimmten z-standardisierten Färbungsintensitäten der Sialinsäuren verschiedener Kettenlängen ergab sich für die mittels des anti-A2B5-Antikörpers angefärbten Trisialinsäuren in der äußeren Körnerschicht ein signifikanter positiver Pearson-Korrelationskoeffizient ($r = 0,540$, $p = 0,004$). Bei Betrachtung der mittels anti-CD56-Antikörper anfärbbaren Polysialinsäuren ergab sich für die innere Körnerschicht ($r = 0,389$, $p = 0,045$), sowie die Schicht der inneren und äußeren Segmente der Fotorezeptoren ($r = 0,473$, $p = 0,013$) ein signifikanter positiver Pearson-Korrelationskoeffizient. Für die mittels anti-PSA-NCAM-Antikörper anfärbbaren Polysialinsäuren ergab sich in der äußeren Körnerschicht ein signifikanter negativer Pearson-Korrelationskoeffizient ($r = -0,514$, $p = 0,006$) bei Korrelation mit der Gesamtsialinsäurekonzentration. Die ermittelten Pearson-Korrelationskoeffizienten zwischen einerseits der mittels ELISA-ermittelten Menge an Polysialinsäuren und andererseits der Gesamtsialinsäuremenge und den z-standardisierten Färbungsintensitäten der Sialinsäurefärbungen ergab keine signifikanten Zusammenhänge. Bei Berechnung der Pearson-Korrelationskoeffizienten zwischen den Färbungsintensitäten für verschiedene Sialinsäurefärbungen der einzelnen Schichten ergab sich bei Korrelation der kurzkettigen Sialinsäuren (Klon 105) mit den langkettigen Sialinsäuren (Klon 2-2B und 12F8) in der gesamten Retina, sowie den inneren Schichten (Ganglienzell- und Nervenfaserschicht, innere plexiforme Schicht und innere Körnerschicht) ein signifikanter positiver Zusammenhang. Die mittels anti-CD56-Antikörper anfärbbaren Polysialinsäuren und die mittels anti-PSA-NCAM-Antikörper anfärbbaren Polysialinsäuren korrelierten in allen Schichten bis auf die innere Körnerschicht und die Schicht mit den Segmenten der Fotorezeptoren signifikant positiv. Die ausführlichen Ergebnisse sind im Anhang S. 98 dargestellt.

3.2.5 Altersabhängige Veränderungen der Sialinsäuren

Bei Korrelation der mittels Aminoff-Methode ermittelten Gesamtsialinsäurekonzentration und dem Alter der Gewebespende ergab der bei gegebener Normalverteilung errechnete Pearson-Korrelationskoeffizient einen schwachen, nicht signifikanten, positiven Zusammenhang ($r = 0,126$, $p = 0,508$). Der ebenfalls bei gegebener Normalverteilung ermittelte Pearson-Korrelationskoeffizient zwischen dem Alter der Gewebespende und der mittels ELISA ermittelten Polysialinsäurekonzentration ergab einen nicht signifikanten, leicht negativen Zusammenhang ($r = -0,247$, $p = 0,057$). Bei Korrelation der z-standardisierten Färbungsintensitäten der Sialinsäuren in den retinalen Schichten ergab sich bei fast allen Schichten über verschiedene Sialinsäurekettenlängen hinweg ein positiver Zusammenhang zwischen Spenderalter und Intensität der Sialinsäurefärbung.

3.2.6 Geschlechtsabhängige Unterschiede der Sialinsäuren

Beim Vergleich der mittels Aminoff-Methode ermittelten Gesamtsialinsäurekonzentration der Proben weiblicher und männlicher Gewebespende ergab sich in einem bei gegebener Normalverteilung und Varianzhomogenität durchgeführten t-Test für unabhängige Stichproben ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($t = 3,123$, $p = 0,004$) mit einem Mittelwert der Gesamtsialinsäurekonzentration in Proben weiblicher Gewebespende von $8,66 \mu\text{g}$ Sialinsäuren pro mg Protein mit einer Standardabweichung von $1,30 \mu\text{g}$ Sialinsäuren pro mg Protein und in den Proben männlicher Gewebespende von $6,74 \mu\text{g}$ Sialinsäuren pro mg Protein mit einer Standardabweichung von $1,84 \mu\text{g}$ Sialinsäuren pro mg Protein. Beim Vergleich der Polysialinsäurekonzentration der Proben weiblicher und männlicher Gewebespende ergab sich in einem bei gegebener Normalverteilung und Varianzhomogenität durchgeführten t-Test für unabhängige Stichproben kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($t = -0,300$, $p = 0,765$) mit einem Mittelwert der Polysialinsäurekonzentration in Proben weiblicher Gewebespende von $0,067 \text{ ng}$ Polysialinsäuren pro mg Protein mit einer Standardabweichung von $0,051 \text{ ng}$ Polysialinsäuren pro mg Protein und in den Proben männlicher Gewebespende von

0,071 ng Polysialinsäuren pro mg Protein mit einer Standardabweichung von 0,046 ng Polysialinsäuren pro mg Protein. Zum Vergleich der z-standardisierten Sialinsäurefärbungsintensität für verschiedene Kettenlängen von weiblichen und männlichen Gewebespendern wurde trotz nicht für alle Variablen erfüllter Normalverteilungsvoraussetzung ein T-Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt. Es zeigte sich bei Betrachtung aller Sialinsäurefärbungen in allen Schichten ein höherer Mittelwert der z-standardisierten Sialinsäurefärbungsintensität in den Proben der weiblichen Gewebespendern. In allen Fällen bis auf einen (Schicht der Segmente der Fotorezeptoren in der A2B5-Färbung) war dieser Unterschied statistisch signifikant.

3.2.7 Immunhistochemie von Mikroglia

Zur Darstellung der Mikroglia in der menschlichen Retina wurden die Proben für die Immunhistochemie vorbereitet und mit Antikörpern gegen den Mikroglia-Marker Iba-1, sowie CD68, einem Marker für die Phagozytoseaktivität der Mikroglia, gefärbt.

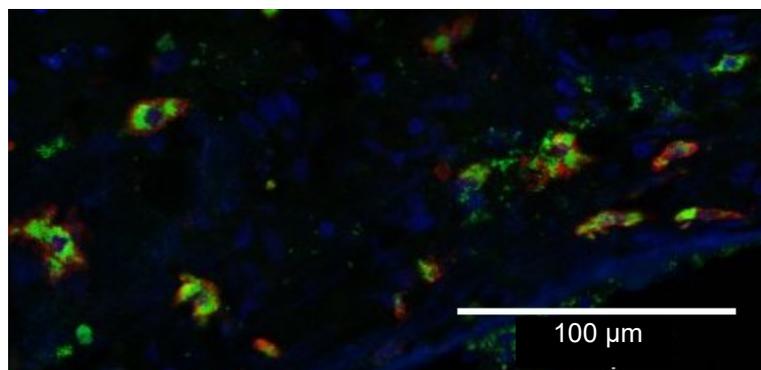


Abb. 16: Konfokalmikroskopische Z-Projektion der Iba-1-CD68-Immunfärbung der Choroidea. Insbesondere in den subretinalen Gewebeschichten der Choroidea ließen sich die Iba-1-positiven Mikroglia gut abgrenzen. Die Mikroglia zeigten zum Teil eine deutliche CD68-Färbung als Zeichen ihrer Phagozytoseaktivität. (Blau: DAPI (4',6'-Diamidin-2-phenylindol), grün: Iba-1 (Ionized calcium-binding adapter molecule 1), rot: CD68 (Cluster of differentiation 68))

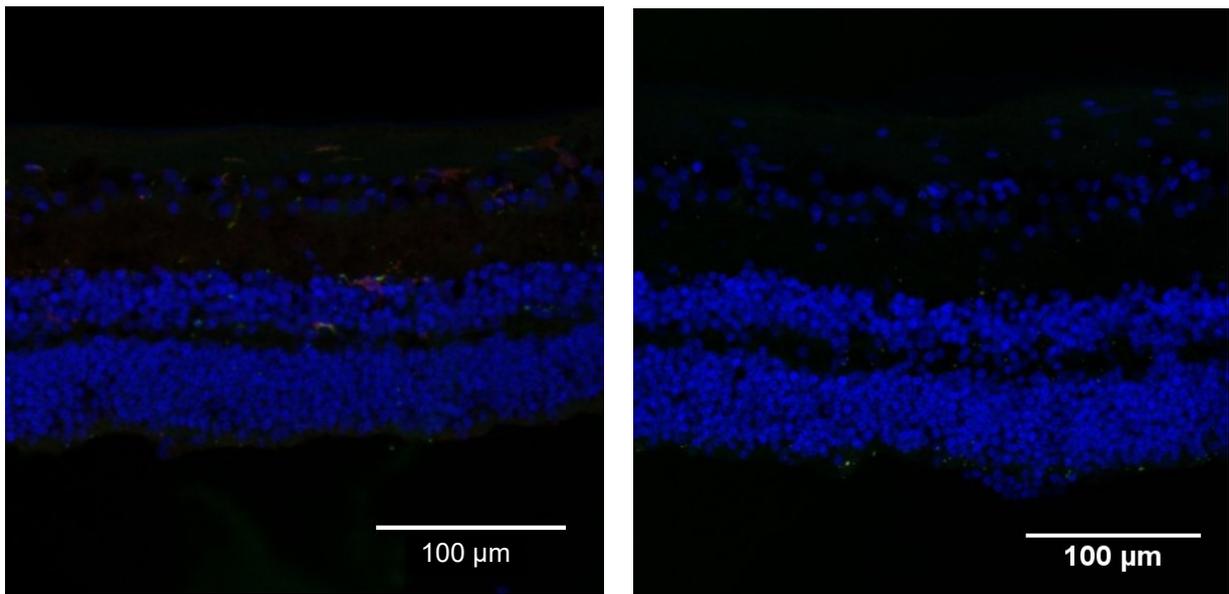


Abb. 17: Konfokalmikroskopische Z-Projektionen der Iba-1-CD68-Immunfärbung der humanen Retina. In vielen Schichten der Retina ließen sich Iba-1-positive Mikrogliazellen nachweisen (linkes Bild). Diese zeigten größtenteils einen ramifizierten Phänotyp und waren vor allem in den inneren Schichten der Retina darstellbar. Die CD68-Färbung hatte hier eine geringe, kaum sichtbare Intensität. Im rechten Bild, der Sekundärantikörper-Kontrolle, ließ sich kein spezifisches Immunfärbung nachweisen. (Blau: DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), grün: Iba-1 (Ionized calcium-binding adapter molecule 1), rot: CD68 (Cluster of differentiation 68))

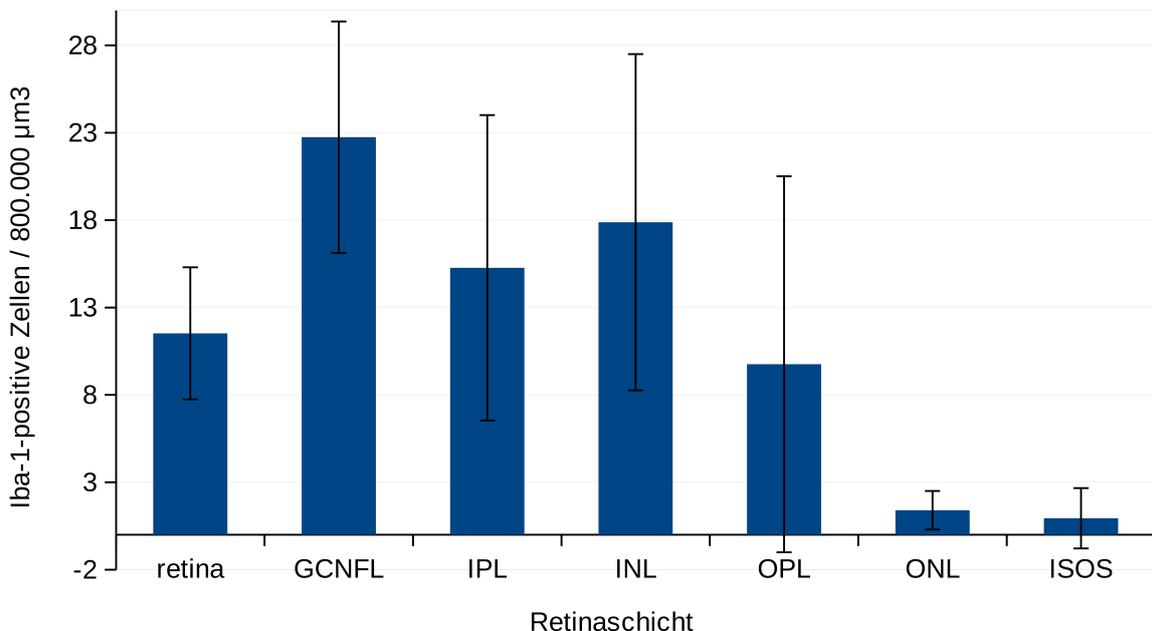


Abb. 18: Anzahl Iba-1 (Ionized calcium-binding adapter molecule 1)-positiver Zellen in der humanen Retina. Es ist jeweils der Mittelwert aller Spender in den verschiedenen Retinaschichten (Ganglionzell- und Nervenfaserschicht (GCNFL), innere plexiforme

Schicht (IPL), innere Körnerschicht (INL), äußere plexiformer Schicht (OPL), äußere Körnerschicht (ONL), und innere und äußere Segmente der Fotorezeptoren (ISOS)) mit Standardabweichung dargestellt. Bei fehlender Normalverteilung und in allen Fällen nicht gegebener Varianzhomogenität wurde eine Welch-ANOVA (Analysis of variance) ($F = 102,499$, $p = 0,000$) durchgeführt, welche signifikante Unterschiede ergab.

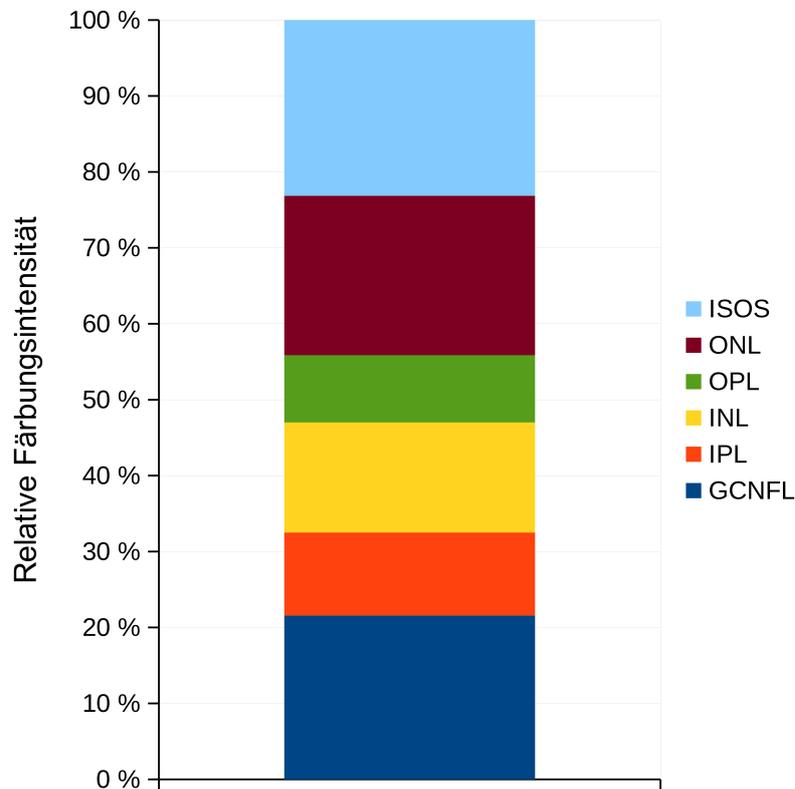


Abb. 19: Darstellung der relativen CD68-Färbungsintensität der einzelnen Retinaschichten (Ganglionzell- und Nervenfaserschicht (GCNFL), innere plexiforme Schicht (IPL), innere Körnerschicht (INL), äußere plexiformer Schicht (OPL), äußere Körnerschicht (ONL), und innere und äußere Segmente der Fotorezeptoren (ISOS)) in Relation zur gemessenen Intensität der gesamten Retina für die integrierte, hintergrundkorrigierte CD68 (Cluster of differentiation 68)-Färbungsintensität. Die Darstellung zeigt Balken mit den Mittelwerten der Intensität der CD68-Färbung für alle Spender. Die unterschiedliche Verteilung der Sialinsäuren in der humanen Retina wird besonders in der obigen Darstellung der Intensität der einzelnen Schichten als relativer Anteil der Intensität der gesamten Retina deutlich. Bei fehlender Normalverteilung und Varianzhomogenität wurde zum Vergleich der relativen Färbungsintensitäten der Schichten eine Welch-ANOVA (Analysis of variance) durchgeführt, welche signifikante Unterschiede ergab ($F = 40,369$, $p = 0,000$).

3.2.8 Mikroglia und ihr Zusammenhang zu den analysierten Sialinsäuren

3.2.8.1 Altersabhängige Veränderungen mikroglialer Marker

Bei Korrelation des Spenderalters mit der Anzahl der Iba-1-positiven Zellen in der Retina und ihren einzelnen Schichten ergab sich ein signifikanter positiver Pearson-Korrelationskoeffizient für die gesamte Retina ($r = 0,283$, $p = 0,011$) und die innere Körnerschicht ($r = 0,285$, $p = 0,010$). Alle weiteren Korrelationskoeffizienten waren nicht signifikant. Bei Korrelation des Spenderalters mit der z-standardisierten CD68-Färbungsintensität in den verschiedenen Retinaschichten ergab sich ein signifikanter positiver Pearson-Korrelationskoeffizient für Ganglienzell- und Nervenfaserschicht ($r = 0,424$, $p = 0,000$), sowie ein signifikanter negativer Zusammenhang für die Schicht der Segmente der Fotorezeptoren ($r = -0,315$, $p = 0,004$). Alle weiteren Korrelationskoeffizienten waren nicht signifikant. Bei Korrelation der mittels quantitativer real-time-PCR bestimmten delta-CT-Werte der bestimmten mikroglialen Marker (Iba-1, CD68, TMEM119) mit dem Spenderalter ergab sich in allen Fällen ein negativer Pearson-Korrelationskoeffizient als Hinweis auf eine höhere Transkription im Alter. Im Fall von Iba-1 ($r = -0,460$, $p = 0,011$) und CD68 ($r = -0,397$, $p = 0,033$) war dieser statistisch signifikant.

3.2.8.2 Geschlechtsabhängige Unterschiede mikroglialer Marker

Für die Färbung Iba-1-positiver Zellen ergab ein T-Test für unabhängige Stichproben zum Vergleich der Geschlechter in der Retina insgesamt, sowie der inneren plexiformen und der inneren Körnerschicht eine signifikant höhere Anzahl Iba-1-positiver Zellen in den Proben weiblicher Gewebespende. Ein weiterer T-Test für unabhängige Stichproben zum Vergleich der Geschlechter bezüglich der z-standardisierten Intensität der CD68-Färbung ergab in der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht eine signifikant höhere Färbungsintensität in den Proben weiblicher Gewebespende. Beim Vergleich weiblicher und männlicher Gewebespende hinsichtlich der Gentranskription der Mikroglia marker zeigte sich lediglich für TMEM119 ein signifikanter T-Test für unabhängige Stichproben, welcher bei gegebener Normalverteilung und

Varianzhomogenität durchgeführt wurde. Es zeigte sich ein signifikant niedrigerer delta-CT-Wert weiblicher Gewebespende als Hinweis auf eine signifikant höhere TMEM119-Transkription in den Proben weiblicher Gewebespende ($t = -2,935$, $p = 0,007$). Bezüglich der anderen Marker zeigten T-Tests für unabhängige Stichproben keine signifikanten Unterschiede.

3.2.8.3 Zusammenhänge zwischen Mikroglia und den analysierten Sialinsäuren

Bei Korrelation der Iba-1-positiven Zellen mit der Gesamt- und Polysialinsäurekonzentration ergab sich für die Zellzahl in der inneren plexiformen Schicht ($r = 0,308$, $p = 0,023$), sowie in der Schicht der Segmente der Fotorezeptoren ($r = 0,269$, $p = 0,049$) und der mittels ELISA ermittelten Polysialinsäurekonzentration eine signifikante positive Korrelation, alle anderen Korrelationen waren nicht signifikant. Bei Korrelation der z-standardisierten CD68-Färbungsintensität mit der Gesamt- und Polysialinsäurekonzentration ergaben sich keine signifikanten positiven oder negativen Korrelationen. In der Pearson-Korrelation von Gesamt- und Polysialinsäurekonzentration mit den delta-CT-Werten der Gentranskription von Iba-1, CD68 und TMEM119 ergab sich lediglich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem delta-CT-Wert von TMEM119 und der bestimmten Gesamtsialinsäuremenge ($r = -0,373$, $p = 0,046$), das heißt, eine höhere TMEM119-Transkription war mit einer signifikant höheren Menge an Gesamtsialinsäuren assoziiert. Bei der Korrelation der Anzahl Iba-1-positiver Zellen mit der Intensität der Sialinsäurefärbungen ergab sich im Bereich der gesamten Retina, sowie der inneren Körnerschicht für die Intensität der Färbung der kurz- und mittels anti-CD56-Antikörper anfärbbaren Sialinsäuren eine signifikante positive Korrelation, für die langkettigen Sialinsäuren ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge. Bei der Korrelation der z-standardisierten CD68-Färbungsintensität und der Färbungsintensität der Sialinsäuren verschiedener Kettenlängen ergaben die folgenden Korrelationen: Für die kurzkettigen Trisialinsäuren ergab sich für die gesamte Retina, die Schicht der Ganglienzellen und Nervenfasern, sowie die der inneren und äußeren Segmente der Fotorezeptoren eine signifikante positive Korrelation. Für die mittels anti-CD56-Antikörper anfärbbaren Polysialinsäuren ergab sich für die gesamte Retina und die Ganglienzell- und

Nervenfaserschicht eine signifikante positive Korrelation, für die innere plexiforme Schicht ein signifikanter negativer Zusammenhang. Für die mittels anti-PSANCAM-Antikörper anfärbbaren Polysialinsäuren ergab sich für die Ganglienzell- und Nervenfaserschicht, sowie die äußere plexiforme Schicht ein signifikanter positiver Zusammenhang mit der z-standardisierten CD68-Färbungsintensität. Die ausführlichen Ergebnisse sind im Anhang S. 98 dargestellt. Weiterhin erfolgte die Korrelation der z-standardisierten Färbungsintensitäten der Sialinsäurefärbungen verschiedener Kettenlängen mit den delta-CT-Werten mikroglialer Marker. Für die Gentranskription der Mikroglia marker ergab sich insbesondere für TMEM119 in den inneren Schichten der Retina (Ganglienzell- und Nervenfaserschicht, innere plexiforme Schicht) für kurz- und mittels anti-CD56-Antikörper anfärbbare Sialinsäuren ein signifikanter negativer Zusammenhang, bei höherer TMEM119-Transkription zeigte sich hier eine höhere z-standardisierte Färbungsintensität. Für die Iba-1- und CD68-Transkription zeigte sich für die kurzkettigen Sialinsäuren ein signifikanter positiver Pearson-Korrelationskoeffizient für die Schicht mit den Segmenten der Fotorezeptoren. Für die Polysialinsäuren zeigte sich ein signifikanter positiver Zusammenhang im Bereich der äußeren plexiformen Schicht. Eine geringere Transkription von Iba-1 und CD68 war hier mit einem vermehrten Vorkommen von mittels anti-PSA-NCAM- und anti-CD56-Antikörpern nachweisbaren Polysialinsäuren korreliert (siehe Anhang S.99)

3.2.9 Inflammatorische Marker und Sialinsäuren

In einer bei gegebener Varianzhomogenität durchgeführten ANOVA zeigten sich signifikante Unterschiede der Transkription der inflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$ ($F = 19,270$, $p = 0,000$) und $\text{IL}1\beta$ ($F = 76,127$, $p = 0,000$) zwischen den Retinaprobe n. Es zeigte sich für beide inflammatorischen Zytokine eine negative Korrelation des delta-CT-Werts mit dem Spenderalter und somit eine höhere Transkription mit zunehmendem Alter, im Fall von $\text{IL}1\beta$ war diese statistisch signifikant ($r = -0,580$, $p = 0,001$). Zwischen weiblichen und männliche Gewebespendern zeigte ein T-Test für unabhängige Stichproben keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Transkription inflammatorischer Zytokine. Eine Korrelation der Transkription mit der Gesamt- und

Polysialinsäurekonzentration zeigte eine positive Korrelation zwischen Gesamtsialinsäurekonzentration und der Transkription inflammatorischer Zytokine und eine negative Korrelation mit der Polysialinsäuremenge. Die Zusammenhänge waren in beiden Fällen nicht statistisch signifikant. Bei Korrelation der IL1 β -Transkription mit den anfärbbaren kurz- und mittels anti-CD56-Antikörper anfärbbaren Sialinsäuren in der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht ergab sich eine vermehrte Nachweisbarkeit bei stärkerer Transkription von IL1 β . Für die mittels anti-PSA-NCAM anfärbbaren Polysialinsäuren ergab sich in der äußeren plexiformen Schicht eine größere Nachweisbarkeit der Sialinsäuren bei geringerer Transkription von TNF α und IL1 β . Dieser Zusammenhang zeigte sich für die kurz-kettigen Sialinsäuren im Bereich der Segmente der Fotorezeptoren. Für TNF α war diese positive Korrelation durchgehend stärker. Für die ausführlichen Ergebnisse siehe Anhang S. 99.

3.2.10 Sialyltransferasen und Sialinsäuren

Um die Gentranskription von Sialyltransferasen in den humanen Retinaprobe zu quantifizieren, wurde die RNA nach ihrer Isolation revers transkribiert und eine quantitative real-time PCR durchgeführt. Beim Vergleich der delta-CT-Werte der Sialyltransferase-Gene unter den Spender ergaben sich in allen Fällen in einer bei gegebener Varianzhomogenität durchgeführten ANOVA signifikante Unterschiede zwischen den Spendern.

3.2.10.1 Korrelationen der Sialyltransferasen untereinander

Bei Betrachtung der Korrelationen der delta-CT-Werte der Sialyltransferasen untereinander zeigten sich viele signifikante und stark positive Korrelationen, unter anderem für ST6GAL1, ST6GALNAC6, ST8SIA1, ST8SIA2 und ST8SIA3. Eine positive Korrelation bedeutet im Fall des delta-CT-Werts, dass eine geringere Transkription des einen Gens mit einer geringeren Transkription des anderen Gens korrelierte, da sich der delta-CT-Wert reziprok zur Quantität der Gentranskription verhält. Im Gegensatz dazu

zeigten die Sialyltransferasen ST3GAL5 und ST8SIA5 untereinander eine positive Korrelation, mit den anderen Sialyltransferasen jedoch in allen bis auf einen Fall eine negative Korrelation. Diese Sialyltransferasen wurden also in fast allen Fällen signifikant höher transkribiert, wenn die Gruppe der anderen Enzyme geringer transkribiert wurde. Zwischen den beiden Sialyltransferasen bestand wiederum eine signifikante positive Korrelation.

3.2.10.2 Zusammenhänge der Sialyltransferasentranskription mit dem Spenderalter, dem Geschlecht und dem Vorkommen verschiedener Sialinsäuren

Es zeigte sich für ST6GAL1, ST6GALNAC6, ST8SIA1 und ST8SIA3 jeweils eine signifikant höhere Transkription mit zunehmendem Alter. Für ST3GAL5 und ST8SIA5 zeigten sich eine nicht signifikante geringere Transkription mit höherem Alter. Bei Korrelation der Gesamt- und Polysialinsäurekonzentration mit der Sialyltransferase-Transkription ergaben sich keine signifikante Korrelationen (siehe Anhang S. 99). Beim Vergleich der Sialyltransferase-Transkription zwischen männlichen und weiblichen Gewebespendern ergaben sich in einem T-Test für unabhängige Stichproben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Bei Korrelation mit der A2B5-Färbungsintensität kurzkettiger Trisialinsäuren zeigte sich in der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht eine signifikant höhere Transkription der Sialyltransferasen ST6GAL1, ST6GALNAC6 und ST8SIA1 bei stärkerer A2B5-Färbungsintensität. In der Schicht der Segmente der Fotorezeptoren war eine geringere Transkription dieser Sialyltransferasen mit stärkerer A2B5-Anfärbbarkeit korreliert. In dieser Schicht zeigte sich weiterhin eine signifikante positive Korrelation der Transkription von ST5GAL5 und ST8SIA5 mit der Anfärbbarkeit von Trisialinsäuren. Bei Korrelation der CD56-Färbungsintensität von Polysialinsäuren mit der Sialyltransferase-Transkription zeigte sich für die Mehrzahl der Sialyltransferase-Gene eine signifikante negative Korrelation, eine erhöhte Transkription ging also mit einem vermehrten Vorkommen von mittels anti-CD56 anfärbbaren Polysialinsäuren einher. Im Fall von ST6GAL1, ST6GALNAC6 und ST8SIA3 waren diese Korrelationen im Bereich innerer Retinaschichten teilweise signifikant, für ST8SIA5 zeigten sich in zentralen Schichten (plexiforme und Körnerschichten) signifikante Korrelationen. Für

ST8SIA1 und ST8SIA2 zeigten sich im Gegensatz dazu positive Korrelationen in einigen äußeren Retinaschichten. Eine geringere Transkription ging hier mit einer stärkeren Anfärbbarkeit von mittels anti-CD56-Antikörper anfärbbaren Polysialinsäuren einher. Bei Korrelation der z-standardisierten Färbungsintensität der PSA-NCAM-Färbung von Polysialinsäuren und den delta-CT-Werten der Sialyltransferasegene ergab sich für ST6GALNAC6 und ST8SIA3 in einigen Schichten, sowie der gesamten Retina eine signifikante negative Korrelation, also eine stärkere Gentranskription korrelierte signifikant mit einem stärkeren Vorkommen von mittels PSA-NCAM-Färbung anfärbbaren Polysialinsäuren. Für ST8SIA1 und ST8SIA2 zeigte sich hingegen in einigen äußeren Retinaschichten ein Zusammenhang zwischen einer verminderten Transkription und einem höheren Polysialinsäure-Vorkommen (Klon 2-2B). Die Ergebnisse sind tabellarisch im Anhang S. 100 dargestellt.

3.2.10.3 Korrelation der Sialyltransferasetranskription mit Mikroglia- und inflammatorischen Markern

Für die Sialyltransferasen ST6GAL1, ST6GALNAC6, ST8SIA1, ST8SIA2 und ST8SIA3 zeigten sich signifikante positive Korrelation der delta-CT-Werte mit den delta-CT-Werten von inflammatorischen und mikroglialen Markern, sie wurden also stärker transkribiert wenn Mikroglia- und Inflammationsmarker stärker transkribiert wurden. Für ST3GAL5 und ST8SIA5 zeigte sich ein entgegengesetzter Trend. Bei höherer Transkription inflammatorischer Zytokine und Mikrogliamarker wurden diese Sialyltransferasen geringer transkribiert, im Fall von ST8SIA5 waren die Zusammenhänge meist statistisch signifikant. Die Ergebnisse finden sich tabellarisch im Anhang S. 100.

4. Diskussion

In der aktuellen Leitlinie der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft e.V. von 2015 werden zur Therapie der AMD vorrangig allgemeine Maßnahmen wie eine Optimierung des Risikoprofils sowie in einigen Fällen die Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln empfohlen. Bei Auftreten von Neovaskularisationen stehen unter anderem intravitreale VEGF-Injektionen, Lasertherapie oder Makulachirurgie als Optionen zur Verfügung. Darüber hinaus wurden 2023 für die Therapie der geographischen Atrophie, einem fortgeschrittenen Stadium der trockenen altersabhängigen Makuladegeneration mit Pegcetacoplan und Avacincaptad pegol bereits zwei Komplement-Inhibitoren durch die FDA in den USA zugelassen, also Wirkstoffe, welche Komponenten des Immunsystems als Angriffsziel haben. Ein mit Sialinsäuren beschichteter Nanopartikel zur intravitrealen Applikation wird momentan im Rahmen von Studien bezüglich seiner Eignung zur Behandlung der geographischen Atrophie am Menschen erforscht (Bakri et al., 2023). In dieser Arbeit wurde mit zum Teil neu entwickelten Verfahren das Vorkommen von Sialinsäuren verschiedener Kettenlängen in der humanen Retina untersucht. Außerdem wurden mögliche Einflussfaktoren auf das Vorkommen von Sialinsäuren betrachtet. Neben dem Einbezug der vorliegenden Informationen zu den Gewebespendern erfolgte dazu die Analyse der Transkription verschiedener Sialyltransferasegene und inflammatorischer Marker sowie der Anzahl und Aktivität von Mikroglia. Dieses Wissen dient dazu, ein besseres Verständnis von zugrundeliegenden physiologischen und pathologischen Prozessen zu erhalten. Eine Limitation der vorliegenden Untersuchung besteht in der Heterogenität des Probenkollektivs. Das untersuchte Gewebe stammt von fünf Spendern (drei männlich, zwei weiblich) im Alter zwischen 52 und 80 Jahren. Auch ist möglich, dass die unterschiedlichen Todesursachen, insbesondere verschiedene intrakranielle Blutungen oder eine Sepsis, Einfluss auf das Vorkommen oder die Struktur von Sialinsäuren haben.

4.1 Quantifizierung der gesamten Sialinsäuren in humanen Retinae

Es wurde ein Protokoll zur Vorbereitung von Gewebeproben für die Analyse mittels Aminoff-Methode entwickelt, bei dem die Probe einer sauren Hydrolyse unter Einwirkung von Hitze unterzogen wurde. Es zeigten sich bei der Analyse von Gewebeproben nach diesen Vorbereitungsschritten ein signifikant höheres messbares Signal, welches nicht signifikant durch die Interferenz durch cDNA beeinflusst wurde und nicht von der für die Verdünnung der Proben verwendeten Lösung abhängig war, weshalb zur Konservierung der Proteine in den Proben RIPA-Puffer verwendet wurde. Bei Analyse freier Sialinsäuren (Neu5Ac-Standards) zeigte sich nach den Vorbereitungsschritten mit saurer Hydrolyse unter Hitzeeinwirkung über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich signifikant niedrigere Fluoreszenzwerte als ohne die vorbereitenden Schritte. Eine mögliche Erklärung liefert hier eine Publikation von Zhu et al., in der gezeigt wurde, dass es abhängig vom pH-Wert schon nach einer Stunde zu einer Abnahme der messbaren Neu5Ac-Konzentration kommt, und dieser Prozess durch Zugabe von Oxidantien verstärkt wird (Zhu et al., 2020). In einer älteren Studie wird in diesem Kontext eine Schwäche des Verfahrens mit Thiobarbitursäure vermutet, da sich bei anderen Analysemethoden nach einer Säurebehandlung unter Hitzeeinwirkung keine so starke Abnahme der messbaren Sialinsäurekonzentration zeigte (Karkas et Chargaff, 1964). Im Gehirn liegen nur etwa 3 % der Sialinsäuren in freier Form vor, während der Rest in gebundener Form vorliegt (Rawal et Zhao, 2021). Aufgrund dessen fällt es mutmaßlich nicht so stark ins Gewicht, dass von den freien Sialinsäuren im Mittel lediglich 83,56 % messbar waren. Es erfolgte keine detaillierte Untersuchung, welcher Schritt der Gewebepreparation zu einer Reduktion der messbaren Menge freier Sialinsäuren führt. Als alternatives Verfahren wäre eine enzymatische Freisetzung der Sialinsäuren aus dem Gewebe durch Behandlung mit Sialidasen denkbar, da hier Verluste durch die chemische Hydrolyse wegfallen würden. Die Freisetzung mittels Sialidase wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Abschließend wurde die Genauigkeit der Methode dadurch optimiert, dass statt der Extinktion die Fluoreszenz der in den Reaktionen entstehenden chemischen Verbindung bestimmt wurde, wie sie bereits in kommerziellen Kits Anwendung findet. Dadurch

erfolgte insbesondere in den relevanten Bereichen niedriger Sialinsäurekonzentrationen eine genauere Detektion von Konzentrationsunterschieden.

Für die mittels Aminoff-Methode bestimmte Menge der gesamten Sialinsäuren nach saurer Hydrolyse des Gewebes ergab sich eine Konzentration von 7,51 μg Sialinsäuren pro mg Protein mit einer Standardabweichung von 1,88 μg Sialinsäuren pro mg Protein. Es zeigten sich bei einem Gewebespender eine im Vergleich zu drei der anderen Gewebespender signifikant niedrigere Gesamtsialinsäurekonzentration. Darüber hinaus war für drei Probanden ein signifikanter Unterschied zwischen den Retinaprobe aus dem rechten und dem linken Auge nachweisbar. Dem könnten auch mögliche Unterschiede im Vorkommen von Sialinsäuren in verschiedenen Retinaregionen zugrundeliegen, da nicht eindeutig bekannt war, aus welchen Regionen der Pars optica der Retina die Proben entnommen wurden. Beim Vergleich der Proben untereinander zeigten sich auch teilweise signifikante Unterschiede. Es ließen sich in der frei zugänglichen Literatur keine direkt vergleichbaren Werte zum Vergleich mit den Ergebnissen finden. Bei Bestimmungen der gesamten Sialinsäuren mit einer modifizierten Aminoff-Methode im Serum fanden sich in einer Studie an Patienten mit rheumatischer Mitralstenose mit und ohne Vorhoffthrombus Sialinsäurekonzentrationen \pm Standardabweichung von 192.54 ± 64.57 bzw. 152.30 ± 58.59 mg/l (Pulimamidi et al., 2013). Eine andere Studie mit Untersuchung von gesunden Kontrollen, Probanden mit chronischer Gingivitis oder chronischer Peridontitis ergab bei Anwendung einer modifizierten Aminoff-Methode Serumkonzentrationen für die Gesamtsialinsäuren \pm Standardabweichung von $49.75 \pm 7,87$ mg/dl, $65,65 \pm 3,56$ mg/dl und $75,98 \pm 3,58$ mg/dl (Rathod et al., 2014). Unter der Annahme, dass im menschlichen Serum oder Plasma die Menge an Proteinen 60-100 mg/ml beträgt (im Protokoll des BCA-Assay vorgeschlagene Menge) lassen sich so für das menschliche Serum unter Annahme von 80 mg Protein/ml aus der ersten Arbeit Vergleichswerte zwischen 2,41 und 1,90 μg Sialinsäuren pro mg Protein berechnen. Für die zweite darstellte Arbeit ergeben sich Wert von 6,22 bis 9,50 μg Sialinsäuren pro mg Protein. Diese Werte aus der Literatur liegen grundsätzlich in einem ähnlichen Bereich wie die experimentell ermittelten Werte.

4.2 Quantifizierung der Polysialinsäuren in humanen Retinae

Die Funktion von Sialinsäuren ist maßgeblich von der Verbindung abhängig, in der sie vorkommen. In diesem Kontext ist auch die Polymerisierung von Sialinsäuren, bei der Oligo- und Polysialinsäuren entstehen, relevant. In vielen bisherigen Studien wurden niedermolekulare Sialinsäuren mit einem durchschnittlichen Polymerisierungsgrad von 20 untersucht, da gezeigt werden konnte, dass diese mit verschiedenen im Immunsystem relevanten Strukturen, wie Siglec-11 (Wang et Neumann, 2010) und Properdin (Shahraz et al., 2022) interagieren und Effekte *in vitro* und *in vivo* haben. Die Analyse der natürlich vorkommenden Sialinsäuren stellt aufgrund der einleitend beschriebenen Komplexität jedoch nach wie vor eine Herausforderung dar, weshalb ein Sandwich-ELISA entwickelt wurde, um Polysialinsäuren zu detektieren. In der Vergangenheit wurde bereits ein ELISA zur Detektion von Polysialinsäuren entwickelt (Tajik et al., 2020). Dieser ist allerdings Lektin-basiert, und Lektine weisen eine deutlich geringere Bindungsaffinität zu ihrem Substrat auf (Liyanage et Yan, 2020). Die Entwicklung in dieser Arbeit erfolgte durch schrittweise Modifikation eines Muster-Protokolls aus einem Handbuch der Firma Thermo Fisher Scientific. In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine starke Abhängigkeit des messbaren Signals vom pH-Wert des verwendeten Waschpuffers insbesondere im Bereich von pH-Werten über sieben bestand, was mutmaßlich durch eine pH-abhängige Bindungsaffinität verschiedener Komponenten verursacht wurde. Auch die Verwendung eines Detergens im Waschpuffer hatte einen wesentlichen Einfluss auf das messbare Signal, am ehesten dadurch, dass sich durch das Detergens schwach und oder unspezifisch gebundene Komponenten effektiver beseitigen ließen. Um die unspezifische Bindung weiter zu reduzieren wurde aus verschiedenen Blocking-Puffern eine Lösung mit 0,5 % Fischgelatine gelöst in Waschpuffer als am geeignetsten ermittelt und für die Experimente verwandt. Es fanden sich keine Hinweise darauf, dass unspezifische Bindungen der Komponenten des Detektionssystems untereinander oder an die ELISA-Platte zu einer signifikanten Veränderung des Signals führt. Die Dauer der im letzten Schritt des ELISA erfolgende Inkubation der Meerrettichperoxidase mit ihrem Substrat TMB hatte erwartungsgemäß einen maßgeblichen Einfluss auf das resultierende Extinktionssignal. Es wurde eine Inkubationszeit von 10 Minuten gewählt,

da sich hier Messwerte für das gemessene Extinktionssignal in einem sinnvollen Messbereich zeigten.

Zusammenfassend konnte ein neues Verfahren entwickelt werden, mit dem die Detektion von Polysialinsäuren schon in sehr geringen Mengen von weniger als 1 ng/ml möglich war. Bei Zugabe von Polysialinsäuren zu einer Gewebeprobe konnte gezeigt werden, dass die zugegebenen Polysialinsäuren im Bereich geringer Polysialinsäurekonzentrationen zuverlässig detektiert wurden, und die Schritte zur Vorbereitung des Gewebes keinen signifikanten Einfluss auf das gemessene Signal hatten. Da initial aufgrund der neuen Methode unklar war, mit welcher Menge an Polysialinsäuren in den Retinaprobe zu rechnen ist, wurde für die Durchführung der Experimente eine Standardkurve mit acht Standards von 0 – 10ng Polysialinsäuren pro Milliliter verwandt. Um den Messbereich zu ermitteln erfolgte die Bestimmung von Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze durch eine Berechnung des Signal-Rausch-Verhältnisses. Für die geringste untersuchte Polysialinsäurekonzentration von 0,1 ng/ml ergab sich ein Wert von 2,50. Bei Messung des Quotienten für die höchste untersuchte Polysialinsäurekonzentration von 10 ng/ml wurde ein Wert von 8,24 berechnet. Die ermittelten Signal-Rausch-Verhältnisse liegen grundsätzlich nahe dem Bereich der empfohlenen Werte in der „ICH Q2(R2) - Validation of Analytical Procedures - Scientific Guideline“ der Europäischen Arzneimittel-Agentur, welche im Kontext klinischer Zulassungsverfahren Anwendung findet. Hier werden Signal-Rausch-Verhältnisse von 3:1 für die Nachweisgrenze und 10:1 für die Bestimmungsgrenze empfohlen. Eine leichte Unterschreitung der Werte in dieser frühen Testvalidierungsphase und Pilotstudie ist möglicherweise auch durch die rauscharme Probenmatrix und die Detektion mittels eines sehr empfindlichen Mikroplatten-Lesegeräts mitbedingt. Reliabilität und Validität des entwickelten Verfahrens wurden durch Detektion eines konzentrationsabhängigen Signals gezeigt, welches nicht relevant durch das Vorhandensein von DNA beeinflusst wurde. Die Reproduzierbarkeit des Verfahrens konnte durch den Vergleich der Mittelwerte der ermittelten Extinktionswerte in mehreren unabhängigen Experimenten und durch eine erfolgreiche Nutzung zur Messung der Polysialinsäurekonzentration in Serum- und Milchproben laborintern durch Vibha Anantha Simha, sowie im Rahmen einer anderen Studie (Müller-Miny et al., 2023) demonstriert werden. Experimente von

Vibha Anantha Simha zeigten, dass der ELISA geeignet war Polysialinsäuren mit einem durchschnittlichen Polymerisierungsgrad von 60 zu detektieren und Polysialinsäuren kürzerer Kettenlängen (getestet wurden durchschnittliche Polymerisierungsgrade von 20 und 50) nicht zuverlässig detektiert wurden. Dies ist relevant, da wie oben erwähnt insbesondere Polysialinsäuren mit einem durchschnittlichen Polymerisierungsgrad von 20 bezüglich ihrer Funktion im Immunsystem genauer beschrieben sind. Bei der Analyse der Spenderproben zeigten sich Polysialinsäurekonzentrationen von 0,02 ng/ml bis 0,67ng/ml. Da die in der Standardkurve analysierten Werte teilweise weit über den in den Proben gemessenen Werten lagen, lässt sich die Genauigkeit des Verfahrens insbesondere bezüglich der Detektion von Unterschieden zwischen verschiedenen Proben mutmaßlich dadurch verbessern, dass für die Standardkurve geringere Polysialinsäurekonzentrationen verwendet werden. Um die Spezifität des Verfahrens nachzuweisen, könnte in weiteren Experimenten untersucht werden, wie das messbare Signal durch eine Vorbehandlung mit einer Sialidase oder eine saure Hydrolyse beeinflusst werden kann. Zukünftige Forschung sollte zur Validierung der Ergebnisse außerdem einen Vergleich mit anderen analytischen Verfahren beinhalten. Hier sind exemplarisch massenspektrometrische Verfahren und solche auf Basis einer Anionenaustausch-Chromatographie zu nennen (Villanueva-Cabello et al., 2022). Exemplarisch wurde vor kurzem eine neue Methode zur Detektion von Oligo- und Polysialinsäuren mittels Permethylierung und anschließender Analyse mit Tandem MALDI-TOF Massenspektrometrie entwickelt. Durch die Permethylierung werden die negativ geladenen Sialinsäuren stabilisiert und ionisierbar gemacht. Die Methode erlaubt eine sensitive Detektion und strukturelle Analyse von Sialinsäuren und eignet sich besonders für die Untersuchung komplexer, polysialylierter Glykopeptide (Suzuki et al., 2025). Der ELISA wurde zum experimentellen Einsatz entwickelt. Sofern das Verfahren zukünftig im klinisch-diagnostischen Bereich Anwendung finden sollte ist eine Validierung und Anpassung der Sicherheits- und Leistungsanforderungen an die „Verordnung über In-vitro-Diagnostika“ der Europäische Arzneimittel-Agentur notwendig. Die Bestimmung der Polysialinsäurekonzentration humaner Retinaprobe mittels des entwickelten Sandwich-ELISA zeigte eine durchschnittliche Polysialinsäuremenge von 0,069 ng Polysialinsäuren pro mg Protein mit einer Standardabweichung von 0,048 ng. Es zeigten sich weder für die Spender, noch bei Betrachtung der einzelnen Proben

signifikante Unterschiede. In dem von Tajik et al. entwickelten ELISA zur Detektion von Polysialinsäuren wurden für das menschliche Serum Konzentration um 100 ng Polysialinsäuren pro ml Serum ermittelt (Tajik et al., 2020). Bei der Annahme von 80 mg Protein/ml ergibt sich so eine Konzentration von 1,25 ng/mg Protein. In einem von Piras et al. entwickelten Sandwich-ELISA zur Detektion von PSA-NCAM im Serum wurden andere Antikörper und Reagenzien verwendet. In der Publikation werden nur relative Unterschiede angegeben und keine absoluten Polysialinsäurekonzentrationen im Serum (Piras et al., 2015). In beiden Publikationen wird nicht angegeben, Polysialinsäuren welcher Kettenlänge untersucht wurden.

4.3 Immunhistochemie von Sialinsäuren in humanen Retinae

Bei immunhistochemischen Färbungen von Sialinsäuren verschiedener Kettenlängen in humanen Retinae waren Polysialinsäuren vor allem in den inneren Retinaschichten anfärbbar (Nervenfaserschicht, der Ganglienzellschicht und der inneren plexiformen Schicht), während die kurzkettigen Trisialinsäuren sich fleckig in der gesamten Retina, insbesondere in den äußeren Schichten anfärben ließen (Schicht der Segmente der Fotorezeptoren und der Nervenfaserschicht). Um der begrenzten Vergleichbarkeit absoluter Signalintensitäten aufgrund der Verwendung von zwei verschiedenen konfokalen Mikroskopen und unterschiedlichen Antikörpern Rechnung zu tragen, wurden in der Auswertung ausschließlich hintergrundkorrigierte, integrierte Signalintensitäten verwendet, die einer z-Standardisierung unterzogen wurden. Diese Vorgehensweise diente dazu eine Vergleichbarkeit herzustellen, die statistische Analysen relativer Zusammenhänge zwischen den Signalen möglich machte. Davon unbeeinflusst bleiben technisch bedingt Unterschiede zum Beispiel durch Zugänglichkeit der Epitopstruktur, Spezifität und Affinität der Antikörper und unterschiedliche Signalverstärkung. Fixierung, Färbung, Bildaufnahme und -auswertung erfolgten unter streng standardisierten Bedingungen um vermeidbare technische Varianz zu minimieren. Bei Betrachtung der gesamten Retina zeigte sich ein gestaffeltes Vorkommen der Sialinsäuren mit stärkerer Anfärbbarkeit bei kürzerer Kettenlänge. In der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht fand sich im Gegensatz dazu eine starke

Anfärbbarkeit von Polysialinsäuren, welche mit dem einen Polysialinsäure-Antikörper (Klon 12F8) anfärbbar waren und welche sich signifikant von der Färbung von Polysialinsäuren mit dem anderen Polysialinsäure-Antikörper (Klon 2-2B) unterschied. Eine mögliche Erklärung liefern hier die unterschiedlichen Epitope der Antikörper, dies ist im Fall von dem Polysialinsäure-Antikörper Klon 12F8 noch nicht genau charakterisiert. Bei Vergleich der Färbungsintensitäten verschiedener Sialinsäuren innerhalb einer Schicht zeigte sich für die inneren Schichten (innere und äußere Körnerschicht, äußere plexiforme Schicht und die Schicht der Segmente der Fotorezeptoren) signifikant höhere Intensitäten der A2B5-Färbung kurzkettiger Sialinsäuren im Vergleich zu den Färbungen längerkettiger Sialinsäuren (CD56 (Klon 12F8) und PSA-NCAM (Klon 2-2B)), welche sich untereinander nicht signifikant unterschieden. In der Publikation von Karlstetter et al. erfolgte die Färbung humaner Retinae nach gleichem Protokoll, jedoch ohne detaillierte Auswertung der Färbungsintensität (wie bei der in dieser Arbeit durchgeführte Bestimmung der integrierten, hintergrundkorrigierten, z-standardisierten Färbungsintensität), sondern eine rein visuelle Beurteilung (Karlstetter et al., 2017). In dieser zeigte sich grundsätzlich ein ähnliches Bild, lediglich die Färbung von CD56 zeigte in dieser Arbeit höhere Intensitäten im Bereich der inneren plexiformen Schicht, und bei der Färbung von Trisialinsäuren wiesen die äußersten Schichten (Schicht der Ganglienzellen und Nervenfasern, sowie die Schicht der Segmente der Fotorezeptoren) eine höhere Färbungsintensität auf. Mit einem in dieser Arbeit nicht verwendeten Antikörper konnten Polysialinsäuren an NCAM in der Retina von Zebrafischen (Kustermann et al., 2010), Molchen (Becker et al., 1993), Mäusen (Bartsch et al., 1990) und Ratten angefärbt werden. In der Retina der Ratte ließen sich so Polysialinsäuren in der gesamten Retina anfärben mit besonders starker Intensität der Färbung in der äußeren und inneren plexiformen Schicht. Immunreaktivität ließ sich auch in der Choroidea und dem subretinalen Bindegewebe nachweisen. Die Autoren konnten außerdem zeigen, dass Müller-Zellen an NCAM gebundene Polysialinsäuren auf ihrer Membran exprimieren, und dass das durch den Antikörper erkannte Epitop Sialidase-sensibel ist (Sawaguchi et al., 1999). Insgesamt scheinen Sialinsäuren verschiedener Kettenlängen in unterschiedlichen retinalen Schichten unterschiedlich stark vorzukommen, weshalb der gewählte Ansatz einer nach histologischer Schicht differenzierenden Untersuchung

sinnvoll scheint und auch für zukünftige Untersuchungen gewählt werden sollte. Die Frage, welche Sialinsäure-Verbindungen in welcher Retinaschicht und mit welchem Polymerisierungsgrad vorkommen, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nur teilweise beantwortet werden, da sowohl durch den Sandwich-ELISA, als auch durch die Immunhistochemie nur jene Sialinsäuren quantifiziert beziehungsweise dargestellt wurden, welche als Epitope der gewählten Antikörper fungieren.

4.4 Einfluss des Alters auf die untersuchten Sialinsäuren

In der Vergangenheit wurde bereits für Fibroblasten (Itakura et al., 2016) und Erythrozyten (Kumar et Rizvi, 2013) gezeigt, dass die Mengen an Sialinsäuren an der Zelloberfläche mit dem Alter abnimmt. Auch in verschiedenen Geweben wurde eine altersabhängige Abnahme der Sialinsäuremenge beschrieben, so zum Beispiel in den Gangliosiden des Rattengehirns (Sprenger et al., 2009) und dem Nervensystem des Seidenwurms (Soya et al., 2017). Für den Menschen konnte gezeigt werden, dass die Menge an Gangliosiden im Gehirn, welche die Struktur sind, an die die meisten Sialinsäuren gebunden sind, im Alter abnimmt (Chiricozzi et al., 2020). Massenspektrometrisch wurde eine altersabhängige Abnahme von Polysialinsäuren in Frontal- und Okzipitallappen des menschlichen Gehirns nachgewiesen (Sarbu et al., 2017). Auch für die Expression von Polysialinsäure-NCAM und andere Sialoproteine konnte eine altersabhängige Abnahme gezeigt werden (Marini et al., 2021). Im Muskelgewebe der Maus zeigte sich entgegengesetzt dazu eine Zunahme von Polysialinsäuren bei einer Abnahme der Gesamtsialinsäuren (Marini et al., 2021). In einem Mausmodell mit einem heterozygoten GNE-Knockout zeigte sich im mittleren Alter eine reduzierte Menge membrangebundener Sialinsäuren und damit einhergehend ein ausgeprägter Verlust von Neuronen im Hippocampus und der Substantia nigra mit dem Alter im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Klaus et al., 2020). Im Rahmen der Experimente in dieser Arbeit fand sich kein signifikanter Einfluss des Alters auf die messbare Menge der Gesamtsialinsäuren und der im Sandwich-ELISA bestimmte Menge an Polysialinsäuren. Hierbei ist allerdings die geringe Größe der Stichprobe zu berücksichtigen. Für die verschiedenen Sialinsäurefärbungen zeigte sich für alle

Kettenlängen für fast alle Gewebeschichten eine signifikante positive Korrelation der Färbungsintensität mit dem Spenderalter. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass es sich bei den untersuchten Gewebespendern nicht um eine große Anzahl handelte und diese eine relativ homogene Verteilung des Alters aufwiesen. Dass alle Sialinsäurefärbungen ein ähnliches Ergebnis zeigten, lässt die Ergebnisse prinzipiell plausibel erscheinen, auch wenn aufgrund der einleitenden Ausführungen mit einer Abnahme der Sialinsäuremenge gerechnet wurde. Da sich die Zunahme der Anfärbbarkeit von Sialinsäuren nicht in der Gesamt- oder Polysialinsäurekonzentration widerspiegelt, ist es möglich, dass die Sialinsäuren-Epitope mit dem Alter im Gewebe (ohne vorherige Lyse, wie sie für die Analyse mittels Aminoff-Methode und Sandwich-ELISA durchgeführt wurde) besser zugänglich waren, oder aber, dass die Vorbereitungsschritte, welche vor der Immunhistochemie durchgeführt wurden, auf die Detektion Einfluss hatten. Alternativ scheint plausibler, dass es sich um eine Beobachtung handelt, die auf der homogenen Verteilung von hohem Alter und weiblichem Geschlecht in der untersuchten Stichprobe basiert. Es wäre auch denkbar, dass eine altersabhängige Abnahme nur sehr langkettige Polysialinsäuren betrifft, welche einen höheren Polymerisierungsgrad aufweisen als jene, die mittels Immunhistochemie detektiert wurden. Ein Hinweis darauf könnte die (allerdings nicht signifikante) altersabhängige Abnahme der Polysialinsäurekonzentration in den ELISA-Experimenten sein.

4.5 Einfluss des Geschlechts auf die untersuchten Sialinsäuren

In verschiedenen Studien konnte ein Einfluss des Geschlechts auf die messbare Sialinsäuremenge gezeigt werden. So konnte für das Serum eine Zunahme der Gesamtsialinsäurekonzentration mit dem Alter für Frauen gezeigt werden, während es bei Männern zu einer Abnahme kam (Olaru et al., 2020). Bei an Diabetes mellitus Typ 1 erkrankten Personen wurde auch in allen Subgruppen eine höhere Sialinsäurekonzentration in den Serumproben von Frauen im Vergleich zu Männern nachgewiesen (Crook et al., 2001). Im Serum weiblicher Personen wurden durch Tajik et al. im Vergleich zu Männern signifikant weniger Polysialinsäuren nachgewiesen (Tajik et

al., 2020). In den hier präsentierten Experimenten zeigte sich für weibliche Gewebespende eine signifikant höhere Gesamtsialinsäurekonzentration mit einem Unterschied der Mittelwerte zwischen weiblichen und männlichen Gewebespendern von 1,92 µg Sialinsäuren pro mg Protein, was 28,5 % entspricht. Auch in den Ergebnissen der Färbung von Sialinsäuren verschiedener Kettenlängen zeigte sich über alle Kettenlängen eine signifikant höhere Färbungsintensität in den Proben weiblicher Gewebespende. Bezüglich der mittels Sandwich-ELISA bestimmten Polysialinsäuren zeigten die Proben weiblicher Gewebespende eine geringere Konzentration, der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist zu beachten, dass es sich bei den beiden Gewebespende, deren Proben untersucht wurden, gleichzeitig um die ältesten untersuchten Spende handelte. Die weiblichen Gewebespende waren im Mittel 75,5 Jahre alt, während sich für die drei männlichen Gewebespende ein Mittelwert des Alters von 63,33 Jahren ergab. Dass das Geschlecht der für die Erklärung der Unterschiede relevantere Faktor sein könnte wird dadurch gestützt, dass sich ein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf die Gesamtsialinsäurekonzentration zeigte, welche für das Alter nicht nachweisbar war. Insgesamt ist hier kritisch anzumerken, dass weitere Untersuchungen an einer größeren und bezüglich Alter und Geschlecht heterogeneren Stichprobe notwendig sind, um eine differenzierte Bewertung des Einflusses der Faktoren Alter und Geschlecht zu ermöglichen. Auch möglich systemische oder okuläre Vorerkrankungen der Gewebespende wurden nicht einbezogen.

4.6 Einfluss von Vorkommen und Aktivität von Mikroglia auf die untersuchten Sialinsäuren

Mikroglia wurden durch eine Färbung der Marker Iba-1 und CD68 immunhistochemisch dargestellt. Außerdem wurde die Gentranskription verschiedener mikroglialer Marker durch quantitative real-time Polymerasekettenreaktion untersucht. Iba-1-positive Zellen ließen sich vor allem in der Schicht der Ganglienzellen und Nervenfasern, sowie der inneren plexiformen – und inneren Körnerschicht anfärben. Diese Verteilung der Zellen in der adulten Retina in den plexiformen Schichten, sowie der Schicht der

Ganglienzellen und Nervenfasern und der inneren Körnerschicht mit deutlich geringerer Nachweisbarkeit in der äußeren Körnerschicht und der Segmente der Fotorezeptoren entspricht der in der Literatur beschriebenen Verteilung (Guo et al., 2022), in der auch eine altersabhängige Migration der Mikroglia in äußere Retinaschichten beschrieben wird, deren Korrelat eine signifikante Zunahme Iba-1-positiver Zellen in der gesamten Retina und in der inneren Körnerschicht mit dem Alter sein könnte. Als Limitation dieser Arbeit ist an dieser Stelle zu nennen, dass keine Untersuchung der Morphologie der Mikroglia erfolgte, welche weitere Rückschlüsse auf ihren Funktionszustand zulassen würde. Während in der humanen Retina eine Zunahme der Anzahl von Mikroglia mit dem Alter gezeigt werden konnte (Yi et al., 2020), welche sich auch in dieser Arbeit zeigte, ergaben sich bei der Betrachtung verschiedener Hirnregionen unterschiedlicher Spezies divergierende Befunde (Muzio et al., 2021). Anhand einer Meta-Analyse von Studien zur Quantifizierung von Iba-1 mittels unterschiedlicher Verfahren in Gehirngewebe von Alzheimer-Patienten und gesunden Kontrollen ergab sich, dass Iba-1 von allen Mikroglia-Zellen exprimiert wird und es bei Aktivierung der Zellen zu einer gesteigerten Expression kommt, die Anzahl der Zellen sich aber nicht verändert (Hopperton et al., 2018). CD68 als ein Marker der Phagozytose-Aktivität zeigte eine etwas abweichende Anfärbbarkeit und war insbesondere im Bereich der Fotorezeptoren, der äußeren Körnerschicht und der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht nachweisbar. Eine Zunahme des Vorkommens von CD68 in Mikroglia wurde insbesondere für die weiße Substanz im Gehirn beschrieben, und es wird ein Zusammenhang mit einem gestörten Abbau von phagozytiertem Myelin diskutiert (Safaiyan et al., 2016). Als Zeichen hierfür kann eine signifikante Zunahme der CD68-Färbungsintensität im Bereich der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht mit dem Alter interpretiert werden. Die Gentranskriptionsanalysen zeigten für alle untersuchten Mikroglia-Marker eine stärkere Transkription mit höherem Alter, welche im Fall von Iba-1 und CD68 statistisch signifikant war. Insgesamt deuten die Ergebnisse somit darauf hin, dass es mit dem Alter sowohl zu einer Zunahme der Anzahl von Mikroglia in der Retina kommt, als auch zu einer Zunahme ihrer Phagozytose-Aktivität, welche in dieser Arbeit durch das Vorkommen und die Transkription von CD68 bestimmt wurde. Diese Befunde passen zu einer in der Literatur beschriebenen und auf Genexpressions-Daten basierenden Beobachtung einer erhöhten Mikroglia-dichte und -aktivierung in gealterten humanen

Retinae (Yi et al., 2020). Interessanterweise zeigte sich kein signifikanter Anstieg der Transkription von TMEM119, obwohl dieser allein aufgrund der Zunahme der Zellzahl prinzipiell denkbar erscheint. Dies könnte ein Hinweis auf ein höheres Aktivierungsniveau der vorhandenen Mikroglia sein. Im Mausmodell einer degenerativen Netzhauterkrankung zeigte sich in einer Einzelzell-RNA-Sequenzierung im Vergleich der mutierten mit wildtyp-Mäusen eine verringerte Expression des homöostatischen Mikroglia-Markers TMEM119. Dies wurde was als Hinweis auf eine mikrogliale Aktivierung interpretiert, insbesondere, da auch die Expression von Aktivierungsmarkern zunahm (Kumari et al., 2022). Beim Vergleich der beiden Geschlechter bezüglich des Vorkommens mikroglialer Marker fiel auf, dass, obwohl sich bei weiblichen Gewebespendern signifikant mehr Iba-1-positive Zellen in der gesamten Retina und der inneren plexiformen Schicht fanden und CD68 in der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht signifikant stärker anfärbbar war, sich in den Genetranskriptionsanalysen nur eine signifikant höhere Transkription von TMEM119 zeigte, es also trotz gesteigerter Anzahl und gesteigerter Phagozytose nicht zu einer stärkeren Aktivierung der Mikroglia mit konsekutiver Downregulation von TMEM119 kam. Die Mikroglia-Aktivierungsmarker wurden nicht signifikant vermehrt transkribiert. In der Literatur kommen verschiedene Autoren zu unterschiedlichen Schlüssen bezüglich eines geschlechtsabhängigen Unterschieds der Anzahl von Mikroglia. Es existieren jedoch, sowohl in Mausmodellen, als auch bei der Analyse von menschlichen Gehirnen Hinweise darauf, dass im Gewebe weiblicher Individuen eine stärkere Hochregulation inflammatorischer Gene stattfindet (Lynch, 2022). In einer Studie, die altersabhängige Veränderungen in der Mäuseretina untersuchte, zeigte sich hingegen ein stärkerer Anstieg der Iba-1-Immunoreaktivität in den Proben männlicher Mäuse (Trotta et al., 2021). Bei Betrachtung der Zusammenhänge der mittels Aminoff- und Sandwich-ELISA bestimmten Gesamt- und Polysialinsäuren zeigte sich nur in der inneren plexiformen Schicht und der Schicht mit den Segmenten der Fotorezeptoren eine signifikante positive Korrelation der Polysialinsäuremenge mit der Anzahl Iba-1-positiver Zellen. Für die Gentranskription von Iba-1 und die Färbung und Transkription von CD68 ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge. Bei Korrelation der Gesamt- und Polysialinsäuren mit der Transkription mikroglialer Marker zeigte sich nur eine signifikante positive Korrelation der Transkription von TMEM119 mit der

Gesamtsialinsäuremenge. Nach den Ergebnissen der Färbungen liegt dem am ehesten ein vermehrtes Vorkommen von kurz- und mittels anti-CD56-Antikörper anfärbbaren Sialinsäuren in der Schicht der Ganglienzellen und Nervenfasern, den Segmenten der Fotorezeptoren und der inneren Körnerschicht zugrunde. Zusammenfassend könnte dies darauf hinweisen, dass die höhere Anzahl von Mikroglia sich nicht in einem aktivierten Zustand befinden, da gezeigt werden konnte, dass Mikroglia nach Exposition mit verschiedenen inflammatorischen Stimuli reduzierte Mengen an Sialinsäuren an ihrer Oberfläche exprimieren (Allendorf et al., 2020) und TMEM119 ein homöostatischer Mikroglia-Marker ist. Prinzipiell wurde, da Mikroglia eine wichtige Rolle in Neurodegenerationsprozessen spielen, erwartet, dass Sialinsäuren und insbesondere Polysialinsäuren bei vermehrtem Auftreten von Mikroglia weniger vorkommen. Bei Patienten mit milden kognitiven Einschränkungen etwa konnte eine Dysregulation unter anderem des Kohlenhydratstoffwechsels im Liquor gezeigt werden (Hajjar et al., 2020), und, dass Sialinsäuren bei Personen mit mildem kognitivem Defizit weniger vorkommen und dies mit einer Progression zu einer Alzheimer-Erkrankung assoziiert war (Palmigiano et al., 2016). Bei der Untersuchung der Zusammenhänge von Mikroglia-Vorkommen und -Aktivierung und dem Vorkommen verschiedener Sialinsäuren ergab sich ein abweichendes Bild je nachdem ob ein Vergleich der Sialinsäurefärbungen mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Darstellung von Mikroglia oder der Gentranskription mikroglialer Marker erfolgte. In den Färbungen zeigten sich signifikante positive Korrelationen der Anfärbbarkeit von A2B5 und CD56, sowie Iba-1 in der gesamten Retina und der inneren Körnerschicht. Für die CD68-Färbung ergab die Korrelation mit der A2B5 und der CD56-Färbung vor allem im Bereich von gesamter Retina und der Schicht der Ganglienzellen und Nervenfasern signifikante positive Zusammenhänge. In den Gentranskriptionsanalysen hingegen zeigte sich für die Färbung von A2B5 im Bereich der Segmente der Fotorezeptoren und für die mittels zwei Antikörpern gefärbten Polysialinsäuren (Klon 2-2B und Klon 12F8) im Bereich der äußeren plexiformen Schicht ein signifikanter Zusammenhang einer höheren Färbungsintensität mit einer geringeren Transkription von Iba-1 und CD68. Eine höhere Transkription von TMEM119 ging in der Schicht der Ganglienzellen und Nervenfasern, sowie der inneren plexiformen Schicht für A2B5 und CD56 mit einer signifikant stärkeren

Anfärbbarkeit dieser Sialinsäuren einher. Im Fall von CD56 war dieser Zusammenhang auch für die gesamte Retina statistisch signifikant.

Die Diskrepanz der Ergebnisse macht eine Interpretation schwierig. Ein Aspekt, der die Ergebnisse der Korrelationen mit den Gentranskriptionsanalysen plausibel erscheinen lässt, ist, dass sich gegenläufige Veränderungen für den homöostatischen Marker TMEM119 und die Aktivierungsmarker Iba-1 und CD68 zeigten, auch wenn diese in unterschiedlichen retinalen Schichten nachweisbar waren.

4.7 Einfluss der Transkription inflammatorischer Marker auf die untersuchten Sialinsäuren

Die beiden mittels Gentranskriptionsanalyse betrachteten inflammatorischen Zytokine TNF α und IL1 β zeigten beide eine höhere Transkription mit höherem Alter, die Korrelation war jedoch nur im Fall von IL1 β statistisch signifikant. Zwischen den Geschlechtern zeigten sich keine signifikanten Unterschiede und auch der Vergleich der Gentranskription dieser Marker mit der Gesamt- und Polysialinsäurekonzentration zeigte keine signifikanten Korrelationen. Bei Korrelation der IL1 β -Transkription mit den Ergebnissen der Färbung von Sialinsäuren unterschiedlicher Kettenlänge zeigte sich für A2B5 und CD56 in der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht eine höhere Nachweisbarkeit bei vermehrter Transkription von IL1 β . Für die Polysialinsäurefärbungen (CD56- und PSA-NCAM) ergab sich im Gegensatz dazu in der äußeren plexiformen Schicht eine stärkere Nachweisbarkeit der Sialinsäuren bei geringerer Transkription von TNF α und IL1 β . Dieser Zusammenhang zeigte sich für die Trisialinsäuren (A2B5) im Bereich der Segmente der Fotorezeptoren. Interessanterweise fanden sich hier bei Korrelation der Gentranskriptionsdaten von inflammatorischen Markern und Mikroglia markern und den Ergebnissen der Sialinsäurefärbungen Gemeinsamkeiten, welche von der Kettenlänge abhängig waren. Für die Färbung von Trisialinsäuren war eine geringere Transkription von Iba-1, CD68, TNF α und IL1 β mit einer stärkeren Anfärbbarkeit in der Schicht mit den Fotorezeptoren assoziiert, während für die beiden Färbungen von Polysialinsäuren ein signifikanter Zusammenhang einer geringeren Transkription mit stärkerer Färbungsintensität im Bereich der äußeren

plexiformen Schicht gezeigt werden konnte. Für die Trisialinsäuren und die mittels eines Polysialinsäure-Antikörpers (Klon 2-2B) anfärbbaren Sialinsäuren zeigte sich ebenfalls eine positive Korrelation der CD68-Färbung in der Schicht mit den Fotorezeptoren beziehungsweise der äußeren plexiformen Schicht.

4.8 Einfluss der Sialyltransferase-Transkription auf die untersuchten Sialinsäuren

In der vorliegenden Arbeit wurde die Transkription der Sialyltransferasen, welche eine wichtige Rolle im Sialinsäure-Stoffwechsel spielen und die Schlüsselenzyme der Polysialinsäure-Synthese sind, untersucht, um Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang mit dem Vorkommen verschiedener Sialinsäuren zu finden. Es wurden Sialyltransferasen aus allen vier anhand ihres Substrats und der katalysierten Reaktion unterscheidbaren Gruppen untersucht und solche Sialyltransferasen ausgewählt, die entweder eine hohe absolute Expression im humanen Gehirn zeigen oder im Vergleich zu anderen Organen im Gehirn stark exprimiert werden. Es ließ sich für alle untersuchten Sialyltransferasen eine Transkription in der humanen Retina nachweisen. Bei Analyse der Zusammenhänge zwischen den Enzymen untereinander zeigte sich, dass sich die Sialyltransferasen anhand der Korrelationen untereinander in zwei Gruppen einteilen ließen: Den Sialyltransferasen ST6GAL1, ST6GALNAC6, ST8SIA1, ST8SIA2 und ST8SIA3 in der ersten Gruppe und den Sialyltransferasen ST3GAL5 und ST8SIA5 in der zweiten Gruppe. Innerhalb einer Gruppe bestand jeweils eine signifikante positive Korrelation der Transkription der delta-CT-Werte der Sialyltransferasen untereinander, das heißt, sie wurden geringer transkribiert, wenn die anderen Enzyme dieser Gruppe geringer transkribiert wurden. Zwischen den Gruppen zeigte sich für die Transkription fast aller Enzyme eine negative Korrelation, welche in vielen Fällen statistisch signifikant war. Somit wurde eine Gruppe stärker transkribiert, wenn die andere Gruppe geringer transkribiert wurde. Bei Korrelation mit dem Alter der Gewebespender zeigte sich für alle Sialyltransferasen der ersten Gruppe eine Zunahme der Transkription mit dem Alter, welche für ST6GAL1, ST6GALNAC6, ST8SIA1 und ST8SIA3 signifikant war. Die beiden Sialyltransferasen der zweiten Gruppe wurden im Gegensatz dazu im Alter geringer transkribiert, jedoch nicht signifikant. Für ST3GAL5

und ST8SIA5 zeigte sich bei stärkerer Transkription eine Zunahme der Menge an mit dem ELISA bestimmten Polysialinsäuren, während sich bei den Sialyltransferasen der anderen Gruppe in fast allen Fällen ein negativer Zusammenhang zeigte. Alle Zusammenhänge waren allerdings nicht statistisch signifikant. Von den untersuchten Sialyltransferasen sind ST6GALNAC6 (Hugonnet et al., 2021), ST3GAL5, ST8SIA1 und ST8SIA5 an der Gangliosid-Biosynthese beteiligt (Julien et al., 2013). Im Gangliosid-Stoffwechsel konnten altersabhängige Veränderungen gezeigt werden (Svennerholm et al., 1994), und Veränderungen der Expression von Enzymen des Gangliosid-Stoffwechsels wurden unter anderem mit der neurodegenerativen Erkrankung Morbus Parkinson in Zusammenhang gebracht (Schneider, 2018). Es zeigten sich bei Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Transkription der an der Gangliosid-Synthese beteiligten Sialyltransferasen und der Färbungsintensität von Sialinsäuren unterschiedlicher Kettenlänge in einzelnen Schichten teilweise signifikante Korrelationen. Diese zeigten in der Zusammenschau jedoch kein einheitliches Muster. Es fiel allerdings auf, dass sich für die Trisialinsäurefärbung in der Schicht mit den Segmenten der Fotorezeptoren und für die Polysialinsäurefärbungen im Bereich der äußeren plexiformen Schicht Unterschiede in der Transkription der beiden initial beschriebenen Gruppen zeigten. Eine geringere Transkription der Sialyltransferasen der ersten Gruppe war mit einer stärkeren Anfärbbarkeit von Trisialinsäuren assoziiert, während sich für die zweite Gruppe ein entgegengesetzter Trend zeigte mit einer stärkeren Transkription, welche mit einer stärkeren Anfärbbarkeit einherging. Bei Betrachtung der gesamten Retina fand sich eine signifikant höhere Färbungsintensität für Polysialinsäuren (CD56 und PSA-NCAM-Färbung) bei stärkerer Transkription von ST6GALNAC6. In Darmkrebszellen konnte eine Veränderung der Glykane der Zelloberfläche mit einer verringerten Transkription von ST6GALNAC6 in Verbindung gebracht werden, was möglicherweise zu einer Entzündungs-medierten Karzinogenese beiträgt (Hugonnet et al., 2021). ST6GAL1 katalysiert insbesondere den Transfer von Sialinsäuren an Strukturen der Zelloberfläche. Neben einer Beteiligung an der Glykosylierung von Krebszellen konnte gezeigt werden, dass dies über die Bindung von Sialinsäuren an verschiedene Rezeptoren zu einer Förderung unterschiedlicher inflammatorischer Signalwege beiträgt (Holdbrooks et al., 2020 und Ankenbauer et al., 2023). Es wird in der Literatur für die Expression von ST6GAL1 eine hohe Expression im

Kindesalter und im hohen Alter beschrieben (Catera et al., 2016). Es zeigte sich für A2B5 und CD56 in der Schicht mit den Ganglienzellen und Nervenfasern eine signifikant höhere Färbungsintensität bei stärkerer Transkription von ST6GAL1. Die Enzyme ST8SIA2, ST8SIA3 und ST8SIA4 sind zur Synthese von Polysialinsäuren befähigt. Dabei spielen insbesondere ST8SIA2 und ST8SIA4 in der Produktion von PSA-NCAM eine wichtige Rolle (Hugonnet et al., 2021). Mutationen im ST8SIA2-Gen kommen bei psychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenie, bipolarer Störung und Autismus vor (Sato et al., 2016). Für ST8SIA2 zeigte sich in den äußeren Retinaschichten (OPL, ONL, ISOS) eine in vielen Fällen signifikante Korrelation einer geringeren Transkription mit stärkerer Anfärbbarkeit von Polysialinsäuren (CD56 und PSA-NCAM). Im Vergleich dazu wurde ST8SIA3 in der Ganglien- und Nervenfaserschicht, der inneren plexiformen Schicht, sowie der gesamten Retina signifikant stärker transkribiert bei stärkerer Anfärbbarkeit von CD56 und PSA-NCAM. Bei Korrelation der Transkription der Sialyltransferasen mit Mikroglia- und Entzündungsmarkern zeigten sich erneut ein klarer Unterschied zwischen den eingangs beschriebenen Gruppen. Während die Sialyltransferasen ST6GAL1, ST6GALNAC6, ST8SIA1, ST8SIA2 und ST8SIA3 bei stärkerer Transkription dieser Marker ebenfalls vermehrt transkribiert wurden, zeigte sich für ST3GAL5 und ST8SIA5 ein entgegengesetzter Trend mit geringerer Transkription.

Zusammenfassend zeigten sich interessante Veränderungen der Transkription einiger Sialyltransferasen abhängig vom Alter des Gewebespenders und der Transkription von Mikroglia- und Entzündungsmarkern. Es ließ sich kein globaler, offensichtlicher Zusammenhang zwischen der Transkription und dem Vorkommen verschiedener Sialinsäuren herstellen. Dafür sind verschiedene Gründe denkbar. Grundsätzlich ist die Transkription eines Enzyms nicht der Enzymaktivität gleichzusetzen. Für das Vorkommen von Polysialinsäuren im Ganglion ciliare von Hühnerembryonen konnte gezeigt werden, dass nicht primär das Vorkommen von mRNA von Polysialyltransferasen für das Vorkommen von Polysialinsäuren entscheidend war, sondern es zeigte sich eine Abhängigkeit der Polysialinsäure-Biosynthese sowie der Polysialyltransferase-Aktivität vom Calcium-Spiegel. Zusätzlich wird ein Vorkommen von Polysialinsäuren abhängig von der neuronalen Aktivität beschrieben (Brusés et Rutishauser, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden nicht alle Sialyltransferasen

untersucht. Insbesondere die Transkription von ST8SIA4, welche die Synthese von Polysialinsäuren katalysiert, wurde hier nicht betrachtet. Auch die Expression von Sialidasen und ihre Aktivität, um unter anderem Sialinsäuren aus phagozytierten Glykoproteinen und Glykolipiden zu recyceln, war nicht Gegenstand der Untersuchungen. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass bei Entzündungsprozessen der Retina vermehrt Neuraminidase 1 vorkommt, und dass retinale Ganglienzellen weniger Sialinsäuren aufweisen (Lorenz et al., 2021). Auch wurde die Expression von Rezeptoren der Sialinsäuren, welche für deren biologische Wirkung relevant sind, nicht untersucht. Es existieren Untersuchungen, dass es Diskrepanzen gibt in der Detektion von Polysialinsäuren zwischen verschiedenen Detektionsverfahren, namentlich der Immunhistochemie und der Immunaффinitätschromatographie (Gretenkort et al., 2023).

5. Zusammenfassung

Polysialinsäuren sind polymere Kohlenhydratverbindungen, die im zentralen Nervensystem nicht nur an Entwicklungs- und Regenerationsprozessen beteiligt sind, sondern auch eine Rolle in der Regulation zellulärer und humoraler Immunreaktionen spielen. Entzündungsprozesse haben das Potential Gewebe zu schädigen, und ihre Beteiligung konnte bei einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen gezeigt werden. Ziel dieser Arbeit war deshalb, im Rahmen eines Pilotversuchs mittels zum Teil neuer Verfahren Erkenntnisse zum Vorkommen von Sialinsäuren in der Retina humaner Gewebespende (n = 5, 3m/2w) zu gewinnen und mögliche assoziierte Faktoren zu beschreiben.

Bei der Gesamtsialinsäurekonzentration ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Retinaprobe n verschiedener Spender. Die Polysialinsäurekonzentration zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Proben verschiedener Spender. Immunhistochemisch waren Polysialinsäuren vor allem im Bereich der inneren Retinaschichten nachweisbar, während sich für Trisialinsäuren eine homogenere Färbung in der gesamten Retina zeigte. Bezüglich des Einflusses von Alter und

Geschlecht zeigte sich in den immunhistochemischen Experimenten eine signifikant höhere Anfärbbarkeit von Oligo- und Polysialinsäuren in höherem Alter und bei weiblichen Spendern.

Es konnte eine altersabhängige Zunahme der Anzahl und CD68-Färbungsintensität von Mikroglia, sowie der Gentranskription des inflammatorischen Zytokins IL1 β in der humanen Retina nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Geschlechter zeigte sich bei weiblichen Spendern eine höhere Anzahl von Iba1-positiven Mikrogliazellen, jedoch wurde nur der mikrogliale Homöostase-assoziierte Marker TMEM119 auch höher transkribiert. Zwischen Anzahl und Aktivität von Mikroglia, sowie der Gentranskription inflammatorischer Zytokine und den untersuchten Sialinsäuren ließ sich eine positive Korrelation der Transkription von TMEM119 mit der Gesamtsialinsäuremenge nachweisen. Darüber hinaus ergaben die Sialinsäurefärbungen lediglich Hinweise auf schichtspezifische Veränderungen, ohne dass ein konklusives Gesamtbild ableitbar war.

Die Gentranskription der untersuchten Sialyltransferasen zeigte klare Hinweise auf eine Abhängigkeit vom Alter oder der Transkription von Mikroglia- und Entzündungsmarkern. Das Geschlecht, die Gesamtsialinsäurekonzentration und die Polysialinsäurekonzentration hatten hier keinen signifikanten Einfluss.

Perspektivisch sollten weitere neue zum Beispiel auf Massenspektrometrie basierende Verfahren zur genaueren Analyse der Komplexität unterschiedlicher Mono-, Oligo und Polysialinsäuren etabliert und an einer größeren Stichprobe untersucht werden.

Durch genauere Kenntnisse von Eigenschaften und Vorkommen von Sialinsäuren in humanen Retinae eröffnen sich Perspektiven für die klinische Anwendung als Therapie entzündlicher und degenerativer Erkrankungen der Netzhaut.

6. Anhang

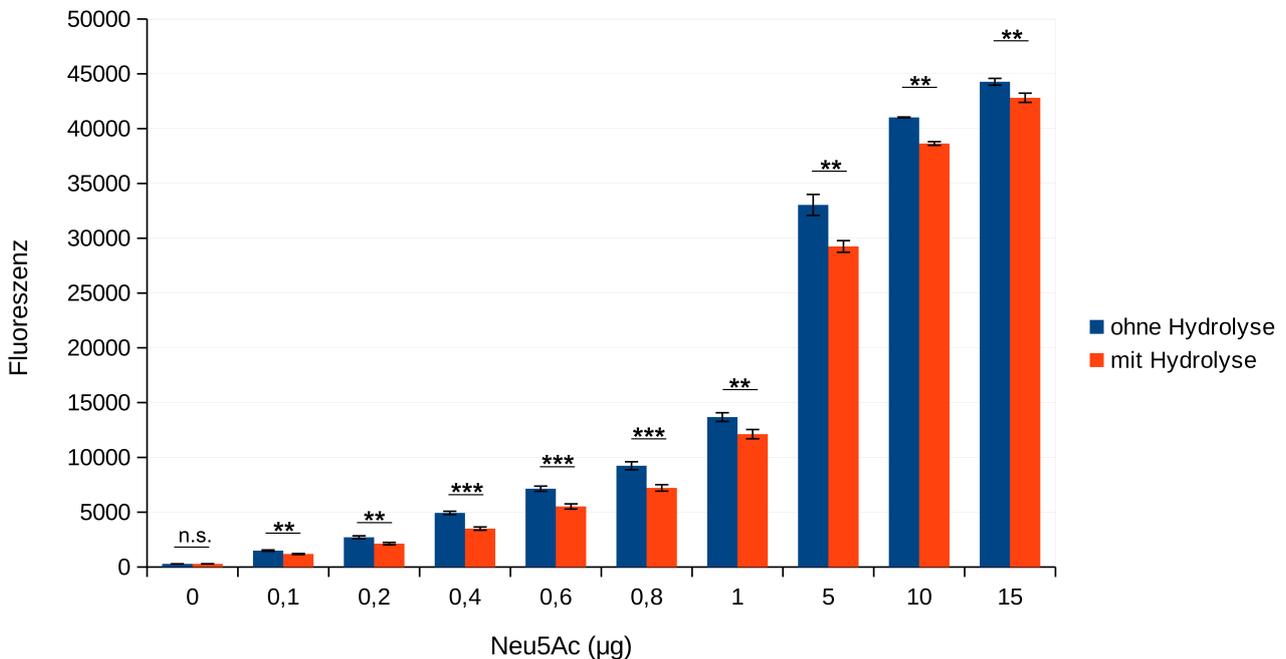


Abb. 20: Auswirkungen des Hydrolyse-Schritts auf die Detektion unterschiedlicher Mengen der ungebundenen Sialinsäure Neu5Ac. Die Standards der ersten Bedingung (ohne Hydrolyse) wurden ohne weitere vorbereitende Schritte analysiert. Bei der zweiten Gruppe (mit Hydrolyse) wurden vor der Analyse die Schritte zur Gewebepreparation (Zugabe von Salzsäure, Erhitzung auf 80 °C für 1 h und Zentrifugation) durchgeführt. Anschließend wurde die Aminoff-Methode durchgeführt und die Fluoreszenz (Exzitation 555nm, Emission 585 nm) gemessen. Im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich zeigt sich eine signifikant niedrigere gemessene Fluoreszenz in den vorbehandelten Standards. Im Mittel betrug die nach den Gewebepreparationsschritten detektierte Sialinsäurekonzentration 83,58 % der Konzentration ohne die Schritte der Gewebepreparation. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen \pm Standardabweichung. Es wurde trotz nicht erfüllter Normalverteilungsvoraussetzung in allen Fällen ein t-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Bei gegebener Normalverteilung und Linearität erfolgte die Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten (N je = 30). Es zeigte sich jeweils eine sehr starke, statistisch signifikante positive Korrelation zwischen Sialinsäurekonzentration und Fluoreszenzsignal. Im Fall ohne Hydrolyse mit $r = 0,938$ ($p = 0,000$) und im Fall mit Hydrolyse $r = 0,952$ ($p = 0,000$). Zum Vergleich der Korrelationskoeffizienten wurde eine Fisher-z-Transformation der Korrelationskoeffizienten durchgeführt. Bei einer Prüfgröße z von 0,483 ($p = 0,631$) ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Korrelationen.

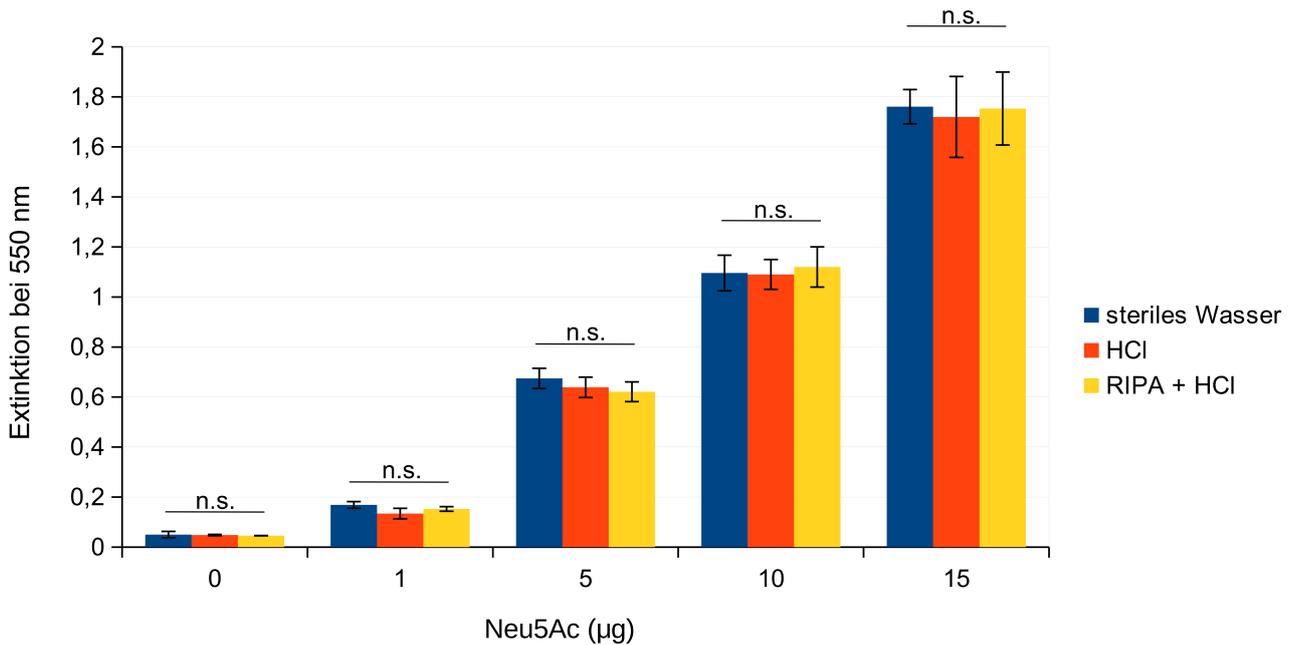


Abb. 21: Effekt verschiedener Verdünnungslösungen auf das gemessene Extinktionssignal bei Analyse von freien Sialinsäuren mittels Aminoff-Methode. Es wurden steriles Wasser, eine 0,1 M Salzsäure (HCl) und 200 µl RIPA (Radioimmunoprecipitation assay)-Puffer mit Zugabe von 28 µl einer 1 molaren Salzsäure verglichen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen ± Standardabweichung. Es zeigte sich kein signifikanter Einfluss der Verdünnungslösung auf die gemessene Extinktion der farbigen Lösung, welche im letzten Reaktionsschritt der Aminoff-Methode entsteht. Zur statistischen Auswertung wurde zum Vergleich der Konditionen bei einer Konzentration von 0 µg Neu5Ac (5-N-Acetyl-Neuraminsäure) bei fehlender Normalverteilung und fehlender Varianzhomogenität eine Welch-ANOVA (Analysis of variance) durchgeführt. Bei den restlichen Konzentrationen waren Normalverteilungs- und Varianzhomogenitätsvoraussetzung erfüllt, weshalb eine ANOVA angewandt wurde. Bei in allen Fällen nicht signifikanten Ergebnissen der ANOVA wurde auf einen post-hoc-Test verzichtet.

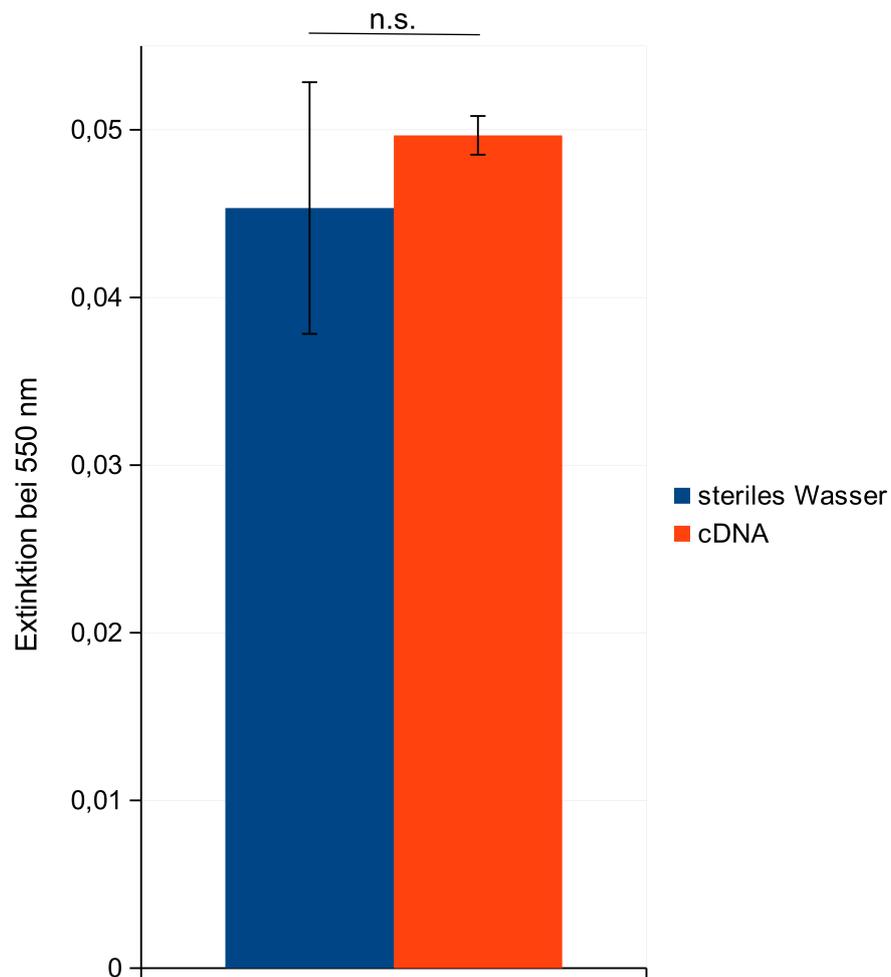


Abb. 22: Einfluss von DNA auf das gemessene Extinktionssignal. Es wurde eine Probe ohne Zugabe von Sialinsäuren (steriles Wasser), sowie eine Probe mit 85,33 μg cDNA (Complementary deoxyribonucleic acid) mittels Aminoff-Methode analysiert und die Extinktion bei 550 nm gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen \pm Standardabweichung. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Hintergrundsignal und dem Extinktionssignal der Probe mit der cDNA. Bei fehlender Normalverteilung und gegebener Varianzhomogenität wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt.

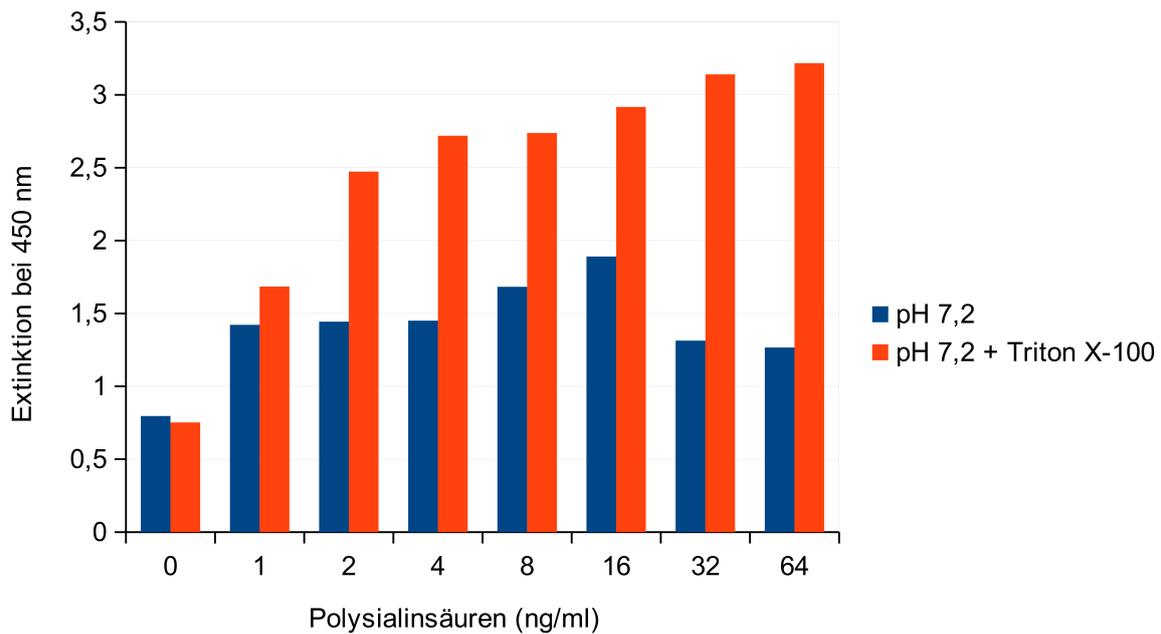


Abb. 23: Einfluss eines Detergens im Waschpuffer auf das gemessene Extinktionssignal. Dargestellt sind die Werte einer Messung. Bei gegebener Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov-Test und erfüllter Linearität wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet. Es ergab sich bei einem pH 7,2 ohne Zugabe von Triton $r = -0,040$ ($p = 0,925$), sowie bei Zugabe von Triton ein $r = 0,620$ ($p = 0,101$). Zum Vergleich ergab sich nach Fisher-z-Transformation eine Prüfgröße $z = -1,21$ ($p = 0,226$) und somit kein signifikanter Unterschied zwischen den Korrelationen.

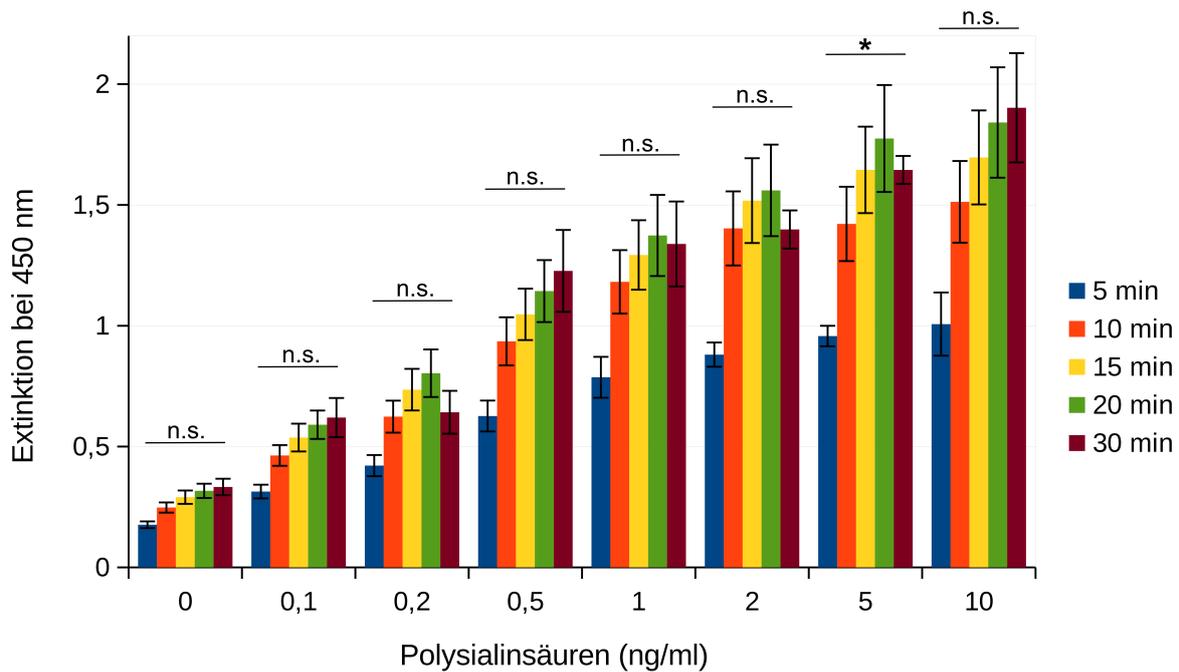


Abb. 24: Vergleich verschiedener Inkubationszeiten der Meerrettichperoxidase mit ihrem Substrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) vor Zugabe von Salzsäure zum Stoppen der Reaktion. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei Messungen mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. Es wurde bei in allen Fällen erfüllter Normalverteilungsvoraussetzungen und fehlender Varianzhomogenität eine Welch-ANOVA durchgeführt. Es zeigten sich bis auf den Vergleich von einer Inkubationszeit von 5 min und 30 min bei einer Polysialinsäurekonzentration von 5 ng/ml ($p = 0,015$) keinerlei signifikante Unterschiede. In der Korrelationsanalyse zeigte sich bei allen Messungen ein signifikanter Pearson-Korrelationskoeffizient (5 min: $r = 0,731$, $p = 0,001$; 10 min: $r = 0,710$, $p = 0,002$; 15 min: $r = 0,727$, $p = 0,001$; 20 min: $r = 0,743$, $p = 0,001$; 30 min: $r = 0,786$, $p = 0,000$), welcher bei erfüllter Normalverteilung und Linearität berechnet wurde. In der Fischer-Z-Transformation zum Vergleich der Korrelationskoeffizienten ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Korrelationskoeffizienten.

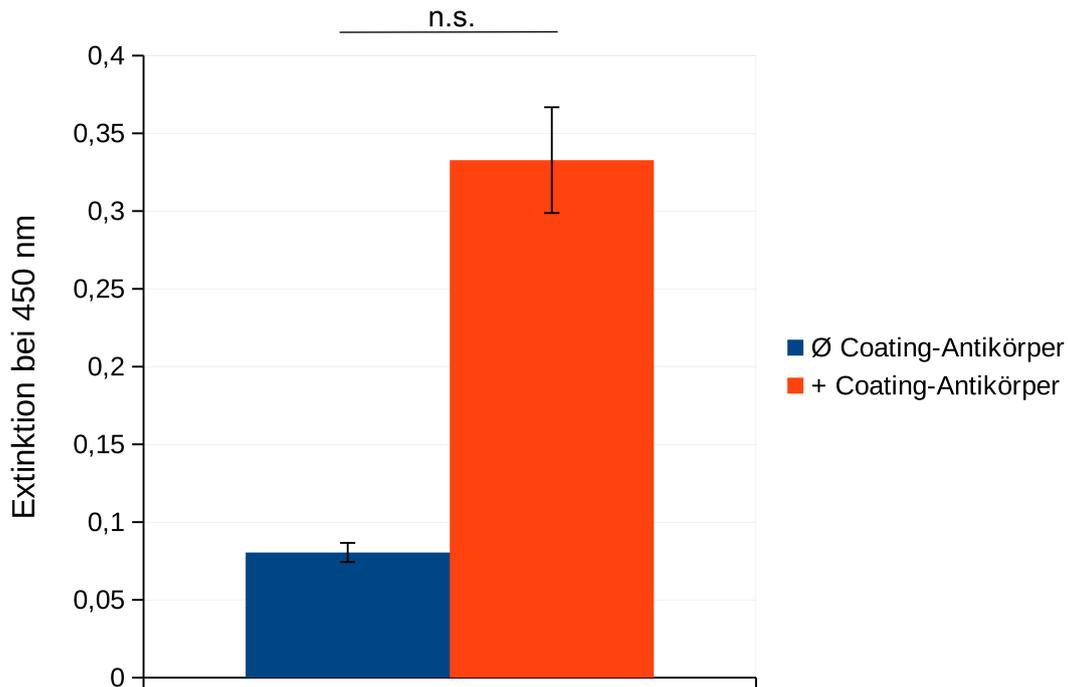


Abb. 25: Testung des Sandwich-ELISA auf unspezifische Bindung. Um den ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) auf unspezifische Bindung der Komponenten des Detektionssystems zu testen erfolgte die Inkubation unter Auslassung des Coating-Antikörpers und ohne Zugabe von Polysialinsäuren. Es wurde in beiden Fällen eine TMB-Inkubationszeit von 30 min gewählt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Messungen ohne Coating-Antikörper und zwei Messungen mit Coating-Antikörper \pm Standardabweichung. Bei fehlender Erfüllung der Normalverteilungs- und Varianzhomogenitäts-Voraussetzung wurde eine Welch-ANOVA (Analysis of variance) durchgeführt, bei fehlender Signifikanz des Ergebnis wurde keine post-hoc Analyse durchgeführt.

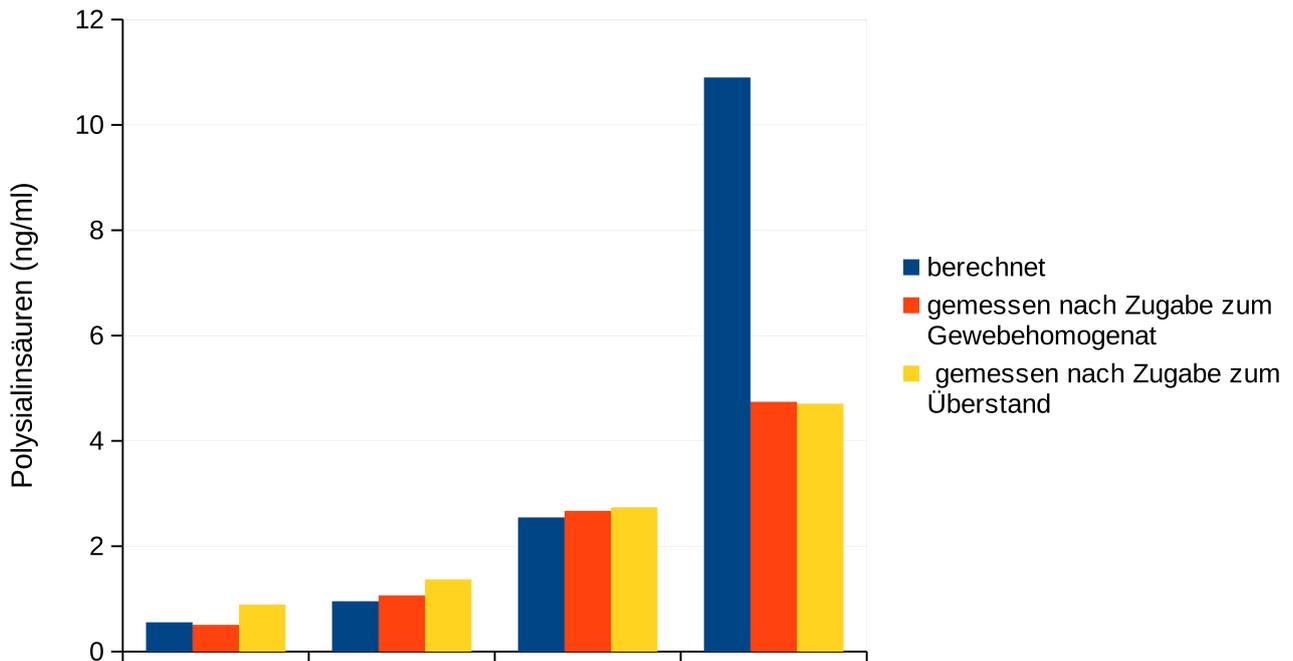


Abb. 26: Beeinflussung des Extinktionssignals durch die Schritte zur Gewebepreparation. Es wurde der Einfluss der Schritte zur Gewebepreparation auf die messbare Polysialinsäurekonzentration im Gewebe untersucht. Dazu wurde eine Mausleberprobe sowohl ohne Zugabe von Polysialinsäuren, als auch mit Zugabe von Polysialinsäuren entweder vor den Schritten zur Gewebepreparation in Form von Zentrifugation und Proteinase-K-Verdau (Zugabe zum Gewebehomogenat) oder nach den Schritten der Gewebepreparation zum gewonnenen Überstand (Zugabe zum Überstand) analysiert und die Polysialinsäuremenge anhand einer Standardkurve berechnet. Es wurde jeweils eine anhand der Probe ohne Zugabe von Polysialinsäuren und der zugegebenen Polysialinsäuren erwartete Polysialinsäurekonzentration berechnet und die Polysialinsäurekonzentration der Proben gemessen. Dargestellt sind die Werte einer Messung. Eine bei gegebener Normalverteilung und Varianzhomogenität durchgeführte ANOVA (Analysis of variance) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten der berechneten Polysialinsäurekonzentration, der gemessenen Polysialinsäurekonzentration bei Zugabe vor der Gewebepreparation und der gemessenen Polysialinsäurekonzentration bei Zugabe nach der Gewebepreparation ($F = 0,265$, $p = 0,773$).

Tab. 13: Korrelation der z-standardisierten, hintergrundkorrigierten, integrierten Färbungsintensitäten der Sialinsäurefärbungen miteinander durch Berechnung der Pearson- Korrelationskoeffizienten.

	A2B5 - CD56	A2B5 - PSANCAM	CD56 - PSANCAM
retina	0,508***	0,340**	0,384***
GCNFL	0,611***	0,546***	0,484***
IPL	0,445***	0,234*	0,283*
INL	0,469***	0,378***	0,151
OPL	0,191	0,196	0,479***
ONL	0,203	0,197	0,483***
ISOS	0,005	0,104	0,127

Tab. 14: Pearson-Korrelationskoeffizienten der Anzahl Iba-1-positiver Zellen und der z-standardisierten, hintergrundkorrigierten, integrierten CD68-Färbungsintensität mit den z-standardisierten, hintergrundkorrigierten, integrierten Intensitäten der verschiedenen Sialinsäurefärbungen in den unterschiedlichen retinalen Schichten, sowie der gesamten Retina.

Iba-1-Färbung			
	Iba-1 – A2B5	Iba-1 – CD56	Iba-1 – PSA-NCAM
retina	0,357**	0,527***	0,189
GCNFL	0,091	0,066	0,005
IPL	0,162	0,249*	0,194
INL	0,299**	0,464***	0,098
OPL	-0,072	0,043	-0,176
ONL	-0,022	-0,215	-0,172
ISOS	-0,134	-0,025	-0,196
CD68-Färbung			
	CD68 – A2B5	CD68 – CD56	CD68 – PSA-NCAM
retina	0,377**	0,280*	0,163
GCNFL	0,480***	0,381***	0,366**
IPL	-0,058	-0,416***	-0,011
INL	0,054	-0,036	0,093
OPL	0,086	0,129	0,468***
ONL	0,181	-0,017	0,136
ISOS	0,489***	0,173	0,197

Tab. 15: Pearson-Korrelationskoeffizienten der Korrelationen der z-standardisierten, hintergrundkorrigierten, integrierten Sialinsäurefärbungsintensitäten mit den delta-CT-Werten der Gentranskription von mikroglialen- und inflammatorischen Markern.

Mikroglia-Marker								
Färbung	Gen	retina	GCNFL	IPL	INL	OPL	ONL	ISOS
A2B5	TMEM119	-0,378	-0,652***	-0,472*	-0,079	-0,241	0,042	0,023
	Iba-1	-0,019	-0,323	-0,082	0,279	-0,030	0,269	0,478*
	CD68	0,070	-0,196	0,016	0,380	0,027	0,190	0,610**
CD56	TMEM119	-0,545**	-0,657***	-0,491*	-0,252	0,342	-0,017	-0,329
	Iba-1	-0,346	-0,468*	-0,295	0,028	0,448*	0,121	-0,207
	CD68	-0,130	-0,274	-0,088	0,238	0,566**	0,246	-0,090
PSA NCAM	TMEM119	-0,258	-0,231	-0,143	0,110	0,343	-0,083	0,002
	Iba-1	-0,281	-0,250	-0,179	-0,045	0,401*	-0,171	0,104
	CD68	-0,151	-0,148	-0,073	0,012	0,501**	-0,209	0,064
Inflammatorische Marker								
Färbung	Gen	retina	GCNFL	IPL	INL	OPL	ONL	ISOS
A2B5	TNF α	0,012	-0,154	0,045	0,302	-0,010	0,035	0,446*
	IL1 β	-0,234	-0,519**	-0,314	0,131	-0,195	-0,028	0,433*
CD56	TNF α	0,079	-0,065	0,129	0,360	0,728***	0,420*	0,016
	IL1 β	-0,354	-0,532**	-0,289	-0,053	0,437*	0,114	-0,292
PSA NCAM	TNF α	0,094	0,065	0,152	0,349	0,673***	0,023	0,165
	IL1 β	-0,206	-0,225	-0,078	0,024	0,444*	-0,199	0,008

Tab. 16: Pearson-Korrelationskoeffizienten der delta-CT-Werte der Sialyltransferasen mit Alter, Gesamtsialinsäurekonzentration und Polysialinsäurekonzentration.

Gen	Alter	Gesamtsialinsäuren	Polysialinsäuren
ST3GAL5	0,214	-0,314	-0,310
ST6GAL1	-0,720***	-0,218	0,168
ST6GALNAC6	-0,685***	0,004	0,189
ST8SIA1	-0,550**	-0,081	0,263
ST8SIA2	-0,095	0,121	0,046
ST8SIA3	-0,412*	-0,084	-0,037
ST8SIA5	0,289	-0,211	-0,255

Tab. 17: Pearson-Korrelationskoeffizienten der z-standardisierten, hintergrundkorrigierten, integrierten Sialinsäurefärbungsintensität mit den delta-CT-Werten der Transkription der Sialyltransferasen.

Färbung	Gen	retina	GCNFL	IPL	INL	OPL	ONL	ISOS
A2B5	ST3GAL5	-0,010	0,008	-0,031	-0,154	0,151	-0,124	-0,441*
	ST6GAL1	-0,197	-0,493*	-0,289	0,114	-0,196	0,052	0,429*
	ST6GALNAC6	-0,153	-0,433*	-0,256	0,113	-0,264	0,072	0,505**
	ST8SIA1	-0,127	-0,406*	-0,204	0,175	-0,147	-0,101	0,504**
	ST8SIA2	-0,015	-0,202	-0,037	0,306	-0,025	0,368	0,266
	ST8SIA3	-0,101	-0,341	-0,263	0,084	-0,175	0,269	0,244
	ST8SIA5	0,029	0,078	0,025	-0,214	0,221	0,066	-0,542**
CD56	ST3GAL5	-0,170	-0,084	-0,132	-0,298	-0,158	-0,103	-0,387*
	ST6GAL1	-0,365	-0,532**	-0,294	-0,086	0,330	-0,016	-0,284
	ST6GALNAC6	-0,397*	-0,540**	-0,350	-0,095	0,186	-0,137	-0,107
	ST8SIA1	-0,175	-0,343	-0,111	0,049	0,436*	0,022	-0,194
	ST8SIA2	-0,131	-0,192	-0,070	0,247	0,589**	0,387*	0,082
	ST8SIA3	-0,504**	-0,587**	-0,473*	-0,229	0,028	-0,188	-0,135
	ST8SIA5	-0,344	-0,156	-0,389*	-0,508**	-0,542**	-0,454*	-0,192
PSA-NCAM	ST3GAL5	-0,167	-0,085	-0,219	0,202	-0,081	0,201	-0,377
	ST6GAL1	-0,296	-0,282	-0,147	-0,115	0,349	-0,331	0,009
	ST6GALNAC6	-0,511**	-0,481*	-0,353	-0,390*	0,096	-0,536**	-0,134
	ST8SIA1	-0,211	-0,174	-0,093	-0,016	0,440*	-0,326	-0,101
	ST8SIA2	-0,075	-0,003	0,022	0,097	0,538**	0,099	0,429*
	ST8SIA3	-0,485*	-0,441*	-0,397*	-0,356	0,004	-0,310	0,027
	ST8SIA5	-0,154	-0,033	-0,318	-0,149	-0,368	0,303	-0,090

Tab. 18: Pearson-Korrelationkoeffizienten der delta-CT-Werte der Transkription der Sialyltransferasen mit denen von mikroglialen- und inflammatorischen Markern

	TMEM119	Iba-1	TNF α	CD68	IL1 β
ST3GAL5	-0,042	-0,247	-0,197	-0,314	-0,235
ST6GAL1	0,742***	0,927***	0,651***	0,868***	0,943***

ST6GALN AC6	0,633***	0,848***	0,517**	0,807***	0,828***
ST8SIA1	0,475**	0,723***	0,788***	0,870***	0,797***
ST8SIA2	0,677***	0,782***	0,607***	0,656***	0,633***
ST8SIA3	0,734***	0,762***	0,235	0,575**	0,651***
ST8SIA5	0,062	-0,340	-0,624***	-0,651***	-0,427*

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Konformationsformeln der drei häufigsten natürlich vorkommenden Sialinsäuren Neu5Ac (N-Acetylneuraminsäure), Neu5Gc (N-Glycolylneuraminsäure) und Kdn (5-Deamino-3,5-Dideoxy-Neuraminsäure)	10
Abbildung 2: Schematische Darstellung der ersten drei Neurone der Sehbahn und ihrer Lage in den retinalen Schichten	24
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA zur Detektion von Polysialinsäuren (polysialic acid; PSA)	37
Abbildung 4: Wirkung des Hydrolyse-Schritts auf die mit der Aminoff-Methode detektierte Sialinsäuremenge in einer Mausleberprobe	45
Abbildung 5: Extinktion von mittels Aminoff-Methode analysierter Neu5Ac-(5-N-Acetyl-Neuraminsäure) Standards unterschiedlicher Konzentration bei 550 nm	47
Abbildung 6: Fluoreszenz von Neu5Ac-(5-N-Acetyl-Neuraminsäure) Standards unterschiedlicher Konzentration bei 585 nm nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 555 nm.	47
Abbildung 7: Einfluss des pH-Werts des Waschpuffers auf das gemessene Extinktionssignal.	49
Abbildung 8: Standardkurve bei Verwendung unterschiedlicher Blocking-Puffer.	50
Abbildung 9: Standardkurve mit den Extinktionswerten von den für die Standardkurve jeweils verwandten Polysialinsäurekonzentrationen.	52
Abbildung 10: Detektion von Polysialinsäuren mittels Sandwich-ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) in Gewebeproben.	52
Abbildung 11: Konfokalmikroskopische Bilder der Polysialinsäure-Immunfärbung der humanen Retina (Klon 2-2B).	56

Abbildung 12: Konfokalmikroskopisches Bilder der Polysialinsäure-Immurfärbung der humanen Retina (Klon 12F8).	57
Abbildung 13: Konfokalmikroskopische Bilder der Trisialinsäure-Immurfärbung der humanen Retina (Klon 105).	57
Abbildung 14: Darstellung der relativen Färbungsintensität der einzelnen Retinaschichten in Relation zur gemessenen Intensität der gesamten Retina für die verschiedenen Sialinsäurekettenlängen, Mittelwerte der Intensitäten der verschiedenen Färbungen aller Spender.	58
Abbildung 15: Darstellung der Sialinsäuren verschiedener Kettenlänge in den Retinaschichten.	59
Abbildung 16: Konfokalmikroskopische Z-Projektion der Iba-1-CD68-Immurfärbung der Choroidea.	62
Abbildung 17: Konfokalmikroskopische Z-Projektionen der Iba-1-CD68-Immurfärbung der humanen Retina.	63
Abbildung 18: Anzahl Iba-1-(ionized calcium-binding adapter molecule 1) positiver Zellen in der humanen Retina.	63
Abbildung 19: Darstellung der relativen CD68-Färbungsintensität der einzelnen Retinaschichten in Relation zur gemessenen Intensität der gesamten Retina für die integrierte, hintergrundkorrigierte CD68-Färbungsintensität.	64
Abbildung 20: Auswirkungen des Hydrolyse-Schritts auf die Detektion unterschiedlicher Mengen der ungebundenen Sialinsäure Neu5Ac.	91
Abbildung 21: Effekt verschiedener Verdünnungslösungen auf das gemessene Extinktionssignal bei Analyse von freien Sialinsäuren mittels Aminoff-Methode	92
Abbildung 22: Einfluss von DNA auf das gemessene Extinktionssignal.	93
Abbildung 23: Einfluss eines Detergens im Waschpuffer auf das gemessene Extinktionssignal.	94
Abbildung 24: Vergleich verschiedener Inkubationszeiten der Meerrettichperoxidase mit ihrem Substrat TMB vor Zugabe von Salzsäure zum Stoppen der Reaktion.	95
Abbildung 25: Testung des Sandwich-ELISA auf unspezifische Bindung.	96

Abbildung 26: Beeinflussung des Extinktionssignals durch die Schritte zur Gewebepreparation.

97

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien	28
Tabelle 2: Puffer und Lösungen	29
Tabelle 3: Primer	30
Tabelle 4: Primär-Antikörper	31
Tabelle 5: Sekundär-Antikörper	31
Tabelle 6: Kits	31
Tabelle 7: Verbrauchsmaterial	31
Tabelle 8: Technische Ausrüstung	32
Tabelle 9: Software	33
Tabelle 10: Vorliegende Informationen zu den Spendern der humanen Retinaprobe	34
Tabelle 11: Mittelwerte der Sialinsäurekonzentration in humanen Retinaprobe	53
Tabelle 12: Mittelwerte der Polysialinsäurekonzentration in humanen Retinaprobe	55
Tabelle 13: Korrelation der z-standardisierten, hintergrundkorrigierten, integrierten Färbungsintensitäten der Sialinsäurefärbungen miteinander durch Berechnung der Pearson-Korrelationskoeffizienten.	98
Tabelle 14: Pearson-Korrelationskoeffizienten der Anzahl Iba-1-positiver Zellen und der z-standardisierten, hintergrundkorrigierten, integrierten CD68-Färbungsintensität mit den z-standardisierten, hintergrundkorrigierten, integrierten Intensitäten der verschiedenen Sialinsäurefärbungen in den unterschiedlichen retinalen Schichten, sowie der gesamten Retina.	98
Tabelle 15: Pearson-Korrelationskoeffizienten der Korrelationen der z-standardisierten, hintergrundkorrigierten, integrierten	

Sialinsäurefärbungsintensitäten mit den delta-CT-Werten der Gentranskription von mikroglialen- und inflammatorischen Markern.	99
Tabelle 16: Pearson-Korrelationskoeffizienten der delta-CT-Werte der Sialyltransferasen mit Alter, Gesamtsialinsäurekonzentration und Polysialinsäurekonzentration.	99
Tabelle 17: Pearson-Korrelationskoeffizienten der z-standardisierten, hintergrundkorrigierten, integrierten Sialinsäurefärbungsintensität mit den delta-CT-Werten der Transkription der Sialyltransferasen.	100
Tabelle 18: Pearson-Korrelationkoeffizienten der delta-CT-Werte der Transkription der Sialyltransferasen mit denen von mikroglialen- und inflammatorischen Markern	100

9. Literaturverzeichnis

Agrawal R, Balne PK, Wei X, Bijin VA, Lee B, Ghosh A, Narayanan R, Agrawal M, Connolly J. Cytokine Profiling in Patients With Exudative Age-Related Macular Degeneration and Polypoidal Choroidal Vasculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2019; 60: 376–382

Akella NM, Ciraku L, Reginato MJ. Fueling the fire: emerging role of the hexosamine biosynthetic pathway in cancer. *BMC Biol* 2019; 17: 52

Allendorf DH, Puigdel·l·ivol M, Brown GC. Activated microglia desialylate their surface, stimulating complement receptor 3-mediated phagocytosis of neurons. *Glia* 2020; 68: 989–998

Alpert A, Pickman Y, Leipold M, Rosenberg-Hasson Y, Ji X, Gaujoux R, Rabani H, Starosvetsky E, Kveler K, Schaffert S, Furman D, Caspi O, Rosenschein U, Khatri P, Dekker CL, Maecker HT, Davis MM, Shen-Orr SS. A clinically meaningful metric of immune age derived from high-dimensional longitudinal monitoring. *Nat med* 2019; 25: 487–495

- Aminoff D. Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *J Biochem* 1961; 81: 384–392
- Angata T, Varki A. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids. *Chem rev* 2002; 102: 439–469
- Ankenbauer KE, Rao TC, Mattheyses AL, Bellis SL. Sialylation of EGFR by ST6GAL1 induces receptor activation and modulates trafficking dynamics. *J Biol Chem* 2023; 299: 105217
- Audry M, Jeanneau C, Imberty A, Harduin-Lepers A, Delannoy P, Breton C. Current trends in the structure-activity relationships of sialyltransferases. *Glycobiology* 2011; 21: 716–726
- Avril T, Attrill H, Zhang J, Raper A, Crocker PR. Negative regulation of leucocyte functions by CD33-related siglecs. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 1024–1027
- Bakri SJ., Jeffrey S. Heier, Arshad M. Khanani, Baruch D. Kuppermann, Carl D. Regillo, Peter K. Kaiser. Glycoimmune Therapy as a Novel Treatment Approach for Geographic Atrophy. *Retinal Physician* 2023; 20: 22–26
- Bartsch U, Kirchhoff F, Schachner M. Highly sialylated N-CAM is expressed in adult mouse optic nerve and retina. *J Neurocytol* 1990; 19: 550–565
- Bassagañas S, Allende H, Cobler L, Ortiz MR, Llop E, Bolós C de, Peracaula R. Inflammatory cytokines regulate the expression of glycosyltransferases involved in the biosynthesis of tumor-associated sialylated glycans in pancreatic cancer cell lines. *Cytokine* 2015; 75: 197–206
- Becker T, Becker CG, Niemann U, Naujoks-Manteuffel C, Gerardy-Schahn R, Roth G. Amphibian-specific regulation of polysialic acid and the neural cell adhesion molecule in development and regeneration of the retinotectal system of the salamander *Pleurodeles waltl*. *Journal Comp Neurol* 1993; 336: 532–544

Belarbi K, Jopson T, Tweedie D, Arellano C, Luo W, Greig NH, Rosi S. TNF- α protein synthesis inhibitor restores neuronal function and reverses cognitive deficits induced by chronic neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 23

Bellenguez C, Küçükali F, Jansen IE, Kleineidam L, Moreno-Grau S, Amin N, Naj AC, Campos-Martin R, Grenier-Boley B, Andrade V, Holmans PA, Boland A, Damotte V, van der Lee SJ, Costa MR, Kuulasmaa T, Yang Q, Rojas I de, Bis JC, Yaqub A, Prokic I, Chapuis J, Ahmad S, Giedraitis V, Aarsland D, Garcia-Gonzalez P, Abdelnour C, Alarcón-Martín E, Alcolea D, Alegret M, Alvarez I, Álvarez V, Armstrong NJ, Tsolaki A, Antúnez C, Appollonio I, Arcaro M, Archetti S, Pastor AA, Arosio B, Athanasiu L, Bailly H, Banaj N, Baquero M, Barral S, Beiser A, Pastor AB, Below JE, Benchek P, Benussi L, Berr C, Besse C, Bessi V, Binetti G, Bizarro A, Blesa R, Boada M, Boerwinkle E, Borroni B, Boschi S, Bossù P, Bråthen G, Bressler J, Bresner C, Brodaty H, Brookes KJ, Brusco LI, Buiza-Rueda D, Bürger K, Burholt V, Bush WS, Calero M, Cantwell LB, Chene G, Chung J, Cuccaro ML, Carracedo Á, Cecchetti R, Cervera-Carles L, Charbonnier C, Chen H-H, Chillotti C, Ciccone S, Claassen JAHR, Clark C, Conti E, Corma-Gómez A, Costantini E, Custodero C, Daian D, Dalmaso MC, Daniele A, Dardiotis E, Dartigues J-F, Deyn PP de, Paiva Lopes K de, Witte LD de, Debette S, Deckert J, del Ser T, Denning N, DeStefano A, Dichgans M, Diehl-Schmid J, Diez-Fairen M, Rossi PD, Djurovic S, Duron E, Düzel E, Dufouil C, Eiriksdottir G, Engelborghs S, Escott-Price V, Espinosa A, Ewers M, Faber KM, Fabrizio T, Nielsen SF, Fardo DW, Farotti L, Fenoglio C, Fernández-Fuertes M, Ferrari R, Ferreira CB, Ferri E, Fin B, Fischer P, Fladby T, Fließbach K, Fongang B, Fornage M, Fortea J, Foroud TM, Fostinelli S, Fox NC, Franco-Macías E, Bullido MJ, Frank-García A, Froelich L, Fulton-Howard B, Galimberti D, García-Alberca JM, García-González P, Garcia-Madrona S, Garcia-Ribas G, Ghidoni R, Giegling I, Giorgio G, Goate AM, Goldhardt O, Gomez-Fonseca D, González-Pérez A, Graff C, Grande G, Green E, Grimmer T, Grünblatt E, Grunin M, Gudnason V, Guetta-Baranes T, Haapasalo A, Hadjigeorgiou G, Haines JL, Hamilton-Nelson KL, Hampel H, Hanon O, Hardy J, Hartmann AM, Hausner L, Harwood J, Heilmann-Heimbach S, Helisalmi S, Heneka MT, Hernández I, Herrmann MJ, Hoffmann P, Holmes C, Holstege H, Vilas RH, Hulsman M, Humphrey J, Biessels GJ, Jian X, Johansson C, Jun GR, Kastumata Y, Kauwe J, Kehoe PG, Kilander L, Ståhlbom AK, Kivipelto M, Koivisto A,

Kornhuber J, Kosmidis MH, Kukull WA, Kuksa PP, Kunkle BW, Kuzma AB, Lage C, Laukka EJ, Launer L, Lauria A, Lee C-Y, Lehtisalo J, Lerch O, Lleó A, Longstreth W, Lopez O, Munain AL de, Love S, Löwemark M, Luckcuck L, Lunetta KL, Ma Y, Macías J, MacLeod CA, Maier W, Mangialasche F, Spallazzi M, Marquié M, Marshall R, Martin ER, Montes AM, Rodríguez CM, Masullo C, Mayeux R, Mead S, Mecocci P, Medina M, Meggy A, Mehrabian S, Mendoza S, Menéndez-González M, Mir P, Moebus S, Mol M, Molina-Porcel L, Montreal L, Morelli L, Moreno F, Morgan K, Mosley T, Nöthen MM, Muchnik C, Mukherjee S, Nacmias B, Ngandu T, Nicolas G, Nordestgaard BG, Olaso R, Orellana A, Orsini M, Ortega G, Padovani A, Paolo C, Papenberg G, Parnetti L, Pasquier F, Pastor P, Peloso G, Pérez-Cordón A, Pérez-Tur J, Pericard P, Peters O, Pijnenburg YAL, Pineda JA, Piñol-Ripoll G, Pisanu C, Polak T, Popp J, Posthuma D, Priller J, Puerta R, Quenez O, Quintela I, Thomassen JQ, Rábano A, Rainero I, Rajabli F, Ramakers I, Real LM, Reinders MJT, Reitz C, Reyes-Dumeyer D, Ridge P, Riedel-Heller S, Riederer P, Roberto N, Rodriguez-Rodriguez E, Rongve A, Allende IR, Rosende-Roca M, Royo JL, Rubino E, Rujescu D, Sáez ME, Sakka P, Saltvedt I, Sanabria Á, Sánchez-Arjona MB, Sanchez-Garcia F, Juan PS, Sánchez-Valle R, Sando SB, Sarnowski C, Satizabal CL, Scamosci M, Scarmeas N, Scarpini E, Scheltens P, Scherbaum N, Scherer M, Schmid M, Schneider A, Schott JM, Selbæk G, Seripa D, Serrano M, Sha J, Shadrin AA, Skrobot O, Slifer S, Snijders GJL, Soininen H, Solfrizzi V, Solomon A, Song Y, Sorbi S, Sotolongo-Grau O, Spalletta G, Spottke A, Squassina A, Stordal E, Tartan JP, Tárraga L, Tesí N, Thalamuthu A, Thomas T, Tosto G, Traykov L, Tremolizzo L, Tybjærg-Hansen A, Uitterlinden A, Ullgren A, Ulstein I, Valero S, Valladares O, van Broeckhoven C, Vance J, Vardarajan BN, van der Lugt A, van Dongen J, van Rooij J, van Swieten J, Vandenberghe R, Verhey F, Vidal J-S, Vogelgsang J, Vyhnalek M, Wagner M, Wallon D, Wang L-S, Wang R, Weinhold L, Wiltfang J, Windle G, Woods B, Yannakoulia M, Zare H, Zhao Y, Zhang X, Zhu C, Zulaica M, Farrer LA, Psaty BM, Ghanbari M, Raj T, Sachdev P, Mather K, Jessen F, Ikram MA, Mendonça A de, Hort J, Tsolaki M, Pericak-Vance MA, Amouyel P, Williams J, Frikke-Schmidt R, Clarimon J, Deleuze J-F, Rossi G, Seshadri S, Andreassen OA, Ingelsson M, Hiltunen M, Sleegers K, Schellenberg GD, van Duijn CM, Sims R, van der Flier WM, Ruiz A, Ramirez A, Lambert J-C. New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias. *Nat Genet* 2022; 54: 412–436

Blix G. Über die Kohlenhydratgruppen des Submaxillarismucins. *Hoppe Seylers Z Phyiol Chem* 1936; 240: 43–54

Boldrini M, Fulmore CA, Tartt AN, Simeon LR, Pavlova I, Poposka V, Rosoklija GB, Stankov A, Arango V, Dwork AJ, Hen R, Mann JJ. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell* 2018; 22: 589-599.e5

Bork K, Weidemann W, Berneck B, Kuchta M, Bennmann D, Thate A, Huber O, Gnanapragassam VS, Horstkorte R. The expression of sialyltransferases is regulated by the bioavailability and biosynthesis of sialic acids. *Gene Expr Patterns* 2017; 23-24: 52–58

Brusés JL, Rutishauser U. Regulation of neural cell adhesion molecule polysialylation: evidence for nontranscriptional control and sensitivity to an intracellular pool of calcium. *J Cell Biol* 1998; 140: 1177–1186

Bruunsgaard H, Pedersen M, Pedersen BK. Aging and proinflammatory cytokines. *Curr Opin in Hematol* 2001; 8: 131–136

Carmona S, Zahs K, Wu E, Dakin K, Bras J, Guerreiro R. The role of TREM2 in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Lancet. Neurol* 2018; 17: 721–730

Catera M, Borelli V, Malagolini N, Chiricolo M, Venturi G, Reis CA, Osorio H, Abruzzo PM, Capri M, Monti D, Ostan R, Franceschi C, Dall'Olio F. Identification of novel plasma glycosylation-associated markers of aging. *Oncotarget* 2016; 7: 7455–7468

Chakravarthy U, Wong TY, Fletcher A, Piau E, Evans C, Zlateva G, Buggage R, Pleil A, Mitchell P. Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol* 2010; 10: 31

Chen G-Y, Tang J, Zheng P, Liu Y. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses. *Science* 2009; 323: 1722–1725

Chiricozzi E, Lunghi G, Di Biase E, Fazzari M, Sonnino S, Mauri L. GM1 Ganglioside Is A Key Factor in Maintaining the Mammalian Neuronal Functions Avoiding Neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 868

Cohen M, Varki A. The sialome--far more than the sum of its parts. *OMICS* 2010; 14: 455–464

Coleman P, Federoff H, Kurlan R. A focus on the synapse for neuroprotection in Alzheimer disease and other dementias. *Neurology* 2004; 63: 1155–1162

Colijn JM, Buitendijk GHS, Prokofyeva E, Alves D, Cachulo ML, Khawaja AP, Cougnard-Gregoire A, Merle BMJ, Korb C, Erke MG, Bron A, Anastasopoulos E, Meester-Smoor MA, Segato T, Piermarocchi S, Jong PTVM de, Vingerling JR, Topouzis F, Creuzot-Garcher C, Bertelsen G, Pfeiffer N, Fletcher AE, Foster PJ, Silva R, Korobelnik J-F, Delcourt C, Klaver CCW. Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Europe: The Past and the Future. *Ophthalmology* 2017; 124: 1753–1763

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

Crook MA, Pickup JC, Lumb PJ, Giorgino F, Webb DJ, Fuller JH. Relationship between plasma sialic acid concentration and microvascular and macrovascular complications in type 1 diabetes: the EURODIAB Complications Study. *Diabetes Care* 2001; 24: 316–322

Eisenbarth GS, Walsh FS, Nirenberg M. Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4913–4917

Ekdahl CT, Claassen J-H, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 13632–13637

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

Figarella-Branger D, Colin C, Baeza-Kallee N, Tchoghandjian A. A2B5 Expression in Central Nervous System and Gliomas. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 4670

Furman D, Chang J, Lartigue L, Bolen CR, Haddad F, Gaudilliere B, Ganio EA, Fragiadakis GK, Spitzer MH, Douchet I, Daburon S, Moreau J-F, Nolan GP, Blanco P, Déchanet-Merville J, Dekker CL, Jojic V, Kuo CJ, Davis MM, Faustin B. Expression of specific inflammasome gene modules stratifies older individuals into two extreme clinical and immunological states. *Nat Med* 2017; 23: 174–184

Godbout JP, Chen J, Abraham J, Richwine AF, Berg BM, Kelley KW, Johnson RW. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. *FASEB J* 2005; 19: 1329–1331

Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Weber A, Rehli M, Peucker A, Müller A, Kastenberger M, Brockhoff G, Andreesen R, Kreutz M. Expression of CD68 in non-myeloid cell types. *Scand J Immunol* 2008; 67: 453–463

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

Grewal RK, Shaikh AR, Gorle S, Kaur M, Videira PA, Cavallo L, Chawla M. Structural Insights in Mammalian Sialyltransferases and Fucosyltransferases: We Have Come a Long Way, but It Is Still a Long Way Down. *Molecules* 2021; 26: 5203

Guo L, Choi S, Bikkannavar P, Cordeiro MF. Microglia: Key Players in Retinal Ageing and Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci* 2022; 16: 804782

Haddad HM. Sialic acids in human eyes. Relationship to lens aging and retinal pathology. *Arch Ophthalmol* 1962; 67: 459–463

Hajjar I, Liu C, Jones DP, Uppal K. Untargeted metabolomics reveal dysregulations in sugar, methionine, and tyrosine pathways in the prodromal state of AD. *Alzheimer's & Dement (Amst)* 2020; 12: e12064

Harboe M, Garred P, Karlstrøm E, Lindstad JK, Stahl GL, Mollnes TE. The down-stream effects of mannan-induced lectin complement pathway activation depend quantitatively on alternative pathway amplification. *Mol Immunol* 2009; 47: 373–380

Heimerl M, Gausepohl T, Mueller JH, Ricke-Hoch M. Neuraminidases-Key Players in the Inflammatory Response after Pathophysiological Cardiac Stress and Potential New Therapeutic Targets in Cardiac Disease. *Biology (Basel)* 2022; 11: 1229

Hildebrandt H, Mühlenhoff M, Oltmann-Norden I, Röckle I, Burkhardt H, Weinhold B, Gerardy-Schahn R. Imbalance of neural cell adhesion molecule and polysialyltransferase alleles causes defective brain connectivity. *Brain* 2009; 132: 2831–2838

Holdbrooks AT, Ankenbauer KE, Hwang J, Bellis SL. Regulation of inflammatory signaling by the ST6Gal-I sialyltransferase. *PloS One* 2020; 15: e0241850

Hopperton KE, Mohammad D, Trépanier MO, Giuliano V, Bazinet RP. Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 2018; 23: 177–198

Hugonnet M, Singh P, Haas Q, Gunten S von. The Distinct Roles of Sialyltransferases in Cancer Biology and Onco-Immunology. *Front Immunol* 2021; 12: 799861

Itakura Y, Sasaki N, Kami D, Gojo S, Umezawa A, Toyoda M. N- and O-glycan cell surface protein modifications associated with cellular senescence and human aging. *Cell Biosci* 2016; 6: 14

Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain research. Mol Brain Res* 1998; 57: 1–9

Jiang Z-H, Peng J, Yang H-L, Fu X-L, Wang J-Z, Liu L, Jiang J-N, Tan Y-F, Ge Z-J. Upregulation and biological function of transmembrane protein 119 in osteosarcoma. *Exp Mol Med* 2017; 49: e329

Johnson LV, Ozaki S, Staples MK, Erickson PA, Anderson DH. A potential role for immune complex pathogenesis in drusen formation. *Exp Eye Res* 2000; 70: 441–449

Johri A, Beal MF. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; 342: 619–630

Julien S, Bobowski M, Steenackers A, Le Bourhis X, Delannoy P. How Do Gangliosides Regulate RTKs Signaling? *Cells* 2013; 2: 751–767

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

Karkas JD, Chargaff E. Studies on the Stability of Simple Derivatives of Sialic Acid. *J Biol Chem* 1964; 239: 949–957

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

Katsuno M, Sahashi K, Iguchi Y, Hashizume A. Preclinical progression of neurodegenerative diseases. *Nagoya J Med Sci* 2018; 80: 289–298

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

Kölliker-Frers R, Udovin L, Otero-Losada M, Kobiec T, Herrera MI, Palacios J, Razzitte G, Capani F. Neuroinflammation: An Integrating Overview of Reactive-Neuroimmune Cell Interactions in Health and Disease. *Mediators Inflamm* 2021; 2021: 9999146

Kumar D, Rizvi SI. Erythrocyte membrane bound and plasma sialic acid during aging. *Biologia* 2013; 68: 762–765

Kumari A, Ayala-Ramirez R, Zenteno JC, Huffman K, Sasik R, Ayyagari R, Borooh S. Single cell RNA sequencing confirms retinal microglia activation associated with early onset retinal degeneration. *Sci Rep* 2022; 12: 15273

Kustermann S, Hildebrandt H, Bolz S, Dengler K, Kohler K. Genesis of rods in the zebrafish retina occurs in a microenvironment provided by polysialic acid-expressing Müller glia. *J Comp Neurol* 2010; 518: 636–646

Lee YB, Nagai A, Kim SU. Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *J Neurosci Res* 2002; 69: 94–103

Levine KS, Leonard HL, Blauwendraat C, Iwaki H, Johnson N, Bandres-Ciga S, Ferrucci L, Faghri F, Singleton AB, Nalls MA. Virus exposure and neurodegenerative disease risk across national biobanks. *Neuron* 2023; 111: 1086-1093.e2

Li Y, Chen X. Sialic acid metabolism and sialyltransferases. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 94: 887–905

Li L, Chen Y, Sluter MN, Hou R, Hao J, Wu Y, Chen G-Y, Yu Y, Jiang J. Ablation of Siglec-E augments brain inflammation and ischemic injury. *J Neuroinflammation* 2022; 19: 191

Liyanage SH, Yan M. Quantification of binding affinity of glyconanomaterials with lectins. *Chem Commun (Camb)* 2020; 56: 13491–13505

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging. *Cell* 2023; 186: 243–278

Lorente-Cebrián S, Decaunes P, Dungner E, Bouloumié A, Arner P, Dahlman I. Allograft inflammatory factor 1 (AIF-1) is a new human adipokine involved in adipose inflammation in obese women. *BMC Endocr Disord* 2013; 13: 54

Lorenz L, Amann B, Hirmer S, Degroote RL, Hauck SM, Deeg CA. NEU1 is more abundant in uveitic retina with concomitant desialylation of retinal cells. *Glycobiology* 2021; 31: 873–883

Lübbbers J, Rodríguez E, van Kooyk Y. Modulation of Immune Tolerance via Siglec-Sialic Acid Interactions. *Front Immunol* 2018; 9: 2807

Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2015

Lynch MA. Exploring Sex-Related Differences in Microglia May Be a Game-Changer in Precision Medicine. *Front Aging Neurosci* 2022; 14: 868448

Macauley MS, Arlian BM, Rillahan CD, Pang P-C, Bortell N, Marcondes MCG, Haslam SM, Dell A, Paulson JC. Systemic blockade of sialylation in mice with a global inhibitor of sialyltransferases. *Journal Biol Chem* 2014; 289: 35149–35158

Madabhushi R, Pan L, Tsai L-H. DNA damage and its links to neurodegeneration. *Neuron* 2014; 83: 266–282

Mapunda JA, Tibar H, Regragui W, Engelhardt B. How Does the Immune System Enter the Brain? *Front Immunol* 2022; 13: 805657

Marini M, Tani A, Manetti M, Sgambati E. Overview of sialylation status in human nervous and skeletal muscle tissues during aging. *Acta histochem* 2021; 123: 151813

Mehanna A, Jakovcevski I, Acar A, Xiao M, Loers G, Rougon G, Irintchev A, Schachner M. Polysialic acid glycomimetic promotes functional recovery and plasticity after spinal cord injury in mice. *Mol Ther* 2010; 18: 34–43

Meri S. Self-nonsel self discrimination by the complement system. *FEBS Lett* 2016; 590: 2418–2434

Miller PD, Styren SD, Lagenaur CF, DeKosky ST. Embryonic neural cell adhesion molecule (N-CAM) is elevated in the denervated rat dentate gyrus. *J Neurosci* 1994; 14: 4217–4225

Mishra A, Kim HJ, Shin AH, Thayer SA. Synapse loss induced by interleukin-1 β requires pre- and post-synaptic mechanisms. *J Neuroimmune Pharmacol* 2012; 7: 571–578

Morrisette-Thomas V, Cohen AA, Fülöp T, Riesco É, Legault V, Li Q, Milot E, Dusseault-Bélanger F, Ferrucci L. Inflamm-aging does not simply reflect increases in pro-inflammatory markers. *Mech Ageing Dev* 2014; 139: 49–57

Müller-Miny L, Thiel K, Meinert S, Hahn T, Kircher T, Nenadić I, Krug A, Hufschmidt F, Liao H, Neumann H, Dannlowski U, Lünemann JD. Association of polysialic acid serum

levels with schizophrenia spectrum and bipolar disorder-related structural brain changes and hospitalization. *Sci Rep* 2023; 13(1): 2085

Muzio L, Viotti A, Martino G. Microglia in Neuroinflammation and Neurodegeneration: From Understanding to Therapy. *Front Neurosci* 2021; 15: 185

Nagae M, Ikeda A, Hane M, Hanashima S, Kitajima K, Sato C, Yamaguchi Y. Crystal structure of anti-polysialic acid antibody single chain Fv fragment complexed with octasialic acid. *J Biol Chem* 2013; 288: 33784–33796

Nairn AV, York WS, Harris K, Hall EM, Pierce JM, Moremen KW. Regulation of glycan structures in animal tissues. *J Biol Chem* 2008; 283: 17298–17313

Norden DM, Godbout JP. Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2013; 39: 19–34

Norden DM, Muccigrosso MM, Godbout JP. Microglial priming and enhanced reactivity to secondary insult in aging, and traumatic CNS injury, and neurodegenerative disease. *Neuropharmacology* 2015; 96: 29–41

Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem* 2004; 88: 844–856

Olaru OG, Constantin GI, Pena CM. Variation of total serum sialic acid concentration in postmenopausal women. *Exp Ther Med* 2020; 20: 2455–2459

Ousman SS, Kubes P. Immune surveillance in the central nervous system. *Nat Neurosci* 2012; 15: 1096–1101

Palmigiano A, Barone R, Sturiale L, Sanfilippo C, Bua RO, Romeo DA, Messina A, Capuana ML, Maci T, Le Pira F, Zappia M, Garozzo D. CSF N-glycoproteomics for early diagnosis in Alzheimer's disease. *J Proteomics* 2016; 131: 29–37

Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 2011; 333: 1456–1458

Perry VH, Holmes C. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 2014; 10: 217–224

Perry VH, Newman TA, Cunningham C. The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 103–112

Piras F, Schiff M, Chiapponi C, Bossù P, Mühlenhoff M, Caltagirone C, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H, Spalletta G. Brain structure, cognition and negative symptoms in schizophrenia are associated with serum levels of polysialic acid-modified NCAM. *Transl Psychiatry* 2015; 5: 658

Pulimamidi VK, Murugesan V, Rajappa M, Satheesh S, Harichandrakumar KT. Increased levels of markers of oxidative stress and inflammation in patients with rheumatic mitral stenosis predispose to left atrial thrombus formation. *J Clin Diagn Res* 2013; 7: 2445–2448

Rashid K, Akhtar-Schaefer I, Langmann T. Microglia in Retinal Degeneration. *Front Immunol* 2019; 10: 1975

Rathod SR, Khan F, Kolte AP, Gupta M. Estimation of salivary and serum total sialic Acid levels in periodontal health and disease. *J Clin Diagn Res* 2014; 8: ZC19-21

Rawal P, Zhao L. Sialometabolism in Brain Health and Alzheimer's Disease. *Front Neurosci* 2021; 15: 648617

Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010; 11: 785–797

Rosenstock P, Bork K, Massa C, Selke P, Seliger B, Horstkorte R. Sialylation of Human Natural Killer (NK) Cells is Regulated by IL-2. *J Clin Med* 2020; 9: 1816

Rózanowska M, Pawlak A, Rózanowski B, Skumatz C, Zareba M, Boulton ME, Burke JM, Sarna T, Simon JD. Age-related changes in the photoreactivity of retinal lipofuscin granules. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 1052–1060

Safaiyan S, Kannaiyan N, Snaidero N, Brioschi S, Biber K, Yona S, Edinger AL, Jung S, Rossner MJ, Simons M. Age-related myelin degradation burdens the clearance function of microglia during aging. *Nat Neurosci* 2016; 19: 995–998

Sarbu M, Dehelean L, Munteanu CVA, Vukelić Ž, Zamfir AD. Assessment of ganglioside age-related and topographic specificity in human brain by Orbitrap mass spectrometry. *Anal Biochem* 2017; 521: 40–54

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

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

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

Sato C, Kitajima K. Polysialylation and disease. *Mol Aspects Med* 2021; 79: 100892

Sawaguchi A, Idate Y, Ide S, Kawano Ji, Nagaike R, Oinuma T, Suganuma T. Multistratified expression of polysialic acid and its relationship to VACHT-containing neurons in the inner plexiform layer of adult rat retina. *J Histochem Cytochem* 1999; 47: 919–928

Schmid RS, Maness PF. L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth. *Curr Opin Neurobiol* 2008; 18: 245–250

Schneider JS. Altered expression of genes involved in ganglioside biosynthesis in substantia nigra neurons in Parkinson's disease. *PloS one* 2018; 13: e0199189

Schuitmaker A, van der Doef TF, Boellaard R, van der Flier WM, Yaqub M, Windhorst AD, Barkhof F, Jonker C, Kloet RW, Lammertsma AA, Scheltens P, van Berckel BNM. Microglial activation in healthy aging. *Neurobiol Aging* 2012; 33: 1067–1072

Schultz H, Song Y, Baumann BH, Kapphahn RJ, Montezuma SR, Ferrington DA, Dunaief JL. Increased serum proteins in non-exudative AMD retinas. *Exp Eye Res* 2019; 186: 107686

Seddon JM. Macular Degeneration Epidemiology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017; 58: 6513–6528

Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014; 25: 453–472

Shaftel SS, Griffin WST, O'Banion MK. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *J Neuroinflammation* 2008; 5: 7

Shahraz A, Kopatz J, Mathy R, Kappler J, Winter D, Kapoor S, Schütza V, Scheper T, Gieselmann 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

Sipione S, Monyror J, Galleguillos D, Steinberg N, Kadam V. Gangliosides in the Brain: Physiology, Pathophysiology and Therapeutic Applications. *Front Neurosci* 2020; 14: 572965

Soreq L, Rose J, Soreq E, Hardy J, Trabzuni D, Cookson MR, Smith C, Ryten M, Patani R, Ule J. Major Shifts in Glial Regional Identity Are a Transcriptional Hallmark of Human Brain Aging. *Cell Rep* 2017; 18: 557–570

Soya S, Şahar U, Yıkılmaz M, Karaçalı S. Determination of sialic acids in the nervous system of silkworm (*Bombyx mori* L.). *Arch biol sci (Beogr)* 2017; 69: 369–378

Sprenger N, Julita M, Donnicola D, Jann A. Sialic acid feeding aged rats rejuvenates stimulated salivation and colon enteric neuron chemotypes. *Glycobiology* 2009; 19: 1492–1502

Sreekumar PG, Reddy ST, Hinton DR, Kannan R. Mechanisms of RPE senescence and potential role of α B crystallin peptide as a senolytic agent in experimental AMD. *Exp Eye Res* 2022; 215: 108918

Sulzbach de Oliveira HS, Biolchi V, Richardt Medeiros HR, Bizerra Gandor Jantsch DBG, Knabben de Oliveira Becker Delving LK, Reckziegel R, Goettert MI, Brum IS, Pozzobon A. Effect of *Helicobacter pylori* on NFKB1, p38 α and TNF- α mRNA expression levels in human gastric mucosa. *Exp Ther Med* 2016; 11: 2365–2372

Suzuki K, Wu D, Kitajima K, Yamakawa N, Omoto T, Hane M, Sato C. Development of a permethylation-based detection method for oligo/polysialic acid structures via tandem MALDI-TOF mass spectrometry. *BBA Adv* 2025; 7:100155

Svennerholm L, Boström K, Jungbjer B, Olsson L. Membrane lipids of adult human brain: lipid composition of frontal and temporal lobe in subjects of age 20 to 100 years. *J Neurochem* 1994; 63: 1802–1811

Tajik A, Phillips KL, Nitz M, Willis LM. A new ELISA assay demonstrates sex differences in the concentration of serum polysialic acid. *Anal Biochem* 2020; 600: 113743

Tarau I-S, Berlin A, Curcio CA, Ach T. The Cytoskeleton of the Retinal Pigment Epithelium: from Normal Aging to Age-Related Macular Degeneration. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 3578

Thiesler H, Beimdiek J, Hildebrandt H. Polysialic acid and Siglec-E orchestrate negative feedback regulation of microglia activation. *Cell Mol Life Sci* 2021; 78: 1637–1653

Thiesler H, Küçükerden M, Gretenkort L, Röckle I, Hildebrandt H. News and Views on Polysialic Acid: From Tumor Progression and Brain Development to Psychiatric

Disorders, Neurodegeneration, Myelin Repair and Immunomodulation. *Front Cell Dev Biol* 2022; 10: 871757

Trotta MC, Gharbia S, Herman H, Mladin B, Hermenean A, Balta C, Cotoraci C, Peteu VE, Gesualdo C, Petrillo F, Galdiero M, Alfano R, Gherghiceanu M, D'Amico M, Rossi S, Hermenean A. Sex and Age-Related Differences in Neuroinflammation and Apoptosis in Balb/c Mice Retina Involve Resolvin D1. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 6280

Vankriekelsvenne E, Chrzanowski U, Manzhula K, Greiner T, Wree A, Hawlitschka A, Llovera G, Zhan J, Joost S, Schmitz C, Ponsaerts P, Amor S, Nutma E, Kipp M, Kaddatz H. Transmembrane protein 119 is neither a specific nor a reliable marker for microglia. *Glia* 2022; 70: 1170–1190

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

Varki A. *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2009

Villanueva-Cabello TM, Gutiérrez-Valenzuela LD, Salinas-Marín R, López-Guerrero DV, Martínez-Duncker I. Polysialic Acid in the Immune System. *Front Immunol* 2022; 12: 823637

Walker DG, Lue L-F. Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alz Res Therapy* 2015; 7: 56

Walker KA, Gottesman RF, Wu A, Knopman DS, Gross AL, Mosley TH, Selvin E, Windham BG. Systemic inflammation during midlife and cognitive change over 20 years. *Neurology* 2019; 92: e1256-e1267

Walker KA, Hoogeveen RC, Folsom AR, Ballantyne CM, Knopman DS, Windham BG, Jack CR, Gottesman RF. Midlife systemic inflammatory markers are associated with late-life brain volume: The ARIC study. *Neurology* 2017; 89: 2262–2270

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

Warwick CA, Keyes AL, Woodruff TM, Usachev YM. The complement cascade in the regulation of neuroinflammation, nociceptive sensitization, and pain. *J Biol Chem* 2021; 297: 101085

Werneburg S, Fuchs HLS, Albers I, Burkhardt H, Gudi V, Skripuletz T, Stangel M, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. Polysialylation at Early Stages of Oligodendrocyte Differentiation Promotes Myelin Repair. *J Neurosci* 2017; 37: 8131–8141

Wong JHC, Ma JYW, Jobling AI, Brandli A, Greferath U, Fletcher EL, Vessey KA. Exploring the pathogenesis of age-related macular degeneration: A review of the interplay between retinal pigment epithelium dysfunction and the innate immune system. *Front Neurosci* 2022; 16: 1009599

Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng C-Y, Wong TY. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040. *Lancet. Glob Health* 2014; 2: e106-16

Wooff Y, Man SM, Aggio-Bruce R, Natoli R, Fernando N. IL-1 Family Members Mediate Cell Death, Inflammation and Angiogenesis in Retinal Degenerative Diseases. *Front Immunol* 2019; 10: 1618

Yi W, Lu Y, Zhong S, Zhang M, Le Sun, Dong H, Wang M, Wei M, Xie H, Qu H, Peng R, Hong J, Yao Z, Tong Y, Wang W, Ma Q, Liu Z, Ma Y, Li S, Yin C, Liu J, Ma C, Wang X, Wu Q, Xue T. A single-cell transcriptome atlas of the aging human and macaque retina. *Natl Sci Rev* 2020; 8: nwa179

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

Zhu W, Chen X, Yuan L, Wu J, Yao J. Degradation Kinetics and Shelf Life of N-acetylneuraminic Acid at Different pH Values. *Molecules* 2020; 25: 5141

Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci* 2006; 9: 268–275

10. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Rekonstruktive Neurobiologie unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Harald Neumann durchgeführt. Die Entwicklung und Konzeption des Forschungsvorhabens erfolgte zusammen mit Herrn Prof. Dr. Harald Neumann. Die Bereitstellung der humanen Retinaprobe und deren Vorbereitung für die Analysen erfolgten in Köln durch die Mitglieder der Arbeitsgruppe von Herrn Univ.-Prof. Dr. Thomas Langmann vom Lehrstuhl für Experimentelle Immunologie des Auges an der Universitätsklinik Köln. Alle im folgenden Text genannten Personen waren Mitglieder der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Neumann am Institut für Rekonstruktive Neurobiologie des Universitätsklinikums Bonn.

Nach einer Einarbeitung zu den Verfahren und der Bedienung von Geräten durch Rita Jietou, Dr. Anahita Shahrzad und Dr. Bettina Linnartz-Gerlach erfolgte die Planung und Durchführung der einzelnen Versuche eigenständig. Dazu gehörte auch die genaue Beobachtung der Versuchsbedingungen und die Erfassung und Dokumentation aller relevanten Daten. Polysialinsäureproben und die Sequenzen einiger verwendeter Primer wurden von Dr. Jonas Winkler und Dr. Jannis Wißfeld bezogen. Die für die Experimente zur Methodenetablierung verwandten Mäuseorgane wurden von Dr. Anahita Shahrzad, Dr. Jannis Wißfeld und Dr. Christine Klaus zur Verfügung gestellt. Ein initiales Musterprotokoll für einen Sandwich-ELISA wurde aus dem Handbuch „ELISA technical guide and protocols“ der Firma Thermo Fisher Scientific bezogen. Die Aminoff-Methode zur Bestimmung der Gesamtsialinsäurekonzentration war bereits laborintern als Standardmethode etabliert, weshalb nur noch ein Protokoll für die Vorbereitung von Gewebeprobe der Retina für die Analyse mittels Aminoff-Methode erarbeitet wurde. Ergänzende Versuche zur Testung des Polymerisierungsgrads der von dem Sandwich-ELISA detektierten Polysialinsäuren wurden von Vibha Anantha Simha durchgeführt. Die Analyse der Daten und die statistischen Auswertungen erfolgten eigenständig mit der unter Material und Methoden genannten Software. Die Abbildungen wurden bis auf die Abbildung der Polysialinsäuren, welche aus einer Publikation stammt, selbst mit Hilfe von LibreOffice, Inkscape und ImageJ erstellt. Die Interpretation und Diskussion der Ergebnisse erfolgte selbstständig, ebenso wie die umfassende Recherche und Auswertung relevanter Literatur. Dies schloss die Analyse aktueller Studien und

Veröffentlichungen zu methodischen Ansätze ein, die in die Entwicklung eigener Experimente und die Interpretation der Ergebnisse eingeflossen sind. Während des gesamten Projektes hatte ich wertvolle Unterstützung durch meinen Doktorvater und die Mitarbeiter des Instituts, die mir bei spezifischen Fragestellungen und technischen Herausforderungen zur Seite standen. Jedoch sind alle experimentellen Arbeiten und deren Auswertung ausschließlich von mir durchgeführt worden. Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

11. Veröffentlichungen

Müller-Miny L, Thiel K, Meinert S, Hahn T, Kircher T, Nenadić I, Krug A, Hufschmidt F, Liao H, Neumann H, Dannlowski U, Lünemann JD. Association of polysialic acid serum levels with schizophrenia spectrum and bipolar disorder-related structural brain changes and hospitalization. *Sci Rep* 2023; 13(1): 2085, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29242-3>

12. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Harald Neumann für die Überlassung des spannenden Themas und viele konstruktive Diskussionen. Mein Dank gilt auch Herrn Univ.-Prof. Dr. Thomas Langmann von der Universität Köln für die zur Verfügung gestellten humane Retinaprobe.

Bei Dr. Anahita Shahraz möchte möchte ich mich für die vielen guten Ratschläge bei der Entwicklung des ELISA bedanken.

Dr. Jonas Winkler und Dr. Jannis Wißfeld danke ich für die Bereitstellung von Sialinsäuren und Primern für die durchgeführten Experimente und die wertvollen Hinweise zu ihrer Durchführung.

Außerdem möchte ich allen Mitgliedern der AG Neumann danken, die ich kennengelernt habe: Bettina, Christine, Huan, Vibha, Philippe, Tamara, Sharon, Rita, Tawfik, Negin, Omar, Katlynn, Özkan, Akihito, Melissa, German und Joshua. Danke für die gute kollegiale Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsumfeld. Ich habe viel von Euch gelernt.