

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Leiterin: Prof. Dr. Marianne Jochum

**Genexpression von $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferasen,
Präsentation fucosylierter Zelloberflächen-Glykane
und Bindung an E-Selektin durch diverse
Magenkarzinom-Zelllinien**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der biologischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Andreas Koch
aus Germering

2004

1. Berichterstatter
2. Berichterstatter
3. Berichterstatter (Sondervotum)

Prof. Dr. Wolf Gutensohn
PD Dr. Hans Weiher
Prof. Dr. Marianne Jochum

Tag der mündlichen Prüfung

15. April 2004

I	Einleitung	1
1	Selektine	2
1.1	Expression und Struktur der Selektine	2
1.2	Physiologische Bedeutung der Selektine	4
2	Liganden der Selektine: Glykokonjugate auf der Zelloberfläche	6
2.1	Einteilung der Selektin-Liganden	7
2.2	Aufbau Selektin-bindender Trägermoleküle	10
3	Glykosyltransferasen: Modifikatoren der Tumorzelladhäsion	11
3.1	Zelltypspezifische Modifikation von Poly-N-Acetylglucosaminen	11
3.2	Poly-N-Acetylglucosamin-Modifikationen in Tumorzellen: Einfluß auf Tumorprogression, Metastasierung und Prognose	12
3.3	α 1,3-Fucosyltransferasen als Schlüsselenzyme der Biosynthese von Zelladhäsions-Epitopen	13
II	Aufgabenstellung	17
III	Material und Methoden	19
1	Geräte	19
1.1	Geräte für molekularbiologische Arbeiten	19
1.2	Geräte für zellbiologische Arbeiten	19
2	Materialien	20
2.1	Materialien für molekularbiologische und mikrobiologische Arbeiten	20
2.1.1	Chemikalien	20

2.1.2	Reaktionskits	21
2.1.3	Enzyme	21
2.1.4	Plasmid-Vektoren	22
2.1.5	Primer	23
2.1.6	<i>E. coli</i> -Stamm und Medien zur Kultivierung	26
2.2	Materialien für zellbiologische Arbeiten	27
2.2.1	Chemikalien	27
2.2.2	Reaktionskits	27
2.2.3	Enzyme	27
2.2.4	Antikörper	28
2.2.5	Zelllinien und Medien zur Kultivierung	29
3	Methoden	31
3.1	Mikrobiologische Methoden	31
3.1.1	Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i>	31
3.1.2	Transformation von <i>E. coli</i>	31
3.2	Molekularbiologische Methoden	32
3.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	32
3.2.2	Isolierung von genomischer DNA aus Zelllinien	32
3.2.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllinien	32
3.2.4	Ethanol-fällung von Nukleinsäuren	33
3.2.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
3.2.6	Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen	34
3.2.7	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	34
3.2.8	Restriktion und Modifikation von DNA	34
3.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-DNA-Ligase	35
3.2.10	Ligation von PCR-Produkten in Klonierungs-Vektoren des TOPO™ TA-Cloning®-Systems	35

3.2.11	DNA-Sequenzanalyse	35
3.2.12	PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten	36
3.2.13	Reinigung von PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten	37
3.2.14	cDNA-Synthese (Reverse Transkription)	37
3.2.15	Qualitative RT-PCR	38
3.2.16	RT-PCR-Klonierung der <i>fucT6</i> und <i>fucT7</i> -Gene	40
3.2.17	Semiquantitative, kompetitive RT-PCR	41
3.3	Zellbiologische Methoden	46
3.3.1	Kultivierung und Lagerung der Zelllinien	46
3.3.2	Transfektion von CHO-K1-Zellen	48
3.3.3	Oberflächenanalyse von Zelllinien mit Hilfe eines Flow-Zytometers	48
3.3.4	Enzymatische Modifikation von Zelloberflächen mit Neuraminidase	49
3.3.5	Enzymatische Markierung von Zelllinien	49
3.3.6	Zelladhäsions-Experimente	49
IV	Ergebnisse	52
1	Etablierung einer kompetitiven RT-PCR zur semiquantitativen Analyse des Expressionsniveaus diverser Fucosyltransferase-Gene	52
1.1	Validierung der Primerspezifität	52
1.2	Synthese der heterologen DNA-Kompetitoren	53
1.3	Validierung des Äquivalenzbereiches der synthetisierten DNA-Kompetitoren	54
1.4	Validierung der Amplifikationsdynamik des semiquantitativen RT-PCR-Meßsystems	57
1.5	Validierung der Konzentrationsabhängigkeit der kompetitiven RT-PCR	58

2	Nachweis der Genexpression von $\alpha(1,3)$-Fucosyltransferasen in Magenkarzinom-Zelllinien	60
2.1	Qualitativer Nachweis der mRNA-Expression der $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferase-Gene <i>fucT3</i> und <i>fucT5</i>	60
2.2	Semiquantitativer Nachweis der mRNA-Expression der $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase-Gene <i>fucT4</i> , <i>fucT6</i> und <i>fucT7</i> im Vergleich zum Haushaltsgen <i>pgk1</i>	61
3	Einfluss der Fucosyltransferasen auf die E-Selektin vermittelte Zelladhäsion	62
3.1	Flowzytometrische Charakterisierung fucosylierter Zelloberflächen-Glykane	62
3.2	Zelladhäsion an E-Selektin	67
3.3	Zelladhäsionsblockade durch spezifische Antikörper fucosylierter Zelloberflächen-Glykane	68
3.4	Einfluss der Desialisierung von Zelloberflächen-Glykanen auf die Zelladhäsion an E-Selektin	69
4	Charakterisierung von <i>fucT6</i> und <i>fucT7</i>-exprimierenden CHO-Zellklonen	71
4.1	Etablierung von Fucosyltransferase-Gene exprimierenden CHO-Zellklonen	71
4.2	<i>fucT6</i> und <i>fucT7</i> gesteuerte Expression fucosylierter Glykane auf der Zelloberfläche von CHO-Zellen	73
4.3	Modifikation von Zelloberflächen-Glykanen der stabilen Zellklone CHO-F6 und CHO-F7 durch Desialisierung	75
4.4	Einfluß der Gene <i>fucT6</i> und <i>fucT7</i> auf die Präsentation funktioneller E-Selektin-Liganden von CHO-Zellen	77
4.5	Zelladhäsionsblockade durch spezifische Antikörper fucosylierter Zelloberflächen-Glykane	79

V	Diskussion	80
1	Nachweis der fucT-Genexpression in Magenkarzinom-Zelllinien	81
2	Adhäsion von Magenkarzinom-Zelllinien an E-Selektin in Korrelation zur Präsentation von fucosylierten Zelloberflächen-Glykanen	82
3	Vergleichende Betrachtung von fucT-Genexpression, Präsentation fucosylierter Zelloberflächen-Glykane und Zelladhäsion an E-Selektin	84
4	Fazit und Ausblick	87
VI	Zusammenfassung	89
VII	Literaturverzeichnis	90
VIII	Danksagung	
IX	Lebenslauf	

I Einleitung

Die Zelloberfläche aller bekannten Säugetierzellarten ist mit komplex aufgebauten Kohlenhydrat-Molekülen besetzt, die als Oligosaccharide oder Glykokonjugate bezeichnet werden. Diese Zuckerstrukturen zeigen ein außerordentlich variables Expressionsspektrum, das seinerseits vom jeweiligen Zelltyp, dem entsprechenden Gewebe oder aber von der Entwicklungsstufe der betreffenden Zelle bzw. des Gewebes abhängt. Seit bekannt ist, dass sich die Expression von Glykokonjugaten auf der Zelloberfläche von Säugetierzellen mit der Entwicklung der Zellen nachhaltig verändert, wird spekuliert, dass diese glykosilierten Oberflächen-Antigene eine wichtige Rolle bei der Informationsübermittlung an der Zytoplasmamembran spielen könnten. Daraus ließe sich weiter folgern, dass sich im Verlauf der Evolution komplexe Regulationsmechanismen entwickelt haben, welche diese Prozesse spezifisch regulieren können [Lowe, J., 1994].

Bereits seit Anfang der 90iger Jahre deuten Untersuchungen an Selektinen, einer speziellen Untergruppe der Säugetier-Lektine, darauf hin, dass diese Adhäsionsmoleküle zusammen mit spezifischen Zelloberflächen-Oligosacchariden an Prozessen beteiligt sind, mit deren Hilfe mobile Zellen (z.B. Leukozyten; metastasierende Tumorzellen) an definierten Regionen des Endothels adhäreren können, um dort das Blutgefäß zu verlassen (Extravasation) [Waltz, G. *et al.*, 1990]. Mit der Bezeichnung „Selektin“ soll die Vermittlung *selektiver* Zellwanderung durch *Lektin*-Domänen verdeutlicht werden.

Zum besseren Verständnis der bisher aufgeklärten Mechanismen werden nun in den folgenden Abschnitten wesentliche Aspekte der **Selektine** und ihrer **Liganden** sowie der **Enzyme (Glykosyltransferasen)** beschrieben, die für das Bindungsmodell der Selektin-vermittelten Zelladhäsion verantwortlich sind.

1. Selektine

1.1 Expression und Struktur der Selektine

Bis heute sind drei Selektin-Typen bekannt, die in einem funktionellen Zusammenhang stehen. Für diese drei Selektine wurde eine Nomenklatur eingeführt, die sich an dem Zelltyp orientiert, auf dem das entsprechende Molekül ursprünglich entdeckt wurde: E-Selektin (Endothelzellen), P-Selektin (Plättchen=Thrombozyten) und L-Selektin (Lymphozyten). In Tabelle 1 sind Nomenklatur und Expressionscharakteristiken der Selektine zusammengefasst.

Tabelle 1: Nomenklatur und Expression von Selektinen

[Bevilacqua *et al.*, 1993; Whelan, J., 1996]

Name	Zelltyp	Oberflächenexpression
L-Selektin (CD62L) mLHR, Leu 8, TQ-1, gp90 ^{MEL} , Lam-LECAM-1, LECAM-1	Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, NK-Zellen	<ul style="list-style-type: none"> • konstitutive Oberflächenexpression • Abspaltung wenige Minuten nach der Zell-Aktivierung („shedding“)
P-Selektin (CD62P) PADGEM, GMP-140	Thrombozyten, aktiviertes Endothel	<ul style="list-style-type: none"> • nach Induktion durch Thrombin, Histamin oder C5_α innerhalb von 10 Minuten [konstitutiv exprimiertes P-Selektin in den Weibel-Palade Körpern (Endothelzellen) sowie in sekretorischen α-Granula (Thrombozyten)] ⇒ Internalisierung kurz nach der Oberflächen-Präsentation • nach Induktion durch Zytokine (TNF, IL-1β) innerhalb von vier Stunden (<i>de novo</i> RNA- und Proteinsynthese) ⇒ „shedding“
E-Selektin (CD62E) ELAM-1	aktiviertes Endothel	<ul style="list-style-type: none"> • nach Induktion durch TNFα, IL-1β oder LPS innerhalb von vier Stunden (<i>de novo</i> RNA- und Proteinsynthese) ⇒ „shedding“ über 24 – 48h und Abfall der Expression auf das Basalniveau

Wie aus Abb. 1 hervorgeht, sind Selektin-Typen strukturell sehr ähnlich aufgebaut und bestehen aus den funktionellen Domänen CRD (*carbohydrate recognition domain*), EGF (*epidermal growth factor*) und CR (*consensus repeats*).

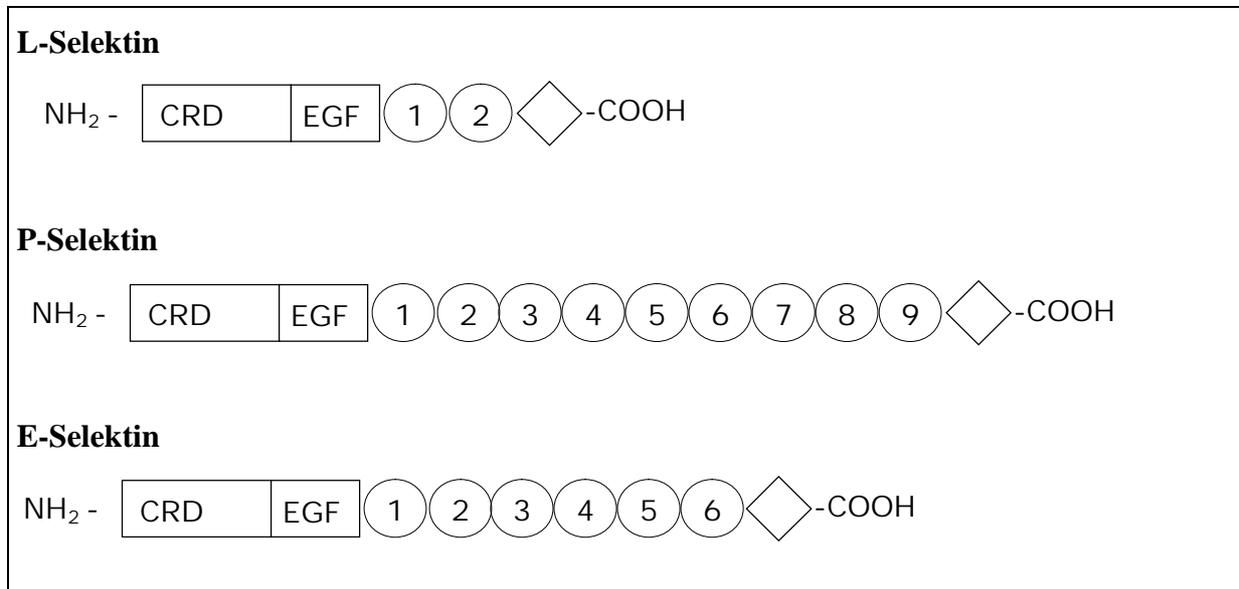


Abbildung 1: Struktureller Aufbau der humanen Selektine

Die N-terminale, extrazelluläre CRD-Domäne (*carbohydrate recognition domain*) zeigt Homologie zu den Ca²⁺-abhängigen C-Typ-Lektinen von Säugetierzellen. Direkt im Anschluss befindet sich eine EGF-ähnliche Domäne (*epidermal growth factor*) auf die eine vom jeweiligen Selektin-Typ abhängige Anzahl von CR-Domänen (*consensus repeats*) folgt. Diese *consensus repeats* zeigen Homologie zu den Komplement-bindenden Proteinen („*C3b-C4b regulatory protein*“ *repeats*). Am C-Terminus befindet sich eine Transmembran-Sequenz (als Raute dargestellt) die in einen kurzen zytoplasmatischen C-Terminus übergeht. [modifiziert nach Bevilacqua *et al.*, 1993]

Auch die genomische Organisation der Selektine weist strukturelle Homologien auf. Jede extrazelluläre funktionelle Domäne wird von *einem* distinkten Exon, der zytoplasmatische C-Terminus wird von *zwei* Exons codiert. *In situ*-Hybridisierungsstudien zeigten, dass die Selektin-Gene auf dem Chromosom 1 zwischen den Banden 1q22 und 1q25 lokalisiert sind. In direkter Nachbarschaft dazu (1q32) befinden sich auch andere Proteine, die mehrere CR-Domänen beinhalten [Tedder *et al.*, 1989; Collins *et al.*, 1991].

Affinität und Spezifität von Zell-Zell-Interaktionen, die über Selektine hergestellt werden, beruhen auf Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen, die durch die CRD-Domäne vermittelt werden. Liganden, die als Bindungspartner für einen Selektin-Rezeptor fungieren sollen, müssen daher einen Polysaccharidanteil besitzen, der eine Bindung an die CRD-Domäne ermöglicht.

L-Selektin vermittelte Zell-Zell-Interaktionen werden zusätzlich durch Protein-Protein-Wechselwirkungen spezifiziert, die über eine Bindung an die EGF-Domäne des L-Selektins zustande kommt. Bei E- und P-Selektin trägt ebenfalls die EGF-Domäne zu einer Erhöhung der Bindungsspezifität des jeweiligen Liganden bei [McEver *et al.*, 1995].

1.2 Physiologische Bedeutung der Selektine

Selektine steuern im Verlauf von entzündlichen Prozessen die initiale Interaktion von diversen Abwehrzellen des Immunsystems (PMN-Zellen, Monozyten, Lymphozyten) mit aktiviertem Endothel. Selektine werden entweder konstitutiv präsentiert (L-Selektin) oder aber als Reaktion auf einen spezifischen Induktor (TNF α ; IL-1; Thrombin; Histamin) konzentriert an die Zelloberfläche gebracht (E-Selektin; P-Selektin) [Suzuki *et al.*, 1991; Bevilacqua *et al.*, 1993]. Von zentraler Bedeutung ist dabei der zeitliche Ablauf der Expression, der in einer streng regulierten Abfolge vonstatten gehen muss. Eine pathologische Präsentation von Selektinen auf der Zelloberfläche führt in vielen Fällen zur Ausbildung von Krankheitsbildern, wie etwa Rheumatische Arthritis oder Asthma, die auf fehlgesteuerten, entzündlichen Prozessen beruhen [Whelan, J., 1996].

Eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Abwehr invadierter Mikroorganismen durch das Immunsystem ist die Möglichkeit, zunächst nicht-aktivierte Entzündungszellen (z.B. Leukozyten) gezielt an einen Infektionsherd zu leiten. Die fokussierte Rekrutierung von Entzündungszellen an definierte Bereiche des Endothels erfordert ein komplexes Zusammenspiel von löslichen Mediatoren (z.B. Thrombin, Histamin, Zytokine) und regulierbaren Zelloberflächen-Molekülen, wie sie die Selektine darstellen. Um das angrenzende Endothel vor einem unspezifischen Angriff durch sezernierte Entzündungsmediatoren (Proteinasen, Sauerstoffradikale etc.) zu schützen, muss die Aktivierung der Immunzellen innerhalb eng definierter Bereiche stattfinden [Whelan, J., 1996]. Lokal exprimierte Selektine initiieren dabei das Abbremsen der frei zirkulierenden, nicht-aktivierten Entzündungszellen durch lockere Zell-Zell-Interaktionen mit den entzündungsbedingt aktivierten Endothelzellen - ein Prozess, der als *rolling* bezeichnet wird - und ermöglichen hierdurch die Aktivierung der Immunzellen. In der Folge kommt es nach Induktion von β_2 -Integrinen auf Entzündungszellen (LFA-1, MAC-1) und deren Liganden (ICAM-1/2/3) auf Endothelzellen zu einer Verstärkung der Zell-Zell-Interaktion und damit zu einer festen Bindung (*firm adhesion*) der Entzündungszellen an das

lokal „entzündete“ Endothel. Diese Bindung ist die Voraussetzung für die chemotaxingesteuerte Migration der Zellen durch das Endothel (Extravasation) in das angrenzende Gewebe zum Infektionsherd [Rosen *et al.*, 1994].

Das beschriebene „Multistep-Modell“ ist schematisch in der Abb. 2 zusammengefasst.

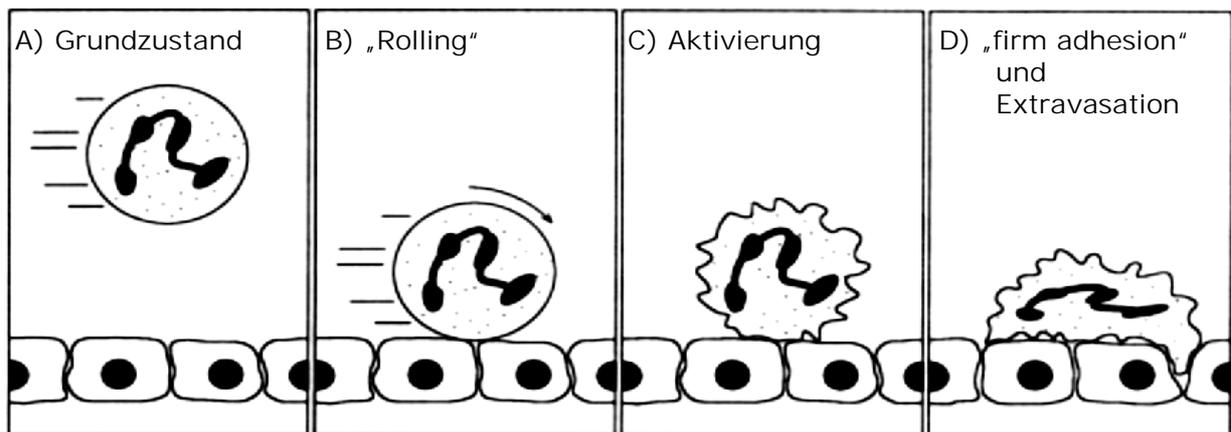


Abbildung 2: Multistep-Modell der Selektin-abhängigen Leukozyten-Adhäsion

- A) Im Grundzustand befinden sich Leukozyten hauptsächlich in dem schnell fließenden, zentralen Bereich des vaskulären Blutstroms ohne signifikante adhäsive Wechselwirkungen mit dem nicht entzündeten Endothel einzugehen.
- B) Nach Einwirkung von proinflammatorischen Mediatoren werden E- und P-Selektin auf entzündeten Endothelzellen exprimiert, die die Leukozyten aus dem Blutstrom stark abbremsen und deren „rolling“ ermöglichen.
- C) Lösliche (z.B. IL-8) und membranassoziierte Mediatoren (PAF) des Endothels aktivieren die Leukozyten und induzieren deren β_2 -Integrin-Expression.
- D) Die aktivierten Leukozyten werden durch Integrin-Ligand-Interaktionen auf dem Endothel arretiert und beginnen mit der Migration (Extravasation) in das subendotheliale Gewebe. [modifiziert nach Lowe, J., 1994]

Die eminente pathophysiologische Bedeutung der Selektine im Prozeß der Infektabwehr wurde *in vivo* durch eine Reihe von Experimenten bestätigt. So war in Selektin-defizienten transgenen Mäusen das „rolling“ und die anschließende Extravasation der Leukozyten am Entzündungsort nachhaltig beeinträchtigt [Whelan, J., 1996]. Eine vergleichbare Inhibierung konnte auch durch blockierende Antikörper gegen das E- und P-Selektin erreicht werden [Mulligan *et al.*, 1993].

2 Liganden der Selektine:

Glykokonjugate auf der Zelloberfläche

Glykokonjugate stellen die Hauptkomponente auf der Zelloberfläche höherer Organismen dar und sind sehr oft charakteristisch für den jeweiligen Zelltyp. Im Verlauf der Zelldifferenzierung kommt es zu nachhaltigen Veränderungen des Glykokonjugat-Zelloberflächenprofils, wobei spezifische Muster definierten Differenzierungsphasen der Zellen zugeordnet werden können. Die exprimierten Oberflächenantigene können somit auch als Differenzierungsantigene fungieren, die mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern detektierbar sind. In ausdifferenzierten Zellen oder Geweben ist die Expression unterschiedlicher Glykokonjugat-Phänotypen möglicherweise auf bestimmte Zelltypen beschränkt, so dass es zu einer vom Zelltyp abhängigen Präsentation von Glykanen auf der Zelloberfläche kommt. Abweichungen von den definierten Oberflächen-Expressionsprofilen gehen dabei nicht selten mit pathologischen Veränderungen einschließlich maligner Transformationen der Zellen einher [Rhodes, J. M. 1996; Fukuda, M., 1994; Ronin, C., 1998; Beum, P. V., 1999].

Es wird allgemein angenommen, dass zelltypspezifische Glykokonjugate eine wichtige Rolle bei Zell-Zell-Interaktionen spielen, wo sie beispielsweise als Liganden diverser Adhäsionsmoleküle bei der Bindung von Immunzellen an entzündetes Endothel benötigt werden. Möglicherweise sorgt dabei die zelltypabhängige Heterogenität an Glykokonjugaten für spezifische und differenzierbare Signale, die von den entsprechenden Bindungspartnern - die sich i.d.R. auf anderen Zellen befinden - detektiert und weitergeleitet werden können. Ändert sich die antigene Struktur der glykosilierten Zelloberfläche z.B. im Rahmen der Zelldifferenzierung, können neue Zell-Zell-Interaktionen stattfinden, d.h. eine Zelle kann in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungsstadium mit jeweils unterschiedlichen Zellen interagieren. Analog dazu können Veränderungen der Glykokonjugat-Struktur auf der Zelloberfläche, die aus malignen Transformationen resultieren, ebenfalls neuartige Zell-Zell-Interaktionen nach sich ziehen. In malignem Gewebe spiegelt die Glykosilierung der Zelloberflächen dabei oft einen fetalen oder undifferenzierten Zustand wider [Feizi, T. 1985; Fukuda, M., 1992; Dabelsteen, E., 1996; Ito *et al.*, 1997].

2.1 Einteilung der Selektin-Liganden

Wie in Abschnitt 1 beschrieben, beinhalten Selektine strukturelle CRD-Domänen, die Homologie zu den C-Typ Lektinen zeigen (siehe Abb. 1). Die Liganden der Selektine müssen daher einen Oligosaccharid-Anteil aufweisen (Glykoproteine; Proteoglykane; Glykolipide).

Die bisher identifizierten Glykane als Liganden der Selektine lassen sich grob in drei Gruppen einteilen. Diese Einteilung beruht auf der Präsenz funktioneller Epitope, die für eine erfolgreiche Selektin-Bindung essentiell sind.

Tabelle 2: Einteilung der Selektin-Liganden

Ligand (Trägermoleküle und Epitope)	Bindungs- partner	Referenz
<ul style="list-style-type: none"> Glykane, die sialylierte, fucosylierte Glucosamine vom sialyl Lewis X (sLe^x)- oder sialyl Lewis A (sLe^a)-Typ als terminale Gruppe tragen 	E-, P-, L-Selektin	Berg <i>et al.</i> , (1992) Lowe, J. (1994) Whelan, J. (1996)
<ul style="list-style-type: none"> Glykane mit sulfatierten Tyrosin- und/oder Fucose-Resten, teilweise mit sialylierten und fucosylierten Glucosaminen Fucoidan (sulfatiertes Polymer mit hohem Anteil an $\alpha(1,2)$ und $\alpha(1,3)$ verzweigten Fucoseresten) Heparin Sulfatide (Galactosylceramide mit sulfatiertem C3) 	P-, L-Selektin	Mian <i>et al.</i> , (1973) Skinner <i>et al.</i> , (1989) Aruffo <i>et al.</i> , (1991) Imai <i>et al.</i> , (1993)
<ul style="list-style-type: none"> Glykane mit einem hohen Anteil an Mannose-6-Phosphat 	L-Selektin	San Blas <i>et al.</i> , (1974) Stoolman <i>et al.</i> , (1984)

In den letzten Jahren wurden einige der spezifischen Trägermoleküle identifiziert, die mit den in der Tabelle 2 aufgeführten Epitopen besetzt sind und *in toto* als Selektin-Liganden bezeichnet werden können [Whelan, J. 1996; Renkonen *et al.*, 1997].

- **ESL-1:** E-Selektin Ligand-1 wurde auf der Zelloberfläche von Maus-Leukozyten identifiziert und ist dort vermutlich der Hauptligand für E-Selektin. Funktionstüchtiges ESL-1 trägt eine sLe^x-Gruppe [Steggmaier *et al.*, 1995].
- **PSGL-1:** P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 wurde als dimeres Glykoprotein auf der Zelloberfläche humaner Leukozyten beschrieben. PSGL-1 trägt eine sLe^x-Gruppe und muss an diskreten Tyrosinresten sulfatiert vorliegen. PSGL-1 ist in der Lage an P- und L-Selektin zu binden [Guyer *et al.*, 1996].
- **GlyCAM-1:** Glycosilation-dependent Cell Adhesion Molecule 1 wurde als ein kleines Glykoprotein vom Mucin-Typ auf der Oberfläche von HEV-Endothelzellen (*high endothelial venules*) in Lymphknoten der Maus gefunden. Es ermöglicht dort die Bindung von L-Selektin und damit das sogenannte „*homing*“ der Lymphozyten. GlyCAM-1 trägt sialylierte, fucosylierte und sulfatierte Glucosamine vom sLe^x-Typ. Die Bindung an L-Selektin scheint aber in der Hauptsache von der korrekten Sulfatierung abzuhängen [Imai *et al.*, 1993; Rosen *et al.*, 1996].
- **CD34:** Dieses Glykoprotein vom Mucin-Typ wird von den meisten humanen Endothelzellen exprimiert, die Bindung an L-Selektin findet aber nur in den HEV-Endothelzellen der Lymphknoten statt. CD34 trägt sialylierte, fucosylierte und sulfatierte Glucosamine [Baumhueter *et al.*, 1994; Hiraoka *et al.*, 1999].
- **MAdCAM-1:** Mucosal-Vascular-Addressin Cell-Adhesion Molecule-1 wurde sowohl in den Peyer´s-Patches als auch in HEV-Endothelzellen detektiert und fungiert dort als Ligand für L-Selektin sowie für α₄β₇-Integrine. MAdCAM-1 trägt sialylierte, fucosylierte und sulfatierte Glucosamine [Butcher *et al.*, 1996].
- **L-Selektin:** Nach neueren Untersuchungen ist L-Selektin selbst in der Lage an P- und E-Selektin zu binden. Das L-Selektin wird zu diesem Zweck mit großen Mengen von sialylierten, fucosylierten Glucosaminen vom sLe^x-Typ modifiziert [Picker *et al.*, 1991; Whelan, J., 1996].

Zusammenfassend können folgende Aussagen über die identifizierten Selektin-Liganden gemacht werden:

- Die Trägermoleküle selbst sind nicht die Selektin-bindenden Elemente sondern präsentieren diese auf der Zelloberfläche [Varki, A., 1997; Ramos et al., 1998].
- Als Trägermoleküle kommen sowohl Glykoproteine als auch Glykolipide in Frage [Fukuda *et al.*, 1985; Symington *et al.*, 1985; Lowe, J., 1994].
- E-Selektin bindet an sialylierte, fucosylierte Glucosamine vom sLe^x-Typ, die unabhängig von Sulfatierungen sind [Wagers et al., 1997].
- Liganden von P- und L-Selektin müssen in sulfatierter Form vorliegen um als Adhäsionspartner fungieren zu können. Beide Selektine benötigen sialylierte, fucosylierte Glucosamine vom sLe^x-Typ als Bindungsgruppen [Toppila *et al.*, 1997; Renkonen *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1998].
- Sialylierte, fucosylierte Glucosamine vom sLe^x-Typ (NeuNAcα2→3Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNAc→R) und sLe^a-Typ (NeuNAcα2→3Galβ1→3(Fucα1→4)GlcNAc→R) sind die wichtigsten funktionellen Gruppen bei der Synthese funktionsfähiger Selektin-Liganden *in vivo* [Brandley *et al.*, 1993; Lowe *et al.*, 1994; Wittig *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 1997; Wagers *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1998; Petretti *et al.*, 1999].
- Alle bisher bekannten Selektin-Liganden sind von einer korrekten Glykosilierung abhängig. Fehlt diese ganz oder ist die Glykosilierung mangelhaft (z.B. keine Sulfatierung) hat das den Verlust der Selektin-Bindungsfähigkeit zur Folge. So stellen z. B. nur 20% des PSGL-1 von Leukozyten funktionsfähige P-Selektin-Liganden dar. Der Großteil ist dagegen fehlerhaft glykosiliert und damit nicht in der Lage an P-Selektin zu binden [Laszik *et al.*, 1996].
- Viele untersuchte Selektin-Liganden zeigen nur *in vitro* Selektin-Bindung; *in vivo* ist diese entweder inkorrekt (siehe oben) oder aber ein physiologisches Zusammentreffen von Selektin und Ligand kommt erst gar nicht zustande [Varki, A., 1997].

2.2 Aufbau Selektin-bindender Trägermoleküle

Glykane, die für die Selektin-Bindung von Bedeutung sind, werden anhand des Trägermoleküls in Glykolipide bzw. Glykoproteine eingeteilt [Lowe, J., 1994].

Selektin-bindende **Glykolipide** gehören zur Untergruppe der Sphingolipide und lassen sich in die Hauptklassen (a) Cerebroside, (b) Sulfatide, (c) Globoside sowie (d) Ganglioside differenzieren. Obwohl *in vitro* bereits diverse Selektin-bindende Glykolipide identifiziert wurden [Hakomori, S.-I., 1985; Symington *et al.*, 1985; Lowe, J., 1994], ist bislang nur für die Sulfatide eine Selektin-bindende Funktion *in vivo* gezeigt worden [Aruffo *et al.*, 1991; Todderud *et al.*, 1992].

Selektin-bindende **Glykoproteine** können aufgrund ihrer glykosidischen Verknüpfung an das entsprechende Polypeptid wie folgt unterschieden werden [Voet *et al.*, 1992]:

- N-Glykane sind durch eine β -N-glycosidische Bindung an einen Asparagin-Rest mit der Polypeptid-Kette verbunden und lassen sich in drei Primärstrukturen einteilen (mannose-reicher Typ; komplexer Typ; Hybrid-Typ). Alle drei Primärstrukturen besitzen den Tri-mannosylcore $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6(\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc} \rightarrow \text{Asn}$.

ESL-1 ist der bisher einzig beschriebene Selektin-Ligand der hauptsächlich N-glykosidisch gebundene Zuckerketten trägt [Vestweber, D., 1996].

- O-Glykane sind α -O-glykosidisch an Serin- oder Threoninreste einer Polypeptid-Kette gebunden. In tierischen Zellen kommen sie in drei Hauptgruppen vor, die sich durch den Zucker unterscheiden, der über Serin oder Threonin mit dem Polypeptid α -O-glykosidisch verknüpft ist: (1) mucinartiger Typ (N-Acetylgalactosamin α -O-glykosidisch an Serin oder Threonin gebunden), (2) O-GlcNAc-Typ (N-Acetylglucosamin) und (3) Xylose-Typ (Xylose).

PSGL-1, GlyCAM-1, CD34 und MAdCAM-1 werden zu den Sialomucinen gerechnet, die durch O-glykosidisch gebundene Zuckerreste und eine terminale Sialinsäure charakterisiert sind [Varki, A., 1997].

3 Glykosyltransferasen: Modifikatoren der Tumorzelladhäsion

3.1 Zelltypspezifische Modifikation von Poly-*N*-Acetylglucosaminen

Sowohl *N*- bzw. *O*-Glykane als auch Sphingolipide enthalten häufig **Poly-*N*-Acetylglucosamin**-Seitenketten, die sich durch eine Wiederholung (ca. 5-15 x) von *N*-Acetylglucosamin-Einheiten auszeichnen. Diese Poly-*N*-Acetylglucosamin-Glykane wurden zuerst auf humanen Erythrozyten beschrieben, wo sie die Mehrheit der ABO-Blutgruppenantigene darstellen [Watkins, W. M., 1980; Fukuda, M., 1994].

Poly-*N*-Acetylglucosamine werden in den Golgi-Apparaten humaner Zellen durch spezifische **Glykosyltransferasen** modifiziert und erhalten dadurch unterschiedliche Funktionalität. Die Regulation dieser Prozesse hängt dabei ausschließlich von der Expression der modifizierenden Glycosyltransferasen in den jeweiligen Zellen ab. Daraus lassen sich zwei wichtige Schlussfolgerungen ziehen:

1. Die Oberflächenexpression von Poly-*N*-Acetylglucosamin-Glykanen ist für den jeweiligen Zelltyp spezifisch.
2. Das Expressionsprofil an Glycosyltransferasen bestimmt, welches Epitop und damit welche Funktionalität auf der Zelloberfläche zur Expression kommt.

Poly-*N*-Acetylglucosamin-Seitenketten sind somit also wichtige Modifikationsstellen für die Zelltyp- oder Zelldifferenzierungs- abhängige Veränderung von Glykanen und haben dadurch maßgeblichen Einfluss auf die Expression funktioneller Oberflächenantigene, wie zum Beispiel denen der Selektin-Liganden [Fukuda, M., 1994; Lowe, J., 1994; Dabelsteen, E., 1996; Varki, A., 1997; Ramos *et al.*, 1998].

Auf Grund der zelltypspezifischen Modifikation von Poly-*N*-Acetylglucosaminen wurde schon früh spekuliert, dass die Selektin-abhängige Adhäsion von Leukozyten an entzündetes Endothel von der Expression beteiligter modifizierender Glykosyltransferasen abhängen könnte [Fukuda, M., 1994; Renkonen *et al.*, 1997; Wagers *et al.*, 1996; Wagers *et al.*, 1997; Beum *et al.*, 1999; Petretti *et al.*, 1999].

Eine 1990 von John Lowe *et al.* durchgeführte Untersuchung zeigte erstmals den funktionellen Zusammenhang zwischen der Expression einer spezifischen Glycosyltransferase und der daraus resultierenden Fähigkeit der Zellen, an ein Selektin zu binden. CHO-Zellen, die *per se* nicht in der Lage sind, *in vitro* an Selektine zu adhären, exprimierten nach Transformation mit der α 1,3-Fucosyltransferase(3) funktionelle sLe^x-Gruppen auf der Zelloberfläche und konnten daraufhin mit E-Selektin exprimierenden vaskulären Endothelzellen interagieren. Die Expression einer einzigen Glykosyltransferase war also ausreichend, um den funktionellen Phänotyp der Zellen zu verändern [Lowe, J. *et al.*, 1990; Phillips *et al.*, 1990].

3.2 Poly-N-Acetylglucosamin-Modifikationen in Tumorzellen: Einfluß auf Tumorprogression, Metastasierung und Prognose

Untersuchungen der Zelloberflächen-Glykane *in vitro* an immortalisierten Tumorzellen und deren Ursprungszellen deuten darauf hin, dass maligne Transformationen oft von ausgeprägten Modifikationen der Glykanstruktur auf der Zelloberfläche begleitet sind. Transformierte Tumorzellen überexprimieren dabei regelmäßig Poly-N-Acetylglucosamin-haltige Glykane, die ihrerseits einen stark erhöhten Sialisierungs- und Fucosylierungsgrad aufweisen [Fukuda *et al.* 1994; Dabelsteen, E., 1996; Ronin, C., 1998].

1987 zeigten Dennis *et al.*, dass eine Erhöhung von Poly-N-Acetylglucosamine-haltigen Glykanen auf der Zelloberfläche mit dem Metastasierungspotential von Tumorzellen assoziiert ist. Je stärker die Tumorzellen hochverzweigte Poly-N-Acetylglucosamine exprimierten, um so höher war das beobachtete Metastasierungspotential [Dennis *et al.*, 1987]. Erhärtet wurden diese Befunde durch Experimente, bei denen die Metastasierung von Tumorzellen *in vivo* durch die gleichzeitige Applikation von Glykosilierungs-Inhibitoren nachhaltig reduziert werden konnte [Dennis, J. W., 1986; Humphries *et al.*, 1986].

Detaillierte Untersuchungen der Adhäsions- und Invasions-Prozesse metastasierender Tumorzellen deckten Parallelen zu den im Abschnitt 1.2 beschriebenen Reaktionen von Entzündungszellen bei ihrer Wanderung aus der Zirkulation an den Entzündungsort auf. So konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass Tumorzellen im Verlauf hämatogener Metastasierung an E- und P-Selektin adhären, abgebremst werden und die Blutbahn am Adhäsionsort verlassen können (Extravasation) [Majuri *et al.*, 1992; Araki *et al.*, 1997; Nakamori *et al.*, 1997;

Matsura *et al.*, 1998]. Die Selektin-Bindung der beschriebenen Tumorzellen war dabei von der Oberflächen-Expression sialylierter, fucosylierter Glucosamine (sLe^x und sLe^a) abhängig [Klopocki *et al.*, 1998; Weston *et al.*, 1999-B; Hiller *et al.*, 2000]. Einige dieser sialylierten und fucosylierten Glykane (sLe^x, Le^x, sLe^a, Le^a) wurden deshalb als tumorassoziierte Glykane, kurz TACA (*tumor associated carbohydrate antigens*) bezeichnet [Dabelsteen, E., 1996; Ronin, C., 1998].

Klinische Studien an Krebs-Patienten zeigten in der Folge ein erhöhtes Risiko hämatogener Metastasierung des Primärtumors, wenn dieser im Vergleich zu nicht transformiertem Gewebe die Tumormarker sLe^x und/oder sLe^a überexprimierte. Monoklonale Antikörper gegen die beiden Epitope wurden aus diesem Grund bereits erfolgreich für die Krebs-Diagnose eingesetzt [Jorgensen *et al.*, 1995;].

Ohne an dieser Stelle weiter ins Detail zu gehen, läßt sich zusammenfassend feststellen, dass bei Primärtumoren unterschiedlichen Ursprungs Veränderungen in der Expression der Zelloberflächen-Glykane sLe^x und/oder sLe^a mit der Tumorprogression, dem Metastasierungspotential sowie der Prognose für den Krankheitsverlauf korrelieren können [Nakasaki *et al.*, 1989; Jorgensen *et al.*, 1995; Bresalier *et al.*, 1996; Dabelsteen, E., 1996; Ito *et al.*, 1997; Renkonen *et al.*, 1997; Togayachi *et al.*, 1999; Hiller *et al.*, 2000].

3.3 α 1,3-Fucosyltransferasen als Schlüsselenzyme der Biosynthese von Zelladhäsions-Epitopen

Wie Lowe *et al.* 1990 erstmals belegten und nachfolgend auch andere Arbeitsgruppen zeigten, wird die Synthese sialylierter und fucosylierter Selektin-Liganden von spezialisierten Glycosyltransferasen reguliert, die als α (1,3)-Fucosyltransferasen bezeichnet werden [Lowe *et al.*, 1990; Beum *et al.*, 1999; Petretti *et al.*, 1999; Weston *et al.*, 1999-A].

Bislang wurden die Gene von fünf strukturell unterschiedlichen $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferasen charakterisiert [Chandrasekaran *et al.*, 1996; Wittig *et al.*, 1996; Lowe, J., 1997].

- **$\alpha(1,3/1,4)$ Fucosyltransferase(3):** (FUT3; FucT3; humane Blutgruppen-Fucosyltransferase; „Lewis Typ“-Fucosyltransferase). FUT3 wurde aus einer epidermalen Tumorzelllinie (A431) isoliert und ist die einzige $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase, die auch $\alpha(1,4)$ -glykosidische Fucosylierungen durchführen kann. FUT3 verstößt damit gegen die „*one-linkage-one-enzyme*“ Regel der Glykobiologie [Schachter, H., 1994]. FUT3 ist in der Lage sLe^x, Le^x, sLe^a, Le^a-Epitope zu synthetisieren [Kukowska-Latallo *et al.*, 1990].
- **$\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase(4):** (FUT4; FucT4; ELFT=ELAM-1 ligand fucosyltransferase; „Myeloid Typ“-Fucosyltransferase). FUT4 wurde aus der leukämischen Zelllinie HL-60 isoliert. FUT4 kann ausschließlich Le^x-Epitope produzieren [Lowe *et al.* 1991].
- **$\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase(5):** (FUT5; FucT5;). FUT5 wurde in einer humanen λ FIX-Phagen-Genbank mit Hilfe der FUT3-cDNA als Sonde identifiziert. FUT5 ist für die Synthese der Epitope Le^x und sLe^x auf Zelloberflächen-Glykanen verantwortlich [Weston *et al.*, 1992].
- **$\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase(6):** (FUT6; FucT6; „Plasma Typ“-Fucosyltransferase). FUT6 wurde aus HL-60 isoliert und kann sLe^x, Le^x-Epitope herstellen [Koszdin and Bowen, 1992].
- **$\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase(7):** (FUT7; FucT7). FUT7 wurde aus Leukozyten isoliert und exprimiert exklusiv sLe^x-Epitope auf der Zelloberfläche. In Leukozyten ist hauptsächlich FUT7 für die Expression funktioneller E-Selektin-Liganden zuständig [Sasaki *et al.*, 1994].

Aufgrund von *in situ* - Hybridisierungsstudien können die fünf humanen $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase-Gene drei distinkten Genloci zugeordnet werden. FUT4 ist in Position 11q21 lokalisiert; das Gencluster FUT3-FUT5-FUT6 befindet sich auf 19p13.3, FUT7 auf 9q34.3 [Reguigne-Arnould *et al.*, 1996].

Im Biosyntheseweg fucosylierter Glucosamine vom sialyl Lewis^x-, Lewis^x-, sialyl Lewis^a- und Lewis^a-Typ, der schematisch in Abb. 3 wiedergegeben ist, stellt die terminale $\alpha(1,3)$ -Fucosylierung einen Schlüsselschritt dar. $\alpha(2,3)$ -Sialotransferasen können $\alpha(1,3)$ -fucosylierte Kohlenhydrate nicht als Substrat akzeptieren, weshalb die $\alpha(2,3)$ -glykosidische Sialysierung vor der $\alpha(1,3)$ -glykosidischen Fucosylierung erfolgen muss [Fukuda, M., 1994; Lowe, J., 1994; Beum *et al.*, 1999; Petretti *et al.*, 1999; Weston *et al.*, 1999-B].

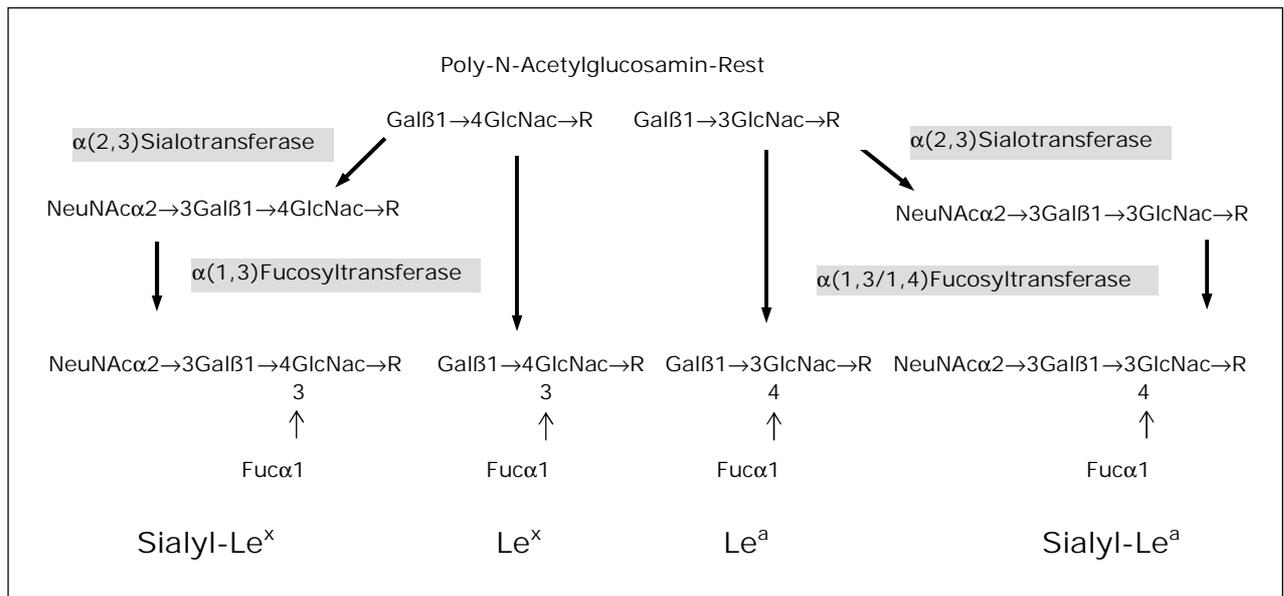


Abbildung 3: Struktur und Biosynthese sialylierter, fucosylierter Glucosamine

Das fucosylierte Tetrasaccharid, sialyl Lewis X (sLe^x; sCD15) sowie dessen Stereoisomer sialyl Lewis A (sLe^a) entstehen durch die sequenzielle Aktion spezifischer Glykosyltransferasen auf Poly-N-Acetylglucosamin-besetzten Liganden. Auf einen Sialysierungs-Schritt (katalysiert durch $\alpha 2,3$ -Sialotransferase) an der terminalen Galactose folgt eine interne $\alpha 1,3$ -glykosidische Fucosylierung an einem N-Acetylglucosamin-Rest (katalysiert durch $\alpha 1,3$ -Fucosyltransferasen). Die Synthese nicht sialylierter Epitope (Le^x und Le^a) erfolgt durch direkte Fucosylierung der N-Acetylglucosamin-Einheiten. (R) entspricht dem Poly-N-Acetylglucosamin-Rest.

[modifiziert nach Fukuda, M., 1994]

Die Expression von $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferasen sollte damit entscheidenden Einfluss auf die Präsentation von fucosylierten Glucosaminen auf der Zelloberfläche tumorigener Zellen haben [Petretti *et al.*, 2000]. Neuere Untersuchungen erhärten diese Vermutung:

- Die Antisense-vermittelte Verminderung (*Down-Regulation*) der mRNA, die für die $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase(3) codiert, führte zu einer kompletten Absenz von sialyl Le^x und sialyl Le^a auf der Zelloberfläche einer Colon-Karzinom-Zelllinie (CX-1). In der Folge verloren die Zellen die Fähigkeit an E-Selektin zu binden [Klopocki *et al.*, 1998]. Dieser Zusammenhang wurde in der Adenokarzinom-Zelllinie HT-29LMM bestätigt [Weston *et al.*, 1999-B].
- 1999 zeigten Weston *et al.*, dass die Adhäsion leukämischer HL-60-Zellen an E-Selektin entzündeter Endothelzellen direkt von der Expression der $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferase(7) abhängt [Weston *et al.*, 1999-A]. Analog dazu demonstrierten Hiraiwa *et al.*, dass eine Antisense-vermittelte *Down-Regulation* der FUT7-mRNA in der leukämischen Zelllinie ED40515 den Verlust der E-Selektin vermittelten Adhäsion zur Folge hat [Hiraiwa *et al.*, 1996].

Bis heute ist weitgehend unklar, welche Veränderungen in der Expression der fünf $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferasen bzw. welche Kombination der Fucosyltransferasen für die Expression funktioneller Selektin-Liganden in Tumorzellen verantwortlich gemacht werden können. Auch die Regulation der Fucosyltransferasen *in vivo* ist bislang nur unzureichend geklärt [Maehara *et al.*, 1993; Lowe, J. 1994; Wagers *et al.*, 1997].

Die Analyse der Expressionsprofile aller fünf bekannten Fucosyltransferase-Gene sowie die weiterer Glycosyltransferase-Gene (z. B. von $\alpha(2,3)$ -Sialotransferasen) ist deshalb Gegenstand intensiver Untersuchungen und könnte in Zukunft zur Prognose für Tumorerkrankungen herangezogen werden [Lowe, J., 1994; Wittig *et al.*, 1996; Petretti *et al.*, 1999; Weston *et al.*, 1999-B; Petretti *et al.*, 2000].

II Aufgabenstellung

Die erstmals auf der Zelloberfläche von Entzündungszellen beschriebenen sLe^x-Epitope (Glykane) dienen primär als Liganden der auf vaskulären Endothelzellen exprimierten E- und P-Selektine und tragen somit wesentlich zur Wanderung mobiler Abwehrzellen aus der Zirkulation in einen gewebeständigen Entzündungsherd bei. John Lowe *et al.* zeigten bereits 1990, dass die Synthese fucosylierter Zelloberflächen-Epitope von einer Gruppe von Glycosyltransferasen gesteuert wird, die als $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferasen bezeichnet werden. In einer Vielzahl von Folgearbeiten konnte die Rolle der mittlerweile fünf identifizierten Fucosyltransferasen (FucT 3-7) als „Schlüsselenzyme“ bei der Biosynthese fucosylierter Zelloberflächenepitope bestätigt werden [Petretti *et al.*, 2000].

Neben ihrer Beteiligung am Entzündungsgeschehen wird angenommen, dass die Zelloberflächen-assoziierten Glykane auch entscheidend das Metastasierungsverhalten diverser Tumorzellen modulieren können [Sasaki *et al.*, 1994]. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass die transkriptionelle Überexpression von spezifischen Glycosyltransferase-Genen in Zellen eines Primärtumors Aussagen über ein erhöhtes Metastasierungspotenzial sowie über die Prognose der betroffenen Patienten ermöglichen könnte [Ito *et al.*, 1997; Petretti *et al.*, 1999]. Die Analyse der Expressionsprofile aller fünf bekannten Fucosyltransferase-Gene ist deshalb Gegenstand intensiver Untersuchungen und soll zukünftig zur Prognose für Tumorerkrankungen herangezogen werden [Petretti *et al.*, 1999; Weston *et al.*, 1999-B; Petretti *et al.*, 2000].

In diesem Kontext ergaben sich für die vorliegende Promotionsarbeit folgende Aufgabenstellungen:

- Zum Nachweis der Expression der fünf Fucosyltransferase-Gene (*fucT* 3-7) in diversen Zelllinien sollten zunächst semiquantitative RT-PCR-Assays entwickelt werden.
- Mit Hilfe dieser neu etablierten semiquantitativen RT-PCR-Messungen sollte dann in acht Magenkarzinom-Zelllinien das mRNA-Expressionsprofil relevanter $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase-Gene in Abhängigkeit vom bekannten Metastasierungspotenzial der Zellen evaluiert werden.
- Die so erstellten semiquantitativen mRNA-Profile der Fucosyltransferase-Gene sollten anschließend mit der Expression von fucosylierten Zelloberflächen-Epitopen auf den unterschiedlichen Magenkarzinom-Zelllinien verglichen werden, um weiteren Aufschluss über die Beteiligung der detektierten *fucTs* an der Präsentation fucosylierter Epitope zu erhalten.
- Um die *fucT*-Profile mit dem funktionellen Phänotyp der Zellen (Bindung an E-Selektin) korrelieren zu können, sollte ein "*low-shear-stress*" *in vitro*-Zelladhäsionssystem etabliert werden, mit dem die E-Selektin abhängige Zelladhäsion quantifiziert werden kann.
- Vergleichend dazu sollte der Einfluss der beiden in der Literatur bereits als adhäsionsrelevant beschriebenen Fucosyltransferasen FucT6 und FucT7 auf das Zelloberflächenprofil sowie die E-Selektin-Bindung von dafür spezifisch transfizierten CHO-K1-Zellen analysiert werden, um speziell die Beteiligung dieser beiden Gene am E-Selektin vermittelten Adhäsionsverhalten von CHO-F6 und CHO-F7 zu validieren.

III Material und Methoden

1 Geräte

1.1 Geräte für molekularbiologische Arbeiten

- DNA-Sequenziergerät Typ A373 und A377
(Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt)
- Gel-Dokumentations-System (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Thermocycler MiniCycler PTC 150 (Fa. MJ Research, Inc., USA)
- Gel-Elektrophoresekammern MiniSubCellGT und WideMiniSubCellGT
(Fa. BioRad, München)
- Zentrifuge Biofuge pico (Fa. Heraeus, München)
- Kühlzentrifuge Centrikon H-401 mit Rotor A8.24
(Fa. Kontron Instruments, Eching)
- Photometer Uvikon 860 (Fa. Kontron Instruments, Eching)

1.2 Geräte für zellbiologische Arbeiten

- Durchflußzytometer EPICS XL-MCL SystemII Software Version 3.0
(Fa. Coulter Corporation, USA)
- Inkubationsschüttler GFL 3005 mit Wärmehaube Unihood 550
(Fa. UniEquip, Martinsried)
- Fluoreszenzmikroskop Typ IX50 und IX70
(Fa. Olympus Mikro-Optik, München)
- Mikroskop Olympus CK 2 (Fa. Olympus Mikro-Optik, München)
- Zellkulturbrutschrank Function Line (Fa. Heraeus, München)
- Zentrifuge Megafuge 1.0R mit Rotor Nr. 3360 (Fa. Heraeus, München)
- Neubauer-Zählkammer (Fa. Wagner & Munz, München)
- ELISA-Reader MR5000 (Fa. Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath)
- ELISA-Reader Software „MikroWin“ Version 3.0
(Fa. Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath)

2 Materialien

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien waren - falls im Text nicht anders vermerkt - von analytischer Reinheit. Deionisiertes Wasser sowie Reinstwasser wurden mit Hilfe des SG Reinstwasser-Systems „Clear“ (Fa. SG, Barsbüttel) hergestellt.

2.1 Materialien für molekularbiologische und mikrobiologische Arbeiten

2.1.1. Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Fa. SIGMA, Deisenhofen
Agar Select	Fa. SIGMA, Deisenhofen
Ampicillin (20mg/ml) in H ₂ O _{deion}	Fa. SIGMA, Deisenhofen
ATP	Fa. Boehringer, Mannheim
Borsäure	Fa. Merck, Darmstadt
DNA-Marker (1kbp-Leiter)	Fa. Promega, Mannheim
DNA-Marker (100bp-Leiter)	Fa. Promega, Mannheim
DNA-Marker XIII (50bp-Leiter)	Fa. Boehringer, Mannheim
EDTA	Fa. Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Fa. SIGMA, Deisenhofen
Gel-Beladungslösung	Fa. SIGMA, Deisenhofen
Glykogen-Lösung (1mg/ml)	Fa. Boehringer, Mannheim
Kanamycin (10mg/ml) in H ₂ O _{deion}	Fa. SIGMA, Deisenhofen
Molecular Biology Certified Agarose	Fa. BioRad, München
PCR Nukleotide Mix	Fa. Boehringer, Mannheim
Tris/HCl	Fa. Boehringer, Mannheim

2.1.2 Reaktionskits

EndoFree Plasmid Maxi Kit	Fa. QIAGEN, Hilden
Eukaryotic TOPO™ TA Cloning® Kit	Fa. Invitrogen, California, USA
First-Strand cDNA Synthesis Kit	Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Perkin-Elmer Sequencing Kit	Fa. Perkin Elmer Applied Biosystems, UK
QIAprep Spin Miniprep Kit	Fa. QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraktions Kit	Fa. QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR-Reinigungs Kit	Fa. QIAGEN, Hilden
RNeasy Mini Kit	Fa. QIAGEN, Hilden
TOPO™ TA Cloning® Kit, pCR®II-TOPO-Vector	Fa. Invitrogen, California, USA

2.1.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
DNase I	Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Expand High Fidelity® PCR System	Fa. Boehringer Mannheim
Pwo-DNA-Polymerase	Fa. Boehringer, Mannheim
Restriktionsenzyme BamHI; EcoRI; HindIII; MspI; XbaI; XhoI; SmaI; KpnI; NotI; ApaI; AluI	Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Restriktionsenzyme SspI; NaeI; PvuII; Tru9; MaeIII; Hsp92II; SacI; AocI	Fa. Boehringer, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Fa. USB, Cleveland, USA
Taq DNA Polymerase	Fa. Boehringer, Mannheim

2.1.4 Plasmid-Vektoren

Vektorbezeichnung	relevanter Genotyp bzw. Selektionsmarker	Herkunft
pcDNA3.1(-)	Amp ^R ; Neo ^R	Fa. Invitrogen
pBluescript II KS (+)	Amp ^R	Fa. Stratagene
pCR®II-TOPO	Amp ^R ; Kan ^R	Fa. Invitrogen
pCR®II-TOPO- <i>fucT6</i>	pCR®II-TOPO mit einem 1,2 kbp cDNA-Fragment, welches das humane <i>fucT6</i> -Gen beinhaltet	Eigenproduktion
pCR®II-TOPO- <i>fucT7</i>	pCR®II-TOPO mit einem 1,1 kbp cDNA-Fragment, welches das humane <i>fucT7</i> -Gen beinhaltet	Eigenproduktion
pIRESneo(+)-MCS ¹	Amp ^R ; Neo ^R pIRESneo(+)-MCS ist ein eukaryotischer Expressionsvektor	Dr. A. Faussner
pIRESneo-F6	pIRESneo mit einem 1,2 kbp-cDNA-Fragment, welches das humane <i>fucT6</i> -Gen beinhaltet	Eigenproduktion
pIRESneo-F7	pIRESneo mit einem 1,1 kbp-cDNA-Fragment, welches das humane <i>fucT7</i> -Gen beinhaltet	Eigenproduktion

Die allgemeinen Vektorkarten der aufgeführten Vektoren sind im Anhang beigelegt.

¹ Dieser Vektor ist eine modifizierte Variante des Vektors pIRESneo (Fa. Clontech Laboratories), der freundlicherweise von Herrn Dr. Alexander Faussner (Abteilung für Klinische Biochemie, LMU München) zur Verfügung gestellt wurde. Der modifizierte Vektor enthält im Vergleich zu dem Ausgangsvektor zusätzliche Restriktions-Schnittstellen in seiner MCS.

2.1.5 Primer

Die spezifischen DNA-Primer wurden mit Hilfe von Genbankanalysen basierend auf den DNA-Sequenzinformationen des *National Center for Biotechnology Information* ausgewählt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/index.html>, veröffentlicht in den Genbanken des NCBI). Dabei wurde darauf geachtet, dass die jeweiligen Primer-Paare ausschließlich mit der gewünschten DNA-Zielsequenz hybridisieren können.

Die fünf analysierten Fucosyltransferase-Gene sowie die Glucosyltransferase Core-2 zeigen auf genomischer Ebene eine „single-exon“-Struktur [Renguine-Arnould *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1998]. Aus diesem Grund konnten die spezifischen Primererkennungs-Sequenzen nicht auf zwei distinkte Exons verteilt werden (kein Einschluss einer Intron-Exon-Grenze). Die spezifischen Erkennungssequenzen der *pgk1*-Primer (PGKs, PGKas) wurden ebenfalls innerhalb eines Exons gewählt.

Alle PCR-Primer wurden bei der Firma MWG-Biotech, Ebersberg synthetisiert. Für jedes Oligonukleotid wurde eine Stammlösung hergestellt (100pmol/µl in sterilem H₂O_{deion}) und bei -30°C gelagert.

Sequenzierprimer	
Uni	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
Reverse	5'-AAC AGT TAT GAC CAT G-3'
pIRES Forward	5'-GAG CTC GGA TCG ATA TCT GC-3'

Primer für die qualitative RT-PCR	
<i>fucT3</i>	
3s	5'-CTC CCG ACA GGA CAC CAC TCC CAC-3'
3as	5'-AGG TGG GAG GCG TGA CTT AGG G-3'
<i>fucT4</i>	
4s	5'-CGG TGC CCG AAA TTG GGC TCC TGC-3'
4as	5'-CAG AAG GAG GTG ATG TGG ACA GCG-3'
<i>fucT5</i>	
5s	5'-TGG ATC ACA CTA GCT ACT CTG ACC-3'
5as	5'-CTG GAG TCG GCA GTG ATG TTG-3'
<i>fucT6</i>	
6s	5'-GCA GGA GAT TGT CAT CAA TGA CCC-3'
6as	5'-GTG CCA GGC ACC ATC TCT GAG C-3'
<i>fucT7</i>	
7s	5'-CCC ACC GTG GCC CAG TAC CGC TTC T-3'
7as	5'-CTG ACC TCT GTG CCC AGC CTC CCG T-3'
Core-2	
C2s	5'-GAA ATG CTG AGG ACG TTG CTG CG-3'
C2as	5'-ATA GTC GTC AGG TGT CCA CCG AG-3'
<i>pgk1</i>	
PGKs	5'-ATG ATT ATT GGT GGT GGA ATG GCT-3'
PGKas	5'-TCA TCC ATG AGA GCT TTG GTT CC-3'

Primer für die kompetitive RT-PCR	
Kompetitor <i>fucT3</i>	
Komp 3s	5'-CTC CCG ACA FFA CAC CAC TCC CAC-3'
Komp 3as	5'-AGG TGG GAG GCG TGA CTT AGG G-3'
Kompetitor <i>fucT4</i>	
Komp 4s	5'-CGG TGC CCG AAA TTG GGC TCC TGC-3'
Komp 4as	5'-CAG AAG GAG GTG ATG TGG ACA GCG-3'
Kompetitor <i>fucT5</i>	
Komp 5s	5'-TGG ATC ACA CTA GCT ACT CTG ACC-3'
Komp 5as	5'-CTG GAG TCG GCA GTG ATG TTG-3'
Kompetitor <i>fucT6</i>	
Komp 6s	5'-CAA GCC ACA GTG GTC GTG GC-3'
Komp 6as	5'-GTG CCA GGC ACC ATC TCT GAG C-3'
Kompetitor <i>fucT7</i>	
Komp 7s	5'-CCC ACC GTG GCC CAG TAC CGC TTC T-3'
Komp 7as	5'-CTG ACC TCT GTG CCC AGC CTC CCG T-3'
Kompetitor Core-2	
Komp C2s	5'-GAA ATG CTG AGG ACG TTG CTG CG-3'
Komp C2as	5'-ATA GTC GTC AGG TGT CCA CCG AG-3'
Kompetitor <i>pgk1</i>	
Komp PGKs	5'-AAC AGC TAT GAC CAT G-3'
Komp PGKas	5'-GGTA AAA CGA CGG CCA GT-3'

Primer für die Klonierung von <i>fucT</i>-Genen	
<i>fucT6</i>	
F6s	5'-GCA GGA GAT TGT CAT CAA TGA CCC-3'
F6as	5'-GAG TCC TTA GGT AGA TGA GGC C-3'
<i>fucT7</i>	
F7s	5'-GAG ACT GTG GAT GAA TAA TGC TGG-3'
F7as	5'-CCA GCG GAT CTC AGG CCT GAA ACC-3'

2.1.6 *E. coli*-Stamm und Medien zur Kultivierung

<p><i>Escherichia coli</i> TOP10 (Fa. Invitrogen, California, USA)</p> <p><u>Genotyp:</u> <i>F mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80<i>lacZ</i>ΔM15 Δ<i>lacX74</i> <i>recA1 deoR araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str^R) <i>endA1 nupG</i></p>

Nährmedien für die Kultivierung von *E. coli* wurden vor Gebrauch autoklaviert. Hitzesensible Zusätze (Antibiotika) wurden sterilfiltriert und nach Abkühlung des Mediums auf 45°C supplementiert.

<p>LB-Flüssigmedium (Fa. SIGMA, Deisenhofen)</p>
<p>LB-Agarplatten</p> <p>LB-Flüssigmedium mit 1,5% (w/v) Agar Select</p>
<p>LB-Flüssigmedium/Agarplatten mit Ampicillin bzw. Kanamycin</p> <p>LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin bzw. 25µg/ml Kanamycin</p> <p>- für Agarplatten zusätzlich mit 1,5% (w/v) Agar Select</p>

2.2 Materialien für zellbiologische Arbeiten

2.2.1 Chemikalien

Dimethylsulfoxide (DMSO)	Fa. SIGMA, Deisenhofen
Fötale Kälberserum (FCS)	Fa. Bio Whittaker Europe, Belgien
Formaldehyd 37% (w/v)	Fa. SIGMA, Deisenhofen
FuGENE™6 Transfektions-Reagenz	Fa. Boehringer, Mannheim
G418 Sulfat	Fa. Calbiochem, Bad Soden
Gentamicinsulfat (600ug/ml)	Fa. SIGMA, Deisenhofen
N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamine (200mM)	Fa. Biochrom KG, Berlin
PBS-Dulbecco (1x) w Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Fa. Biochrom KG, Berlin
PBS-Dulbecco (1x) w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Fa. Biochrom KG, Berlin
Penicillin-Streptomycin	Fa. Biochrom KG, Berlin
Trypanblau-Lösung 0,4% (w/v)	Fa. SIGMA, Deisenhofen
Trypsin-EDTA-Lösung [0,05% Trypsin (w/v); 0,02% EDTA (w/v)] in PBSw/o	Fa. Biochrom KG, Berlin

2.2.2 Reaktionskits

Fast Quant Zelladhäsionssystem FQI	Fa. Amplificon, Berlin
PCR mycoplasma detection kit	Fa. Stratagene, Heidelberg

2.2.3 Enzyme

Neuraminidase Typ II <i>Vibrio cholerae</i>	Fa. SIGMA, Deisenhofen
---	------------------------

2.2.4 Antikörper

Name	Epitop	Isotyp	Ursprung	Hersteller	Referenz
KM93	sLe ^x	IgM	monoklonal; Maus	Calbiochem	Lasky, L. A., 1995
KM231	sLe ^a	IgG	monoklonal; Maus	Calbiochem	Lasky, L. A., 1995
C3D-1	Le ^x	IgM, kappa	monoklonal; Maus	Dako	Dorfman <i>et al.</i> , 1986
F0479	unbekannt	IgG	Ziege	Dako	Hersteller
W6/32	HLA class I	IgG2a, kappa	monoklonal; Maus	Dako	Daar <i>et al.</i> , 1984
MOPC-104E	Isotyp-Kontrolle	IgM	Maus, Aszites	SIGMA	Hersteller
MOPC-21	Isotyp-Kontrolle	IgG1, kappa	Maus, Aszites	SIGMA	Hersteller
F0232	unbekannt	IgG	Kaninchen	Dako	Hersteller

2.2.5

Zelllinien und Medien zur Kultivierung

Name	Nummer	Herkunft	Charakteristika	Referenz
CHO-K1	CCL-61 (ATCC) ¹	Ovarium (Hamster)	adhärent; epithelial	Kao <i>et al.</i> , 1969
NB4	ACC 207 (DSMZ) ²	promyelotische Leukämie (human)	Suspension	Lanotte <i>et al.</i> , 1991
Hs 746T	HTB-135 (ATCC)	Magenkarzinom (human)	adhärent; epithelial; <i>metastasierend</i> (linkes Bein)	Smith, H.S., 1979
RF-48	CRL-1863 (ATCC)	Magenkarzinom (human)	Suspension (z.T. adhärent); Einzel- zellen und Cluster; <i>metastasierend</i> (Ascites)	Moyer, M.P., 1983
AGS	CRL-1739 (ATCC)	Magenkarzinom (human)	adhärent; epithelial; <i>nicht metastasierend</i>	Barranco <i>et al.</i> , 1983
KatoIII	HTB-103 (ATCC)	Magenkarzinom (human)	adhärent; sphäroid; <i>metastasierend</i> (Lymphknoten)	Sekiguchi <i>et al.</i> , 1978
N87	CRL-5822 (ATCC)	Magenkarzinom (human)	adhärent; epithelial; <i>metastasierend</i> (Leber)	Park <i>et al.</i> , 1990
SNU-1	CRL-5971 (ATCC)	Magenkarzinom (human)	Suspension; Einzel- zellen und Cluster; <i>metastasierend</i> (Ascites)	Park <i>et al.</i> , 1990
SNU-5	CRL-5973 (ATCC)	Magenkarzinom (human)	Suspension; Einzel- zellen und Cluster; <i>metastasierend</i> (Ascites)	Park <i>et al.</i> , 1990
SNU-16	CRL-5974 (ATCC)	Magenkarzinom (human)	Suspension; Einzel- zellen und Cluster; <i>metastasierend</i> (Ascites)	Park <i>et al.</i> , 1990

¹ ATCC = American Type Culture Collection; Rockville, Maryland (USA)

² DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; Braunschweig

Die Abwesenheit von Mycoplasmen wurde bei allen Zelllinien vor den zellbiologischen Experimenten überprüft und negativ getestet (PCR mycoplasma detection kit; Fa. Stratagene; nach Angaben des Herstellers).

RPMI 1640 (Fa. BioWhittaker Europe, Belgien)
Basalmedium RPMI 1640 mit <ul style="list-style-type: none">• 10% FCS (v/v)• 1% Glutamin (v/v)• 1% Penicillin-Streptomycin (v/v)• 0,5% Gentamicin (v/v)
Einfriermedium Basalmedium mit 10% DMSO (v/v)
Selektionsmedium Basalmedium mit 400 – 800 µg G418/ml

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Anzucht und Lagerung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte ausschließlich bei einer Temperatur von 37°C. Flüssigkulturen wurden dabei entweder in 20ml Reagenzgläsern (für Minipräparationen sowie Stammkulturen) oder in Erlenmeyerkolben unterschiedlicher Größe (für Maxipräparationen) auf entsprechenden Schüttelbrettern (200 UpM) unter einer Inkubationshaube inkubiert. Die Anzucht der Zellen auf festen Nährböden erfolgte in einem Brutschrank. Transformierte *E. coli*-Stämme, die eine selektionierbare Antibiotika-Resistenz trugen (Amp^R; Kan^R), wurden unter dem entsprechenden antibiotischen Selektionsdruck in Flüssigmedien oder auf festen Nährböden angezogen.

Für die Archivierung der unterschiedlichen *E. coli*-Klone wurde eine Übernachtskultur (ÜK) des gewünschten *E. coli*-Stammes in 10ml LB-Medium (gegebenenfalls mit Zusatz von Antibiotika) hergestellt. 900µl dieser ÜK wurden mit 100µl sterilem Glycerin vermischt und in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt. Die Lagerung der *E. coli*-Glycerinkulturen erfolgte bei -70°C.

Alle eingefrorenen *E. coli*-Glycerinkulturen wurden nach einer Woche Lagerung bei -70°C einem Auftautest unterzogen. Zu diesem Zweck wurde mit einer hitzesterilisierten Impföse ein Aliquot des tiefgefrorenen *E. coli*-Stammes auf eine LB-Agarplatte (gegebenenfalls mit Zusatz von Antibiotika) ausgestrichen und die Lebensfähigkeit der Kultur nach Übernachts-(ÜN)-Inkubation detektiert.

3.1.2 Transformation von *E. coli*

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes TOP10 wurden mit den gewünschten Plasmiden nach Angaben des Herstellers transformiert (Fa. Invitrogen, California). Die verwendete Transformations-Methode basiert auf der Rubidiumchlorid-Methode zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen [Hanahan, 1985].

3.2 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Arbeiten wurden - falls im Text nicht anders vermerkt - entsprechend den Vorschriften von Sambrook *et al.* [1989] durchgeführt.

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA für analytische Experimente (RT-PCR; DNA-Sequenzierung) erfolgte unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits nach Angaben des Herstellers (Fa. QIAGEN, Hilden).

Für die Transfektion von Zelllinien wurden die gewünschten Plasmid-Vektoren mit Hilfe des EndoFree Plasmid Maxi Kits nach Angaben des Herstellers präpariert (Fa. QIAGEN, Hilden). Dieses System beinhaltet einen zusätzlichen Reaktionsschritt, in dessen Verlauf das bei der *E. coli*-Lyse entstehende Endotoxin LPS von der Plasmid-DNA entfernt wird. LPS reduziert die Transfektionseffizienz von Zelllinien und wurde deshalb während der Plasmid-Präparation abgetrennt [Weber, M *et al.*, 1995].

Beide Isolierungsmethoden zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* beruhen auf dem Prinzip der „Alkalischen Lyse“ nach Birnboim und Doly [1979].

Plasmid-DNA wurde generell in sterilem H₂O_{deion} gelöst und die Konzentration entsprechend festgestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

3.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus Zelllinien

Die Isolierung genomischer DNA aus Zelllinien erfolgte mit Hilfe des QIAGEN Genomic-tip Systems nach Angaben des Herstellers (Fa. QIAGEN, Hilden). Die gefällte genomische DNA wurde in einem geeigneten Volumen TE-Puffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8,0) über Nacht im Kühlschrank gelöst und anschließend entsprechend Abschnitt 3.2.5 quantifiziert. Genomische DNA wurde bei 4°C für maximal vier Wochen gelagert.

3.2.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllinien

Für RT-PCR-Experimente wurde aus Zelllinien Gesamt-RNA unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Fa. QIAGEN, Hilden) nach einer modifizierten Vorschrift des Herstellers isoliert. Adhärenz wachsende Zelllinien wurden zuvor einmal mit eiskaltem PBS_{w/o} gewaschen und anschließend in der Zellkulturflasche lysiert. Suspensionszellen wurden in einer auf 4°C ge-

kühlten Zentrifuge bei 300 x g abzentrifugiert, einmal mit eiskaltem PBS_{w/o} gewaschen und das Zellpellet im Anschluss lysiert.

Die analysierten Fucosyltransferasen sowie die Glucosyltransferase Core-2 liegen im Genom als „single-exon“-Gene vor [Renguine-Arnould *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1998], so dass die spezifischen Primer-Erkennungssequenzen nicht auf zwei getrennte Exons verteilt werden konnten. Die spezifischen Erkennungssequenzen der *pgk1*-Primer (PGKs, PGKas) wurden ebenfalls innerhalb eines Exons gewählt. In die Gesamt-RNA-Isolierung wurde ein DNaseI-Verdauungsschritt eingeführt, der eine Kontamination der zu analysierenden cDNA-Pools mit genomischer DNA ausschließen sollte. Zu diesem Zweck wurde die auf der RNA-Bindungs-Säule des Herstellers gebundene RNA mit 1U DNaseI (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) für 20 min bei Raumtemperatur verdaut. Störende Kontaminationen durch mitisolierte genomische DNA konnten dadurch verhindert werden.

Die Konzentration der eluierten Gesamt-RNA wurde anschließend entsprechend Abschnitt 3.2.5 bestimmt und die RNA bei -70°C gelagert.

3.2.4 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Zur Aufreinigung und Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren wurde eine Ethanolfällung durchgeführt. Hierzu wurde die Nukleinsäurelösung mit 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat, pH 5,0 und 2,5 Vol. Ethanol_{absolut} für 30 min bei -70°C gefällt. Nach Zentrifugation (10.000 x g, 15 min, 4°C) erfolgte ein Waschschrift mit Ethanol 70% (v/v) mit Luft-Trocknung des Nukleinsäure-Pellets für ca. 15 min bei RT. Die Nukleinsäuren konnten anschließend in der erforderlichen Konzentration in H₂O_{deion} gelöst werden. Die Konzentration der erhaltenen Nukleinsäurelösung wurde photometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.5).

Als eine weitere Möglichkeit der DNA-Reinigung wurde die in Abschnitt 3.2.7 beschriebene Elution von DNA aus Agarosegelen verwendet.

3.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen konnte mit Hilfe eines UV-Photometers bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden geeignete Verdünnungen der Nukleinsäurelösung in H₂O_{deion} hergestellt und deren Absorption (A_{260}) in einer Quarzküvette vermessen.

Für die photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren gilt in Näherung [Sambrook *et al.* 1989]:

$$1 A_{260} = 50 \mu\text{g/ml dsDNA in H}_2\text{O}_{\text{deion}}$$

$$1 A_{260} = 40 \mu\text{g/ml ssRNA in H}_2\text{O}_{\text{deion}}$$

Ein Maß für den Reinheitsgrad von Nukleinsäurelösungen ist das gemessene Absorptionsverhältnis A_{260}/A_{280} welches zwischen 1,7 und 2,0 liegen sollte. A_{260}/A_{280} -Verhältnisse kleiner als 1,7 deuten auf einen zu hohen Proteingehalt in der Nukleinsäurelösung hin. Derartig unreinigte Nukleinsäurelösungen wurden entsprechend Abschnitt 3.2.4 nachgereinigt.

3.2.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden in horizontalen Agarosegelen unterschiedlicher Konzentration (1-2 % w/v) nach Sambrook *et al.* [1989] aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurden dem Agarosegel Ethidiumbromid (Endkonzentration: 1 $\mu\text{g/ml}$) zugesetzt und die aufgetrennten DNA-Banden mittels einer UV-Lampe bei 302nm analysiert. Die Länge der DNA-Fragmente wurde dabei durch den Vergleich mit linearisierten DNA-Marker (Fa. Promega, Fa. Boehringer) abgeschätzt und mit Hilfe eines Gel-Dokumentationsgerätes (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) dokumentiert.

3.2.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen wurden die gewünschten DNA-Banden nach Visualisierung mittels einer UV-Lampe mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Fa. QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert.

3.2.8 Restriktion und Modifikation von DNA

Restriktionsanalysen erfolgten nach Angaben der jeweiligen Hersteller der Enzyme und Restriktionspuffer.

Dephosphorylierungsreaktionen mit Alkalischer Phosphatase wurden nach den Vorschriften von Sambrook *et al.* [1989] durchgeführt.

3.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-DNA-Ligase

In einem Ligationsansatz wurden üblicherweise 100 ng linearisierte und dephosphorylierte Plasmid-DNA mit einem 2-5 fachen Überschuss des zu klonierenden DNA-Fragmentes vermengt und unter Zusatz von 1mM ATP (Endkonzentration) und 1 U T4-DNA-Ligase für 4h bei 8°C im Kühlschrank inkubiert. Die anschließende Transformation in *E. coli* erfolgte entsprechend Abschnitt 3.1.2.

3.2.10 Ligation von PCR-Produkten in Klonierungs-Vektoren des TOPO™ TA-Cloning®-Systems

Die Ligation von PCR generierten DNA-Fragmenten in den Klonierungs-Vektor pCR®II-TOPO (Fa. Invitrogen, California) erfolgte gemäss den Angaben des Herstellers.

PCR generierte DNA-Fragmente, die mit Hilfe der *Pwo*-DNA-Polymerase (Fa. Boehringer, Mannheim) erzeugt wurden, mussten vor einer TOPO™-TA-Cloning® Reaktion modifiziert werden (Anhängen von 3`-überhängenden Adenosin-Resten die als Bindungspartner für die TOPO™-TA-Cloning® Reaktion dienen). Der 3`-überhängenden Adenosin-Reste wurde nach folgendem Protokoll angefügt:

Versuchsprotokoll 1: Anfügen 3`-überhängender Adenosin-Reste an PCR generierte DNA-Fragmente

25 µl gereinigtes PCR-Fragment

1mM ATP (Endkonzentration)

0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase

⇒ Inkubation für 10 min bei 72°C

3.2.11 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* [1977]. Die Kettenabbruch-Reaktion wurde mit Hilfe des Perkin-Elmer-Sequencing-Kits durchgeführt.

0,5 µg Plasmid-DNA wurden entsprechend Abschnitt 3.2.4 gefällt und anschließend mit 2,5 pmol des gewünschten Sequenzierprimers (siehe Abschnitt 2.1.5) und 4 µl des Perkin-Elmer-Sequencing-Kits ad. 10 µl H₂O_{deion} resuspendiert und nach dem folgenden Temperaturprofil in einem Thermocycler (MiniCycler PTC 150; Fa. MJ Research, Inc., USA) inkubiert:

PCR-Temperaturprofil 1: Sequenzier-PCR

95°C	10 sec	x 25 Zyklen
50°C	5 sec	
60°C	4 min	

Die automatisierte Sequenzanalyse der erzeugten Reaktionsprodukte wurde von Frau H. Hinz, Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie, an einem Applied Biosystems Sequenziergerät Typ 377A gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.12 PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten

Für die gezielte Amplifikation von DNA-Sequenzen wurde die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) angewendet. Protokollerstellung und Arbeitsanweisungen erfolgten nach den Vorgaben von Innis *et al.* [1991]. Für eine Standard-PCR wurden die folgenden Lösungen in einem sterilen PCR-Reaktionsgefäß (200 µl) vereinigt:

Versuchsprotokoll 2: Standard-PCR

DNA-Matrize	10-250	ng
dNTPs	20	nmol
DNA-Primer A	10	pmol
DNA-Primer B	10	pmol
PCR-Puffer (10 x)	5	µl
PCR-Enzym High Fidelity® oder <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	1	U
H ₂ O _{deion}	ad 50	µl

Die spezifischen DNA-Primer (siehe Abschnitt 2.1.5) wurden mit Hilfe von Genbankanalysen basierend auf den DNA-Sequenzinformationen des *National Center for Biotechnology Information* ausgewählt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/index.html>; veröffentlicht in den Genbanken des NCBI). Dabei wurde darauf geachtet, dass die jeweiligen Primer-Paare ausschließlich mit der gewünschten DNA-Zielsequenz hybridisieren können. Die PCR-amplifizierten DNA-Fragmente wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und die Größe und Reinheit der entstandenen DNA-Fragmente dokumentiert (siehe Abschnitt 3.2.6).

PCR-Standard-Ansätze (Klonierung von DNA-Sonden; Synthese kompetitiver DNA-Standards) wurden mit Hilfe des High Fidelity®-Systems (Fa. Boehringer, Mannheim) durchgeführt.

Für die direkte RT-PCR-Klonierung kompletter Gene, wurde die *Pwo*-DNA-Polymerase (Fa. Boehringer, Mannheim) verwendet. Diese aus *Pyrococcus woesei* isolierte DNA-Polymerase verfügt über eine 3`-5`-Exonuklease-Aktivität, mit deren Hilfe fehlgepaarte Nukleotide während der PCR-Vervielfältigung korrigiert werden können. Somit lassen sich DNA-Sequenzen mit einer Genauigkeit von 10^{-8} Fehler / bp vervielfältigen.

3.2.13 Reinigung von PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten

Um nach einer durchgeführten PCR Überreste nicht verbrauchter Reaktionskomponenten von dem entstandenen DNA-Amplifikationsprodukt abzutrennen (Primer; Nukleotide; Enzym) wurde der QIAquick PCR Purification Kit (Fa. QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.14 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Unter Verwendung des cDNA-Synthese Kits der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) wurde mit Hilfe reverser Transkription aus zellulärer Gesamt-RNA eine komplementäre DNA Matrize (cDNA) des isolierten mRNA-Pools hergestellt (RNA-Matrizen-abhängige DNA-Synthese durch reverse Transkriptase).

Das verwendete Reaktionsprotokoll wurde gemäss den Angaben des Herstellers wie folgt durchgeführt:

Versuchsprotokoll 3: Reverse Transkription zellulärer Gesamt-RNA

1 µg Gesamt-RNA
4 pmol Poly-d(T)₁₈-Primer
5 µl cDNA-Synthese Mix
ad 40 µl H₂O_{deion}
⇒ 1h 37°C
⇒ Lagerung bei -20°C

3.2.15 Qualitative RT-PCR

Die reverse Transkription zellulärer mRNA mit einer anschließenden Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine extrem sensitive und zuverlässige Methode, mit deren Hilfe die qualitative Genexpression unterschiedlicher Gene detektiert werden kann.

Die qualitative Genexpression unterschiedlicher Gene in Zelllinien wurde nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

Versuchsprotokoll 4: Qualitative RT-PCR

- Kultivierung der Zelllinien (Abschnitt 3.3.1)
- Isolierung zellulärer Gesamt-RNA (Abschnitt 3.2.3).
- cDNA-Synthese aus 1 µg Gesamt-RNA (Abschnitt 3.2.14)
in einem Endvolumen von 20µl → jeweils 1µl (entspricht 50ng Gesamt-RNA)
dieser cDNA-Präparation wurde als DNA-Matrize eingesetzt.
- qualitativer PCR-Nachweis der Genexpression ausgesuchter Gene
mit Hilfe spezifischer Primerpaare (Abschnitt 2.1.5).

Die verwendeten PCR-Temperaturprofile für die verschiedenen analysierten Gene sind im folgenden aufgelistet:

PCR-Temperaturprofil 2: PGK1

95°C	2 min		x 35 Zyklen
95°C	10 sec		
62°C	30 sec		
72°C	40 sec		

PCR-Temperaturprofil 3: Fucosyltransferase 3

95°C	2 min		x 39 Zyklen
95°C	30 sec		
62°C	40 sec		
72°C	45 sec		

PCR-Temperaturprofil 4: Fucosyltransferase 4

95°C	2 min	
95°C	30 sec	x 39 Zyklen
65°C	40 sec	
72°C	45 sec	

PCR-Temperaturprofil 5: Fucosyltransferase 5

95°C	2 min	
95°C	30 sec	x 39 Zyklen
62°C	40 sec	
72°C	45 sec	

PCR-Temperaturprofil 6: Fucosyltransferase 6

95°C	2 min	
95°C	30 sec	x 39 Zyklen
63°C	40 sec	
72°C	45 sec	

PCR-Temperaturprofil 7: Fucosyltransferase 7

95°C	2 min	
95°C	30 sec	x 39 Zyklen
65°C	40 sec	
72°C	45 sec	

PCR-Temperaturprofil 8: Core-2-N-acetyl-Glucosamintransferase (Core 2)

95°C	2 min	
95°C	30 sec	x 39 Zyklen
65°C	40 sec	
72°C	45 sec	

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden auf einem Agarosegel (Abschnitt 3.2.6) analysiert, gereinigt (Abschnitt 3.2.7) und in den Klonierungs-Vektor pCR®II-TOPO (Fa. Invitrogen, California) kloniert. Um die Richtigkeit der klonierten DNA-Fragmente zu zeigen wurden alle erhaltenen Konstrukte (siehe Abschnitt 2.1.4) entsprechend Abschnitt 3.2.11 sequenziert und die Ergebnisse durch Genbank-Analysen bestätigt.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/index.html>)

3.2.16 RT-PCR-Klonierung der *fucT6* und *fucT7*-Gene

Um den Einfluss der Expression von Fucosyltransferase 6 und 7 auf das Adhäsionsverhalten von Zelllinien zu untersuchen, wurden die beiden Gene *fucT6* und *fucT7* mit Hilfe eines RT-PCR-Experimentes kloniert. Die cDNA wurde entsprechend Abschnitt 3.2.14 durch reverse Transkription aus Gesamt-RNA der promyelotischen Zelllinie NB4 hergestellt.

Um eine hohe Amplifikationsgenauigkeit zu gewährleisten wurde die *Pwo*-DNA-Polymerase (Fa. Boehringer, Mannheim) eingesetzt. Das Gen *fucT6* wurde mit dem Primerpaar F6s/F6as, das Gen *fucT7* mit dem Primerpaar F7s/F7as amplifiziert. Die verwendeten PCR-Temperaturprofile sind im folgenden aufgeführt:

PCR-Temperaturprofil 9: Fucosyltransferase 6

95°C	4 min		x 39 Zyklen
95°C	20 sec		
66°C	40 sec		
72°C	44 sec		

PCR-Temperaturprofil 10: Fucosyltransferase 7

95°C	5 min		x 38 Zyklen
95°C	40 sec		
62°C	45 sec		
72°C	45 sec		

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden auf einem Agarosegel (Abschnitt 3.2.6) analysiert und gereinigt (Abschnitt 3.2.7). Nach Modifikation der 3`-Enden mit Adenosin (Abschnitt 3.2.10) wurden beide DNA-Fragmente in den Klonierungs-Vektor pCR®II-TOPO (Fa. Invitrogen, California) kloniert. Um die Richtigkeit der klonierten DNA-Fragmente zu zeigen, wurden beide Konstrukte (siehe Abschnitt 2.1.4: Plasmid-Vektoren) entsprechend Abschnitt 3.2.11 sequenziert und die Ergebnisse durch Genbank-Analysen validiert.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/index.html>)

3.2.17 Semiquantitative, kompetitive RT-PCR

Für den semiquantitativen Nachweis der Genexpression eines definierten Gens wurde die Methode der kompetitiven RT-PCR mit internen heterologen DNA-Standards etabliert. Diese heterologen DNA-Standards (DNA-Kompetitoren) werden so konstruiert, dass jeweils an den 3` und 5`-Enden des DNA-Kompetitors dieselben Primer-Bindungsstellen erzeugt werden, die auch für den PCR-Nachweis der gewünschten Gene Verwendung finden. Aus diesem Grund, kann mit demselben Primerpaar sowohl die gewünschte cDNA (Ziel-cDNA) als auch der zugehörige DNA-Kompetitor amplifiziert werden. Der DNA-Kompetitor sowie die Ziel-cDNA konkurrieren (kompetitieren) während dieser PCR um das gleiche Primerpaar und ermöglichen dadurch eine Standardisierung der einzelnen PCR-Reaktionen [Gilliland, G., *et al.*, 1990]. Auf Grund der gleichzeitigen Amplifikation des Zielgens mit dem applizierten Kompetitor in einem Reaktionsgefäß ist die Bestimmung der exponentiellen Amplifikationsphase der PCR-Messungen nicht mehr notwendig [Becker-Andre et al., 1989; Becker-Andre, M. 1993].

Herstellung der kompetitiven, heterologen DNA-Standards

Die Konstruktion der heterologen DNA-Kompetitoren erfolgte in Anlehnung an den PCR MIMIC Construction Kit der Firma Clontech Laboratories, Inc. (Heidelberg) durch zwei aufeinander folgende PCR-Reaktionen. Bei der ersten PCR-Reaktion wurde ein Kompetitor-Primerpaar verwendet (siehe Abschnitt 2.1.5). Am 5`-Ende des jeweiligen Kompetitor-Primers befindet sich die spezifische Gensequenz, an die sich ein ca. 20 bp langes DNA-Fragment des heterologen DNA-Standards anschließt. Das Kompetitor-Primerpaar ermöglicht sowohl die Hybridisierung mit einem nicht-homologen DNA-Fragment als auch mit dem gewünschten Ziel-Gen. Dadurch wurden die Primer-Erkennungssequenzen des Ziel-Gens an den Enden des

heterologen DNA-Standards erzeugt. In der zweiten PCR wurde der DNA-Kompetitor mit den Gen-spezifischen „äußeren“ Primern amplifiziert.

Versuchsprotokoll 5: PCR-Synthese eines heterologen DNA-Kompetitors

pBluescript II KS (+) als heterologes DNA-Fragment	100	ng
dNTPs	20	nmol
Kompetitor-Primer A	10	pmol
Kompetitor-Primer B	10	pmol
PCR-Puffer (10 x)	5	µl
PCR-Enzym High Fidelity®	1	U
H ₂ O _{deion}	ad 50	µl

PCR-Temperaturprofil 11: PCR-Synthese eines heterologen DNA-Kompetitors

95°C	2 min	x 35 Zyklen
95°C	35 sec	
50°C	60 sec	
72°C	60 sec	

Die erzeugten DNA-Kompetitoren wurden gereinigt (Abschnitt 3.2.13) und 1/5 Vol. des Reaktionsproduktes als Matrize für eine zweite PCR verwendet. Das jeweilige PCR-Temperaturprofil für die zweite PCR entsprach exakt den PCR-Protokollen die in Abschnitt 3.2.16 aufgelistet wurden. Als „äußere“ Gen-spezifische Primer wurden die Primer der qualitativen PCR verwendet (siehe Abschnitt 2.1.5). Die Synthese der heterologen DNA-Kompetitoren ist schematisch in Abb. 4 dargestellt.

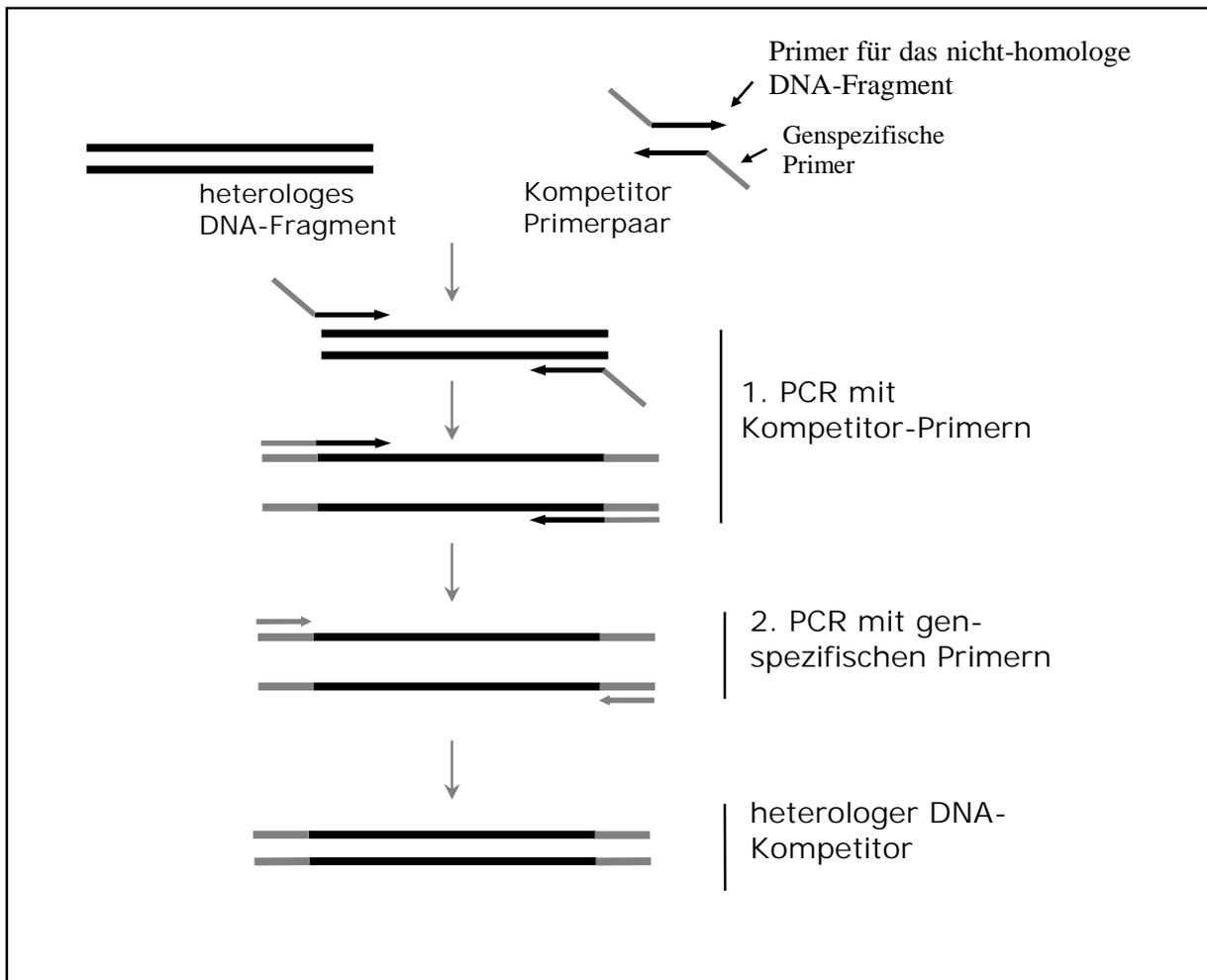


Abbildung 4: Synthese heterologer DNA-Kompetitoren

Für die erste PCR-Reaktion wurde ein Kompetitor-Primerpaar verwendet, welches sowohl die Hybridisierung mit einem heterologen DNA-Fragment als auch mit dem gewünschten Ziel-Gen ermöglicht. In einem zweiten PCR-Experiment wurde der heterologe DNA-Kompetitor mit den genspezifischen Primern amplifiziert.

Als heterologes DNA-Fragment wurde die MCS (*mutiple cloning site*) des Vektors pBluescript II KS (+) (Fa. Stratagene) verwendet. Durch die Ligation unterschiedlich großer DNA-Fragmente in die MCS des pBluescript-Vektors ist es möglich mit demselben Kompetitor-Primerpaar unterschiedliche lange Kompetitoren zu generieren. Damit kann für jedes kompetitive Mess-System die optimale Kompetitor-Länge generiert werden (Abb. 5).

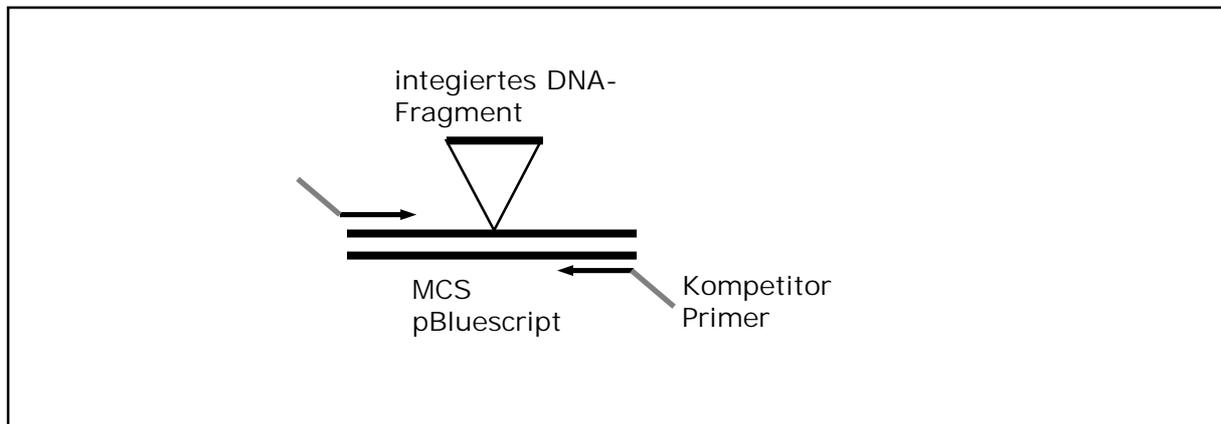


Abbildung 5: Prinzip der individuellen Anpassung von DNA-Kompetitoren

Als heterologes DNA-Fragment wurde die MCS (*mutiple cloning site*) des Vektors pBluescript II KS (+) (Fa. Stratagene) verwendet. Durch die Integration verschieden großer DNA-Fragmente in die MCS ist es möglich, die individuelle Größe der DNA-Kompetitoren zu variieren und an die Versuchserfordernisse anzupassen.

Um die benötigte Arbeitskonzentration der PCR-generierten DNA-Kompetitoren abzuschätzen, wurden die Kompetitor-Lösungen gereinigt (Abschnitt 3.2.13), mit einem UV-Spektrometer quantifiziert (Abschnitt 3.2.5) und die molare Konzentration in Abhängigkeit von der gewählten Kompetitorgröße berechnet. Mit Glykogen-haltigem Wasser (10µg / ml) wurde eine Arbeitskonzentration von 100 attomol / µl hergestellt und bei -20°C gelagert.

Die Molarität wurden nach den folgenden Formeln berechnet:

$$K = \frac{xbp \cdot 660g}{mol \cdot bp} = \frac{g}{mol}$$

K = Molgewicht des DNA-Kompetitors mit x bp

$$C \cdot \frac{1}{K} \cdot \frac{g}{10^6 \mu g} \cdot \frac{10^6 \mu mol}{mol} \cdot \frac{10^{12} attomol}{\mu mol} = X \frac{attomol}{\mu l}$$

C = Konzentration des DNA-Kompetitors in µg / µl

X = molare Konzentration des DNA-Kompetitors

Versuchsprotokoll 6: semiquantitative RT-PCR

cDNA-Matrize (1µl = 50ng Gesamt-RNA)	1 µl
DNA-Kompetitor (100 attomol/µl) sowie Verdünnungsreihen davon	1 µl
dNTPs	20 nmol
Primer A	10 pmol
Primer B	10 pmol
PCR-Puffer (10 x)	5 µl
PCR-Enzym High Fidelity®	1 U
H ₂ O _{deion}	ad 50 µl

Die verwendeten Versuchsprotokolle entsprechen den in Abschnitt 3.2.16 aufgelisteten Temperaturprofilen. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden auf einem Agarosegel (Abschnitt 3.2.6) analysiert und densitometrisch ausgewertet.

1.1.1 Densitometrische Auswertung der semiquantitativen RT-PCR-Signale

Die amplifizierten PCR-Signale der kompetitiven RT-PCR wurden mit Hilfe des Bildanalyse-Programms *NIH Image 1.61* digital erfasst und anschließend densitometrisch ausgewertet. Jedes einzelne spezifische DNA-Signal eines gemessenen Gens wurde eingelesen, der Hintergrund des Agarosegels subtrahiert und das Verhältnis der Messwerte (relative Einheiten) für das detektierte Gen und den dazugehörigen Kompetitor bestimmt.

Die so erhaltenen Messdaten werden im folgenden als „korrigierte Messwerte“ bezeichnet. Der korrigierte Messwert des Haushaltsgens *pgk1* diene als Bezugsgröße der verschiedenen Messungen und wurde auf 100% festgelegt, da per Definition die Expression eines Haushaltsgens in allen Zellen in etwa gleich hoch ist [Gilliland *et al.*, 1990]. Die Prozentangaben aller anderen Ansätze errechneten sich daraus.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung und Lagerung der Zelllinien

Zellkultivierung

Die Kultivierung von Zelllinien erfolgte bei 37°C in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre mit 5%igen CO₂-Gehalt. Zelllinien benötigen für ihr Wachstum sowie den Erhalt ihrer Vitalität einen regelmäßigen Wechsel des Kulturmediums, da einerseits essentielle Komponenten und Zusätze metabolisiert werden (z.B. Aminosäuren), und andererseits toxische Stoffwechselendprodukte ins Medium abgegeben werden. Die notwendigen Zeitintervalle für einen Mediumswechsel sowie die Subkultivierung der Zelllinien sind von der Wachstumsrate und der metabolischen Aktivität der Zellen abhängig und variieren deshalb zwischen den verschiedenen Zelllinien.

Das Medium der Stammkulturen wurde routinemäßig ca. zweimal pro Woche erneuert. Zu diesem Zweck wurde bei adhärennten Monolayer-Kulturen das verbrauchte Kulturmedium entfernt und durch neues Medium ersetzt. Bei nicht-adhärennten Suspensions-Kulturen wurde das verbrauchte Medium inklusive der darin enthaltenen Zellen in ein steriles Falcon®-Gefäß überführt und für 3 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Absaugeinrichtung entfernt und das Zell-Pellet mit frischem, auf 37°C vorgewärmtem Kulturmedium vorsichtig resuspendiert.

Subkultivierung der Zelllinien

Adhärennt wachsende Zellen wurden bis zu einer maximalen Konfluenz von ca. 90% angezogen und anschließend in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:20 verdünnt. Zu diesem Zweck wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellmonolayer zweimal mit sterilem PBS_{w/o}-Puffer gewaschen. Die Zelllinie N87 wurde vor dem Trypsinieren zusätzlich mit einer 0,1% igen EDTA-Lösung für 15 min inkubiert. Nach Zugabe einer auf 37°C vorgewärmten Trypsin/EDTA-Lösung wurden die Zellen für 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend durch vorsichtiges Klopfen an die Außenwand des Zellkulturgefäßes von der Oberfläche abgelöst. Die Zellsuspension wurde durch sorgfältiges auf- und abpipettieren vereinzelt und bei Bedarf in ein neues Zellkulturgefäß überführt.

Bei der Subkultivierung von Suspension-Zellkulturen wurde alle 48h die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer kontrolliert und die Zellsuspension mit frischem Medium so verdünnt, dass eine maximale Dichte von 5×10^5 Zellen/ml nicht überschritten wurde.

Vitalfärbung der Zellen

Nicht membrangängige Farbstoffe wie z.B. Trypanblau färben nur tote Zellen an und eignen sich deshalb für die mikroskopische Vitalitätsbestimmung. Trypanblau (0,5% w/v) wurde mit der zu untersuchenden Zellsuspension im Verhältnis 1:1 (v/v) vermischt und der Anteil der lebenden Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer mikroskopisch ermittelt. In den Stammkulturen lag der Anteil an lebenden Zellen durchschnittlich bei über 95%.

Lagerung der Zelllinien

Zum Einfrieren wurden die Zellen, wie oben beschrieben, vereinzelt und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspensionen wurden für 3 min bei $300 \times g$ pelletiert und in Zellkultur-Einfriermedium (Basalmedium mit 10% (v/v) DMSO) so resuspendiert, dass eine Konzentration von 1×10^6 Zellen / ml erreicht wurde. Jeweils 1 ml dieser Suspension wurde in ein steriles Kryoröhrchen überführt und in einem mit Isopropanol gefüllten Einfriergefäß über Nacht auf -70°C abgekühlt.

Für die Langzeitlagerung wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Auftau-Test

Nach einer Woche Lagerung in flüssigem Stickstoff wurde die Vitalität der Zellen überprüft. Zu diesem Zweck wurde ein Teströhrchen möglichst rasch im Wasserbad bei 37°C erwärmt und anschließend in ein mit vorgewärmtem Zellkulturmedium vorbereitetes Zellkulturgefäß überführt. Am nächsten Tag wurde die Vitalität der Zellen, wie oben angegeben, überprüft.

Um den störenden Einfluss des in dem Einfriermedium enthaltenen DMSO auf die Zellen zu verhindern, mußte das Einfriermedium 24h nach dem Auftauen komplett entfernt werden. Deshalb wurden die Zellen einmal mit $\text{PBS}_{\text{w/o}}$ gewaschen und in frischem Zellkulturmedium resuspendiert.

3.3.2 Transfektion von CHO-K1-Zellen

Für die Transfektion von CHO-K1-Zellen wurde das FuGENE™6-Transfektionsreagenz der Firma Boehringer (Mannheim) nach Angaben des Herstellers verwendet. Um eine hohe Transfektionseffizienz zu erreichen, wurden die CHO-K1-Zellen 24 h vor der Transfektion auf sterile 6-well-Platten (Fa. Nunc) umgesetzt und über Nacht im Brutschrank bis zu einer Konfluenz von 75% kultiviert. Die Transfektion wurde standardmäßig nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

Versuchsprotokoll 7: Transfektion von CHO-K1 mit FuGENE™6

FuGENE™6	8 µl
RPMI1640-Medium (serumfrei)	80 µl
⇒ vorsichtig mischen und 5 min bei RT inkubieren	
⇒ diese Lösung vorsichtig auf gewünschte	
Plasmid-DNA pipettieren	3 µg
⇒ 15 min RT	
⇒ tropfenweise zu den Zellen geben	

Selektion stabiler Zell-Klone

48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit G418-haltigem Medium (Basalmedium mit 800 µg G418/ml) selektioniert um stabile Transformanten zu erzeugen. Nach ca. fünf Tagen Inkubation wurden G418-resistente Zellklone unter der Sterilbank mit Hilfe einer Gilson™-Pipette vereinzelt und in Selektionsmedium (500 µg G418/ml) kultiviert.

3.3.3 Oberflächenanalyse von Zelllinien mit Hilfe eines Flow-Zytometers

Für flowzytometrische Analysen wurden 5×10^5 Zellen mit eiskaltem PBS_{w/o} gewaschen und die Zellpellets in 100µl PBS_{w/o} mit den in Abschnitt 2.2.4 aufgelisteten monoklonalen Antikörpern (10 µg / 100 µl PBS_{w/o}) 15 min auf Eis inkubiert.

Im Anschluss wurden die Zellen mit 5ml eiskaltem PBS_{w/o} gewaschen und die Zellpellets in 100 µl (10µg in 100 µl PBS_{w/o}) FITC konjugiertem F0479-Konjugat für 15 min auf Eis inkubiert.

Direkt vor der Messung wurden die Zellen mit 500µl eiskaltem PBS_{w/o} verdünnt. Die flowzytometrischen Messungen wurden mit dem Durchflußzytometer EPICS XL-MCL System II (Fa. Coulter Corporation, USA) durchgeführt.

Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe der EPICS XL-MCL Software Version 3.0 (Fa. Coulter Corporation, USA), wobei pro Messung mindestens 10.000 „light scattered events“ gemessen und als Logarithmus der Fluoreszenzintensität dargestellt wurden.

3.3.4 Enzymatische Modifikation von Zelloberflächen mit Neuraminidase

Für eine komplette Desialisierung von Zell-Oberflächen wurden Zelllinien nach dem folgenden Protokoll modifiziert:

Versuchsprotokoll 8: Desialisierung von Zell-Oberflächen

- 1 x 10⁶ Zellen in Desialisierungspuffer (4mM CaCl₂; 0,15M NaCl; pH 5,5) waschen
- Zellen in 100µl Desialisierungspuffer resuspendieren und mit 20µl (≅ 40mU) Neuraminidase Typ II *Vibrio cholerae* (Fa. SIGMA, Deisenhofen) für 60min bei 37°C inkubieren
- Zellen in PBS_{w/o} waschen

Die modifizierten Zellen wurden im Anschluss für flowzytometrische Analysen (Abschnitt 3.3.3) oder Zelladhäsions-Experimente (Abschnitt 3.3.6) verwendet.

3.3.5 Enzymatische Markierung von Zelllinien

Lebende Zellen wurden mit Hilfe des Fast Quant Zelladhäsionssystem (Fa. Amplificon, Berlin) nach Angaben des Herstellers markiert.

3.3.6 Zelladhäsions-Experimente

Die Adhäsion von Zelllinien an E-Selektin exprimierende CHO-Zellen (freundlicherweise von Prof. Dr. Dietmar Vestweber; Universität Münster zur Verfügung gestellt) wurde in einem bewegten Adhäsionsmodell unter „low-shear-stress“-Bedingungen gemessen [Wagers *et al.*, 1997]. Bei diesen Zellen handelt es sich um einen CHO-K1-Stamm, der mit der cDNA,

die für das humane E-Selektin codiert, stabil transfiziert wurde [Zöllner & Vestweber, 1996]. Die korrekte Expression des E-Selektin-Epitops auf der Zelloberfläche der CHO-E-Zelllinie wurde nach der Anzucht der Zellen in Selektionsmedium durch eine flowzytometrische Analyse nachgewiesen.

Als Vergleichszelllinie wurde eine CHO-K1-Zelllinie etabliert (Abschnitt 3.3.2), die mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1(-) stabil transfiziert wurde und entsprechend der flowzytometrischen Analyse P-Selektin exprimierte (CHO-P).

Beide Zelllinien wurden unter identischen Bedingungen in Selektionsmedium mit G418 (500 µg/ml) kultiviert.

Herstellung von Zelladhäsions-Platten

Für die Herstellung von 12-well Zelladhäsions-Platten wurden CHO-E und CHO-P -Stammkulturen vereinzelt (Abschnitt 3.3.1) und in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen /well in G418-haltigem Basalmedium (500 µg/ml) bis zu einer Konfluenz von 100% kultiviert. Kurz vor der Adhäsionsmessung (siehe unten) wurden die Adhäsionsplatten zweimal mit PBS_w und einmal mit Basalmedium gewaschen. Die Unversehrtheit der CHO-P- und CHO-E-Monolayer wurde anschließend mikroskopisch überprüft.

Adhäsionsmessung

Für „*low-shear-stress*“-Adhäsionsmessungen wurden Tumor-Zellen oder CHO-Zellklone, die das Gen für die FucT6 (CHO-F6) bzw. FucT7 (CHO-F7) exprimieren, enzymatisch markiert (Abschnitt 3.3.5) und in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen / well in einem Volumen von 1ml Basalmedium auf die Zell-Adhäsionsplatten pipettiert. Nach 5 min Inkubationszeit (37°C, Zellkultur-Brutschrank) wurden die Zell-Adhäsionsplatten bei 37°C auf einer Schüttelvorrichtung mit 100UpM für 25 min inkubiert. Nicht adhärierte Zellen wurden anschließend durch dreimaliges Waschen mit PBS_{w/o} entfernt, wobei die Effizienz der Waschschriffe mikroskopisch überprüft wurde.

Die Anzahl von gebundenen Zellen / Reaktions-well wurde gemäss der Anleitung des „Fast Quant Zelladhäsionssystem“ (Fa. Amplificon, Berlin) in einem ELISA-Platten-Photometer (Messung bei 450nm) bestimmt. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden jeweils aus drei voneinander unabhängigen Messungen berechnet. Unspezifische Adhäsion der Zellen an CHO-P diente als Negativ-Kontrolle.

Um den maximal möglichen Anteil E-Selektin bindender CHO-Zellen (CHO-F6, CHO-F7, CHO-pIRES) darstellen zu können, wurden die Zellklone enzymatisch markiert und jeweils ein Aliquot (5×10^5 Zellen) in einem *well*, welches nicht mit CHO-E oder CHO-P beschichtet wurde, entsprechend den Angaben des Herstellers (Fast Quant Zelladhäsionssystem, Fa. Amplificon, Berlin) entwickelt. Diese theoretisch maximal erreichbare Bindung in den Kontrollwells wurde als 100% Adhäsion definiert und die Messwerte der E-Selektin-Adhäsion darauf bezogen. Die Kontrollwells wurden nach der Inkubation nicht gespült, so dass die Höhe des gemessenen Markierungssignals der Gesamtheit aller applizierten Zellen / Adhäsionswell entsprach.

Für vergleichende Adhäsionsmessung von Magenkarzinom-Zelllinien wurde die auf jeder Adhäsionsplatte dekutierte Adhäsion der promyelotischen Referenz-Zelllinie NB4 an CHO-E (korrigiert durch die unspezifische Adhäsion an CHO-P) als 100% Bindung definiert und die vermessene Bindung der Magenkarzinom-Zellen in Relation dazu gesetzt.

Spezifische Antikörper-Blockade der Zell-Adhäsion

Die Spezifität der Zell-Adhäsion von Tumor-Zelllinien an E-Selektin wurde durch Blockade-Experimente mit den in Abschnitt 2.2.4 aufgelisteten monoklonalen Antikörpern gezeigt.

5×10^5 markierte Tumorzellen (Abschnitt 3.3.5) wurden in $200\mu\text{l}$ PBS_w aufgenommen und mit jeweils $15\mu\text{l}$ der monoklonalen Antikörper KM93 (*anti* sialyl Lewis^x), KM231 (*anti* sialyl Lewis^a) oder C3D-1 (*anti* Lewis^x) für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift mit eiskaltem PBS_{w/o} wurden die Zellen mit $10\mu\text{l}$ F0232 (Fa. Dako) in $100\mu\text{l}$ PBS_{w/o} für 15 min auf Eis quervernetzt und abschließend für 20 min in 2% Formaldehyd in PBS_{w/o} fixiert.

Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit $15\mu\text{l}$ W6/32 (*anti* HLA Klasse-I) für 10 min auf Eis inkubiert, quervernetzt (2% Formaldehyd in PBS_{w/o}) und fixiert. Die Adhäsionsmessung erfolgte wie oben beschrieben.

Die Sättigungskonzentration der eingesetzten mAK wurde jeweils in einer Titrationskurve am Flowzytometer ermittelt. Hierfür wurde der Sättigungsbereich des FITC-markierten Konjugats F0479 zuvor in einer Sättigungskurve bestimmt und die entsprechende Konzentration für alle weiteren Messungen verwendet. Der Logarithmus des Fluoreszenzsignals wurde gegen die mAK-Verdünnung aufgetragen und der Sättigungspunkt des jeweiligen Antikörpers ermittelt.

IV Ergebnisse

1 Etablierung einer kompetitiven RT-PCR zur semiquantitativen Analyse des Expressionsniveaus diverser Fucosyltransferase-Gene

Da die terminale $\alpha(1,3)$ -Fucosylierung einen Schlüsselschritt im Biosyntheseweg fucosylierter Glucosamine vom sialyl Lewis^x-, Lewis^x-, sialyl Lewis^a- und Lewis^a-Typ als mögliche Adhäsionsliganden der Selektine darstellt, wurde der jeweilige Beitrag der fünf $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferasen (FucT) an der Präsentation von fucosylierten Glucosaminen auf der Zelloberfläche karzinogener Zellen zunächst auf dem Gen-Niveau untersucht.

Für den semiquantitativen Nachweis der transkriptionellen Expression der Fucosyltransferase-Gene *fucT3*, *fucT4*, *fucT5*, *fucT6*, *fucT7* wurden kompetitive RT-PCRs mit internen heterologen DNA-Standards etabliert und die Messergebnisse anhand der parallel analysierten Expression des Haushaltsgens *pgk1* normalisiert.

1.1 Validierung der Primerspezifität

Die bisher bekannten fünf humanen $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase-Gene sind in drei Genfamilien eingeordnet, wobei das Gencluster *fucT3-fucT5-fucT6* auf DNA-Ebene eine Homologie von mehr als 90% aufweist [Reguigne-Arnould *et al.*, 1996]. Um alle fünf $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase-Gene auf transkriptioneller Ebene sicher separieren zu können, wurde deshalb die Spezifität des RT-PCR-Systems durch ein qualitatives PCR-Experiment mit den spezifischen Primerpaaren der $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferasegene *fucT3*, *fucT4*, *fucT5*, *fucT6*, *fucT7* sowie des Haushaltsgens *pgk1* validiert.

Da die fünf *fucT*-Gene im humanen Genom als *single-exon*-Gene vorliegen, war es möglich genomische DNA als Matrize einzusetzen. Als DNA-Matrize wurde genomische DNA aus der Zelllinie NB4 verwendet. Die amplifizierten DNA-Fragmente (Abb. 6) wurden in den Vektor pCR®II-TOPO subkloniert und ihre Spezifität durch Sequenzanalyse und Gendatenbank-Recherche bestätigt (veröffentlicht in den Genbanken des NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/index.html>).

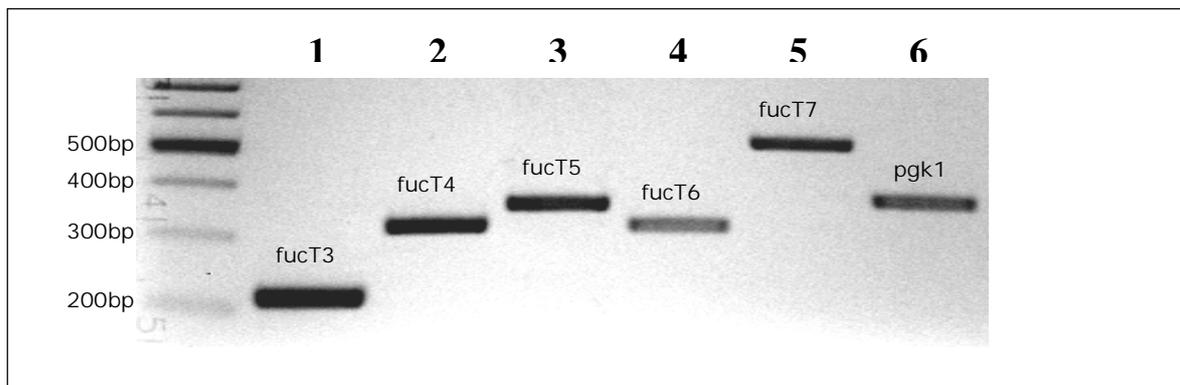


Abbildung 6: Qualitativer PCR-Nachweis der Gene *fucT3*, *fucT4*, *fucT5*, *fucT6*, *fucT7* sowie des Haushaltsgens *pgk1*

Die Spezifität der ausgewählten Primerpaare wurde durch ein qualitatives PCR-Experiment mit nachfolgender Klonierung und Sequenzanalyse validiert (als Matrize wurde genomische DNA aus der Zelllinie NB4 verwendet). Die Auftrennung erfolgte auf einem Agarosegel (1,5%). Die in Klammern gesetzten Angaben kennzeichnen die relative Position des amplifizierten Gen-Fragmentes in Bezug auf das ATG-Startcodon des betreffenden Gens. Spur 1: 217bp (152-369) DNA-Fragment aus *fucT3* (Primer 3s, 3as); Spur 2: 320bp (1177-1497) DNA-Fragment aus *fucT4* (Primer 4s, 4as); Spur 3: 357bp (-25-332) DNA-Fragment aus *fucT5* (Primer 5s, 5as); Spur 4: 321bp (-60-261) DNA-Fragment aus *fucT6* (Primer 6s, 6as); Spur 5: 500bp (612-1112) DNA-Fragment aus *fucT7* (Primer 7s, 7as); Spur 6: 374bp (698-1072) DNA-Fragment aus *pgk1* (Primer PGKs, PGKas); Spur M: 100bp-Leiter (DNA-Größenstandard).

1.2 Synthese der heterologen DNA-Kompetitoren

Die für die semiquantitative RT-PCR eingesetzten DNA-Kompetitoren wurden aus heterologen DNA-Fragmenten konstruiert und ließen sich von den spezifischen Gen-Signalen auf Grund der Fragmentlänge (Tabelle 3) auf einem Agarosegel separieren. Die Primer-Erkennungssequenzen der heterologen DNA-Kompetitoren wurden durch eine zweistufige PCR-Strategie eingeführt. Als heterologe DNA-Matrize wurde dazu die MCS (multiple cloning site) des Vektors pBluescript II KS (+) (Fa. Stratagene) verwendet.

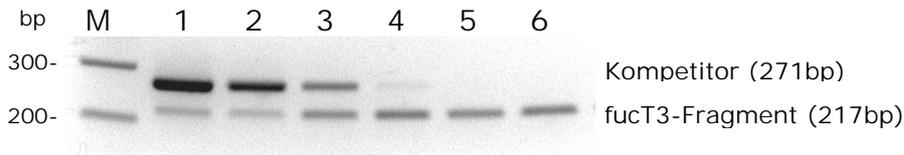
Tabelle 3: Größenvergleich der DNA-Kompetitoren mit den dazugehörigen Gen-Signalen

Gen	Gen-Fragment (bp)	Kompetitor (bp)
<i>fucT3</i>	217	271
<i>fucT4</i>	320	271
<i>fucT5</i>	357	268
<i>fucT6</i>	321	265
<i>fucT7</i>	500	273
<i>pgk1</i>	374	270

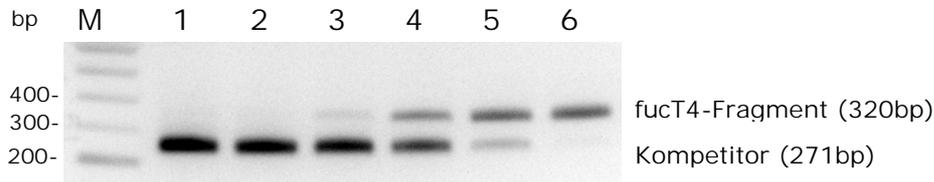
1.3 Validierung des Äquivalenzbereiches der synthetisierten DNA-Kompetitoren

Ausgehend von einer molaren Konzentration von 100 attomol / μl (M0) wurden serielle Verdünnungen (10er Stufen) der DNA-Kompetitoren in Glykogen-haltigem Wasser hergestellt und mit konstanten cDNA-Konzentrationen titriert. Üblicherweise wurden dazu Kompetitor-Konzentrationen von M0 (100 attomol/ μl) bis M6 (10^{-4} attomol/ μl) eingesetzt. Der Äquivalenzbereich der DNA-Kompetitoren wurde für jeden Kompetitor separat ermittelt, wobei die molaren Konzentrationen des DNA-Kompetitors und des Zielgens im Äquivalenzbereich nahezu identisch sind. Für die Gene *fucT4*, *fucT6*, *fucT7* sowie *pgk1* wurde eine cDNA-Präparation aus der Zelllinie NB4 verwendet. Da die Zelllinie NB4 die Gene *fucT3* und *fucT5* nicht exprimiert, wurden für die Validierung des *fucT3/fucT5*-RT-PCR-Systems jeweils 250ng genomische DNA als Matrize eingesetzt (Abb. 7).

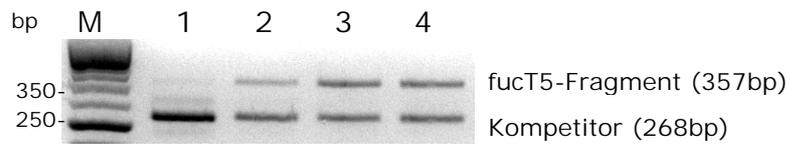
fucT3



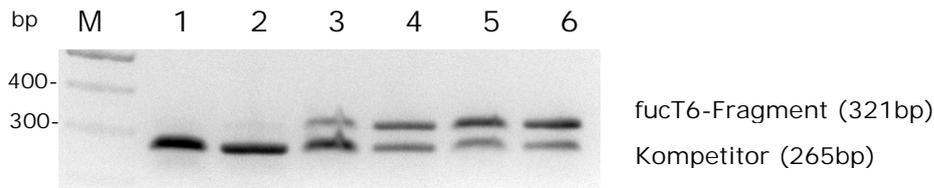
fucT4



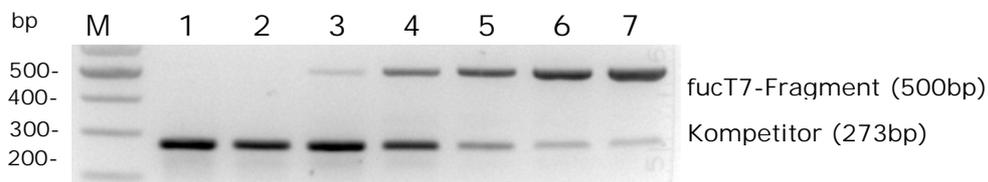
fucT5



fucT6



fucT7



pgk1

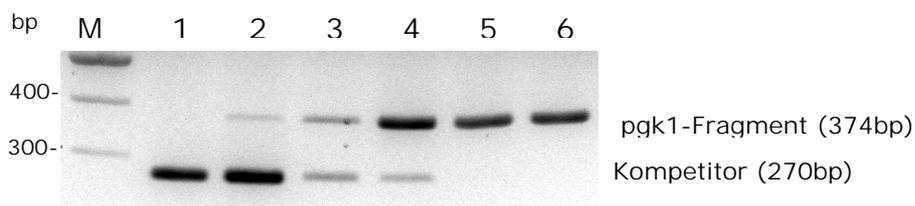


Abbildung 7: Validierung des Äquivalenzbereichs heterologer DNA-Kompetitoren.

Ausgehend von einer molaren Konzentration von 100 attomol/ μ l (M0; Spur 1) wurden serielle Verdünnungen (10er Stufen) der Kompetitoren mit einer konstanten Konzentration der DNA-Matrize titriert. Spur 2: M1 (10 attomol/ μ l). Spur 3: M2 (1 attomol/ μ l). Spur 4: M3 (10^{-1} attomol/ μ l). Spur 5: M4 (10^{-2} attomol/ μ l). Spur 6: M5 (10^{-3} attomol/ μ l). Spur 7: M6 (10^{-4} attomol/ μ l). In der Spur M ist der jeweils eingesetzte 100bp- oder 50bp-DNA-Längenmarker aufgetragen.

Für alle getesteten Kompetitoren ergab sich ein Äquivalenzpunkt im Bereich von $1 - 10^{-1}$ attomol/ μ l ($1 \text{ attomol} = 10^{-18} \text{ mol}$) (Tabelle 4). Damit liegt die Nachweisgrenze des Meßsystems bei ca. 6×10^4 bis 6×10^5 Molekülen (spezifische cDNA oder Kompetitor) pro Messansatz (50ng Gesamt-RNA für die Gene *fucT4*, *fucT6*, *fucT7* sowie *pgk1*; 250ng genomische DNA für die Gene *fucT3* und *fucT5*).

Tabelle 4: Äquivalenzbereiche der titrierten DNA-Kompetitoren
(M2=1 attomol / μ l; M3= 10^{-1} attomol / μ l)

Kompetitor für das Gen	Äquivalenzbereich
<i>fucT3</i>	M2
<i>fucT4</i>	M3
<i>fucT5</i>	M2
<i>fucT6</i>	M2
<i>fucT7</i>	M3
<i>pgk1</i>	M2

Für die nachfolgenden kompetitiven RT-PCR-Experimente wurden die DNA-Kompetitoren in der ermittelten molaren Konzentration des Äquivalenzbereiches eingesetzt.

Im Zuge eines qualitativen RT-PCR-screenings aller kultivierten Tumor-Zelllinien konnte keine quantifizierbare Expression der beiden Fucosyltransferase-Gene *fucT3* und *fucT5* detektiert werden (Abschnitt 2.1). Die nachfolgend beschriebenen Messungen zur Validierung der Amplifikationsdynamik der heterologen DNA-Kompetitoren wurden aus diesem Grund nur für die Gene *fucT4*, *fucT6*, *fucT7* sowie *pgk1* durchgeführt. Der in Abb. 7 gezeigte Äquivalenzbereich für die Gene *fucT3* und *fucT5* stellte allerdings sicher, dass das System für eine Erfassung der Expression sensitiv genug wäre, da beide Gene noch in einer Konzentration von 1 attomol / μ l nachgewiesen werden können.

1.4 Validierung der Amplifikationsdynamik des semiquantitativen RT-PCR-Meßsystems

Zur Validierung der Amplifikationsdynamik wurden konstante Mengen einer DNA-Matrize mit konstanten Kompetitor-Konzentrationen in der ermittelten Äquivalenz-Konzentration (Tabelle 4) koamplifiziert und die erhaltenen DNA-Fragmente nach einer unterschiedlichen Anzahl von PCR-Amplifikationszyklen densitometrisch ausgewertet (Abb. 8).

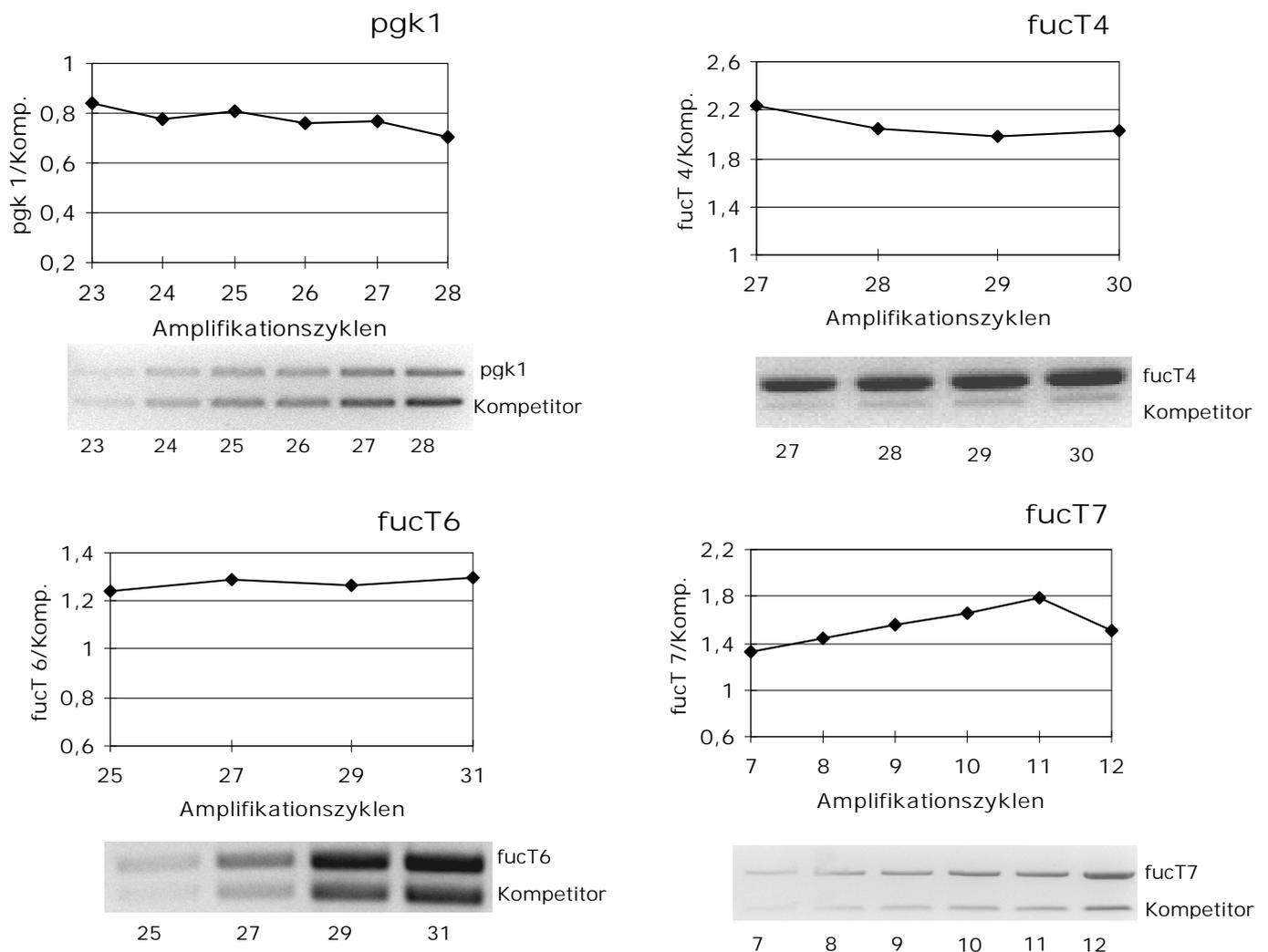


Abbildung 8: Validierung der Amplifikationsdynamik

Konstante Mengen einer DNA-Matrize (cDNA aus der Zelllinie NB4) wurden mit konstanten Kompetitor-Konzentrationen (Äquivalenz-Konzentration) koamplifiziert und die erzeugten DNA-Fragmente nach den angezeigten Amplifikationszyklen densitometrisch erfasst und ausgewertet. In den Diagrammen ist der Quotient aus den Meßwerten der jeweiligen Gen-Fragmente und des koamplifizierten Kompetitors gegen die Anzahl der durchgeführten PCR-Zyklen aufgetragen.

Die Diagramme in Abb. 8 zeigen, dass das Ziel-Gen und der dazugehörige DNA-Kompetitor mit annähernd gleicher Effizienz amplifiziert wurden. Dadurch war sichergestellt, dass semi-quantitative Expressionsanalysen, die mit dem gewählten RT-PCR-Meßsystem gemessen werden, *unabhängig* von der Anzahl der durchgeführten PCR-Zyklen zu homogenen Messergebnissen führen.

Aus den analysierten Messdaten wurde zusätzlich die Intra-Assay-Variabilität (SD vom Mittelwert in %) der einzelnen DNA-Kompetitoren ermittelt, die für die Gene *fucT4*, *fucT6* sowie *pgk1* unter 5%, für das Gen *fucT7* unter 8% lag. Diese relativ niedrige Intra-Assay-Variabilität belegt eine ausreichende Reproduzierbarkeit des semiquantitativen RT-PCR-Meßsystems.

1.5 Validierung der Konzentrationsabhängigkeit der kompetitiven RT-PCR

Die Validierung der Konzentrationsabhängigkeit der DNA-Kompetitoren sollte abschließend zeigen, wie empfindlich das RT-PCR-Meßsystem auf Veränderungen in der Anfangskonzentration der gewünschten DNA-Fragmente im Reaktionsansatz reagieren kann. Zu diesem Zweck wurden eine konstante Kompetitorkonzentration (im Äquivalenzbereich des jeweiligen Kompetitors) mit unterschiedlichen Konzentrationen an DNA-Matrizen (cDNA aus der Zelllinie NB4) koamplifiziert und die Messergebnisse densitometrisch ausgewertet (Abb. 9).

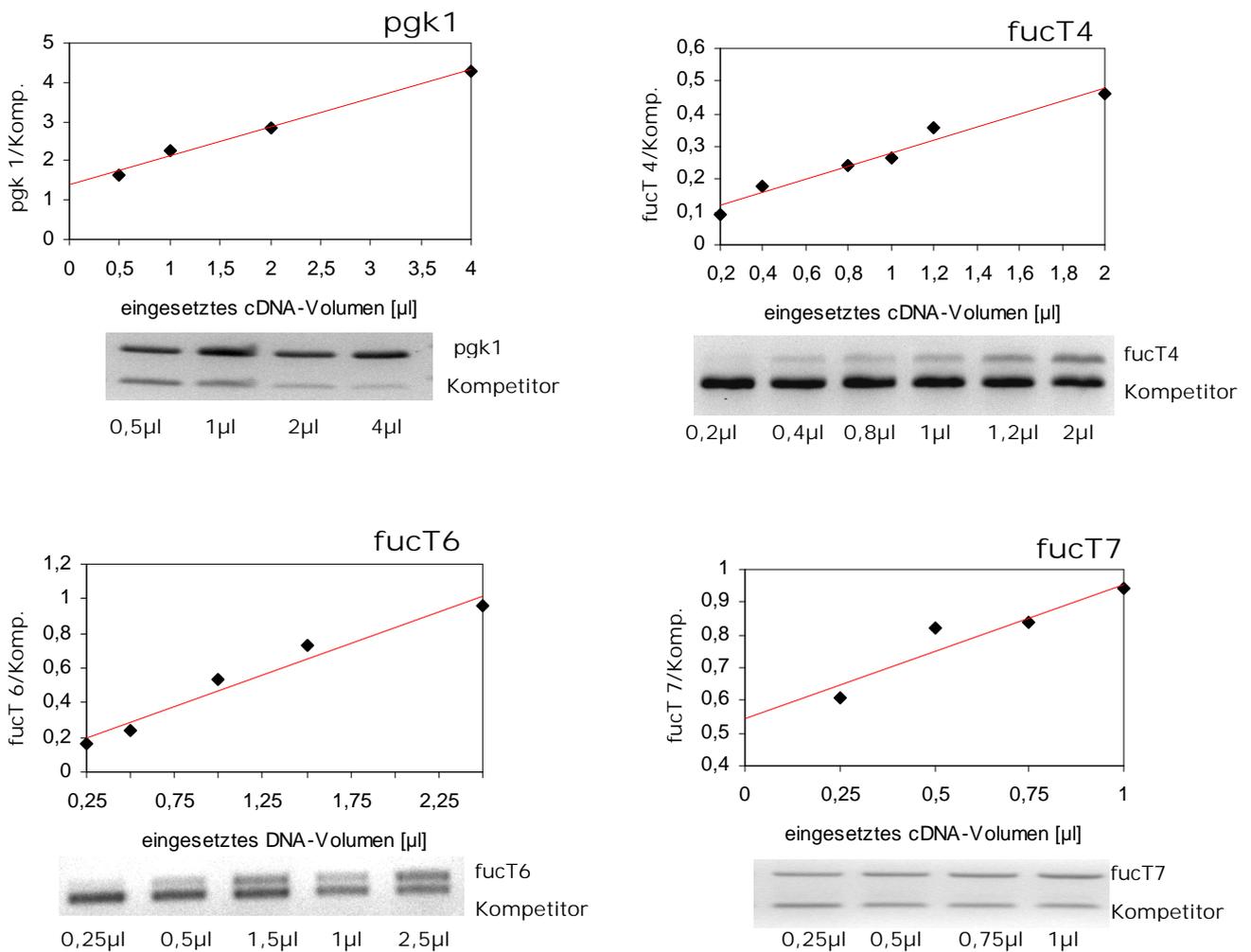


Abbildung 9: Konzentrationsabhängigkeit der heterologen DNA-Kompetitoren

Für jeden Ansatz wurde die in Abschnitt 1.3 ermittelte Äquivalenzverdünnung des Kompetitors mit unterschiedlichen Konzentrationen einer cDNA-Matrize [Ausgangskonzentration 1µg/µl] aus der Zelllinie NB4 koamplifiziert. In den Diagrammen sind die korrigierten Messwerte für die Gene *fucT4*, *fucT6*, *fucT7* und *pgk1* und die lineare Regressionsgerade aufgetragen.

Die Auswertung der in Abb. 9 dargestellten Diagramme zeigt, dass die Sensitivität des etablierten semiquantitativen RT-PCR-Meßsystems ausreichend ist, um relevante Unterschiede in der Expression der untersuchten Gene darzustellen. Die Ratio der Bandenintensität nimmt dabei nahezu linear mit der eingesetzten cDNA-Menge zu. Damit können die kompetitiven RT-PCR-Messungen in den überprüften Bereichen verwendet werden, ohne dass jeweils eine neue Titration des Kompetitors durchgeführt werden muss.

2. Nachweis der Genexpression von $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferasen in Magenkarzinom-Zelllinien

Unter Verwendung der in Abschnitt 1 beschriebenen semiquantitativen RT-PCR wurde das relative Expressionsprofil der drei $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferase-Gene *fucT4*, *fucT6*, *fucT7* in Korrelation zu der gleichzeitig vermessenen Expression des Haushaltsgens *pgk1* in den humanen Magenkarzinom-Zelllinien **Hs 746T**, **RF-48**, **AGS**, **KatoIII**, **N87**, **SNU-1**, **SNU-5**, **SNU-16** sowie der promyelotischen Zelllinie **NB4** als Positiv-Kontrolle detektiert. Die Expression der beiden $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferase-Gene *fucT3* und *fucT5* wurde durch qualitative RT-PCR bestimmt.

2.1 Qualitativer Nachweis der mRNA-Expression der $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferase-Gene *fucT3* und *fucT5*

Der qualitative RT-PCR-Nachweis von *fucT3* und *fucT5* erfolgte entsprechend dem in Kapitel III, 3.2.15 beschriebenen Standardprotokoll

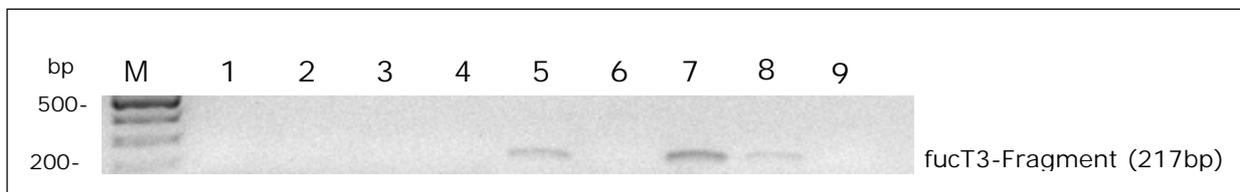


Abbildung 10: Genexpression von *fucT3*

Der qualitative RT-PCR-Nachweis der *fucT3*-Expression erfolgte nach den Standardprotokollen aus zwei unabhängig voneinander isolierten RNA-Präparationen. Nur ein Experiment ist exemplarisch dargestellt. Spur 1: RF-48; Spur 2: SNU-1; Spur 3: Hs 746T; Spur 4: AGS; Spur 5: KatoIII; Spur 6: SNU-5; Spur 7: SNU-16; Spur 8: N87; Spur 9: NB4. Spur M: 100 bp DNA-Leiter.

In den Zelllinien KatoIII, SNU-16 sowie N87 war qualitativ ein Expressions-Signal *fucT3*-Gens nachweisbar. Die detektierte Signalhöhe (mRNA-Expression) war allerdings für eine semiquantitative Quantifizierung zu niedrig (Abb. 10).

Ein mRNA-Signal des *fucT5*-Gens wurde in keiner der analysierten cDNAs nachgewiesen (Daten nicht dargestellt).

In beiden Versuchsreihen diente eine mitgeführte Kontroll-Reaktion mit genomischer DNA aus der Zelllinie NB4 als Positiv-Kontrolle. Damit wurde sichergestellt, dass ein fehlerhafter PCR-Messansatz nicht fälschlicherweise als „nicht vorhandene“ mRNA-Expression interpretiert wurde.

2.2 Semiquantitativer Nachweis der mRNA-Expression der $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase-Gene *fucT4*, *fucT6* und *fucT7* im Vergleich zum Haushaltsgen *pgk1*

Das relative Expressionsprofil der drei $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase-Gene *fucT4*, *fucT6* und *fucT7* wurde aus den oben genannten acht Magenkarzinom-Zelllinien und der promyelotischen Zelllinie NB4 als Positiv-Kontrolle erstellt. Die densitometrisch erfassten PCR-Signale wurden jeweils anhand der parallel gemessenen Expression des Haushaltsgens *pgk1* normalisiert und als Balkendiagramm dargestellt (Abb. 11).

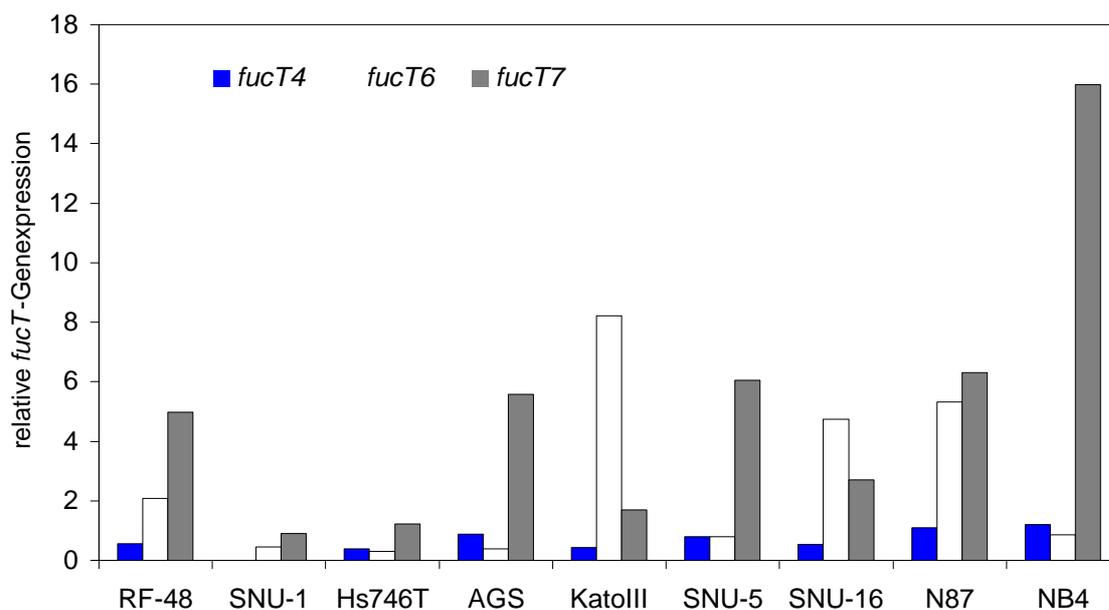


Abbildung 11: Darstellung der relativen mRNA-Expression von *fucT4*, *fucT6* und *fucT7* in Magenkarzinom-Zelllinien und der Zelllinie NB4

Die densitometrisch erfassten PCR-Signale der $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase-Gene wurden für jede Zelllinie quantifiziert und mit Hilfe der parallel gemessenen mRNA-Expression des Haushaltsgens *pgk1* normalisiert. Als Referenz (Positiv-Kontrolle) wurde die Zelllinie NB4 gemessen. Eine mitgeführte Negativ-Kontrolle (Ansatz ohne cDNA-Matrize) stellte sicher, dass keine falsch positive Genexpression nachgewiesen wurde.

In Ergänzung zu den Ergebnissen der qualitativen RT-PCR-Messung für die Gene *fucT3* und *fucT5* zeigte die semiquantitative Analyse der Gene *fucT4*, *fucT6* und *fucT7*, dass sowohl die getesteten Magenkarzinom-Zelllinien als auch die Referenz-Zelllinie NB4 in allen Fällen mindestens zwei der fünf untersuchten $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferase-Gene exprimieren. Dies betraf die Gene *fucT6* und *fucT7*, wobei die transkriptionelle Expression im relativen Vergleich der Zelllinien untereinander eine ausgeprägte Heterogenität zeigte. Das mRNA-Signal des *fucT4*-Gens war mit einer Ausnahme (SNU-1) in allen untersuchten Zelllinien in vergleichbarer Stärke nachweisbar und wird nur schwach exprimiert. In der Zelllinie SNU-1 konnte unter den angewendeten Versuchsbedingungen kein *fucT4*-Signal nachgewiesen werden. Damit wurde erstmals eine Magenkarzinom-Zelllinie beschrieben, die zumindest auf Transkriptionsebene kein *fucT4* exprimiert. SNU-1 ist auch die einzige der untersuchten Zelllinien die ausschließlich *fucT6* und *fucT7* exprimiert. Interessanterweise ist das relative mRNA-Expressionsprofil der beiden Zelllinien AGS und SNU-5 nahezu identisch, so dass die Oberflächenanalyse sowie die funktionelle Charakterisierung dieser Zelllinien dabei helfen könnte, einen möglichen Zusammenhang zwischen der *fucT*-Genexpression und dem daraus resultierenden funktionellen Phänotyp (E-Selektin-Bindung) zu validieren.

3 Einfluss der Fucosyltransferasen auf die E-Selektin vermittelte Zelladhäsion

Um zu überprüfen, ob u.a die heterogene Expression der *fucT6* und *fucT7*-Gene möglicherweise zu funktionellen Phänotypen führt, wurde deshalb in den folgenden Experimenten die Expression relevanter Glykane auf der Zelloberfläche der acht Magenkarzinom-Zelllinien und der promyelotischen Zelllinie NB4 qualitativ charakterisiert und mit der Adhäsion der Zellen an E-Selektin verglichen.

3.1 Flowzytometrische Charakterisierung fucosylierter Zelloberflächen-Glykane

Das Epitop sialyl Lewis^x wurde mit dem mAK KM93 detektiert, sialyl Lewis^a mit KM231 und Lewis^x mit C3D-1. Mit Hilfe der Isotypkontrollen MOPC-21 (IgG1) und MOPC-104E (IgM) wurde die Spezifität der Messung validiert. Der Einsatz von mAK W6/32 zur Detektion des Epitops HLA Klasse Klasse-I dokumentiert die Integrität der Messung und diente als positive Kontrolle (Abb. 12).

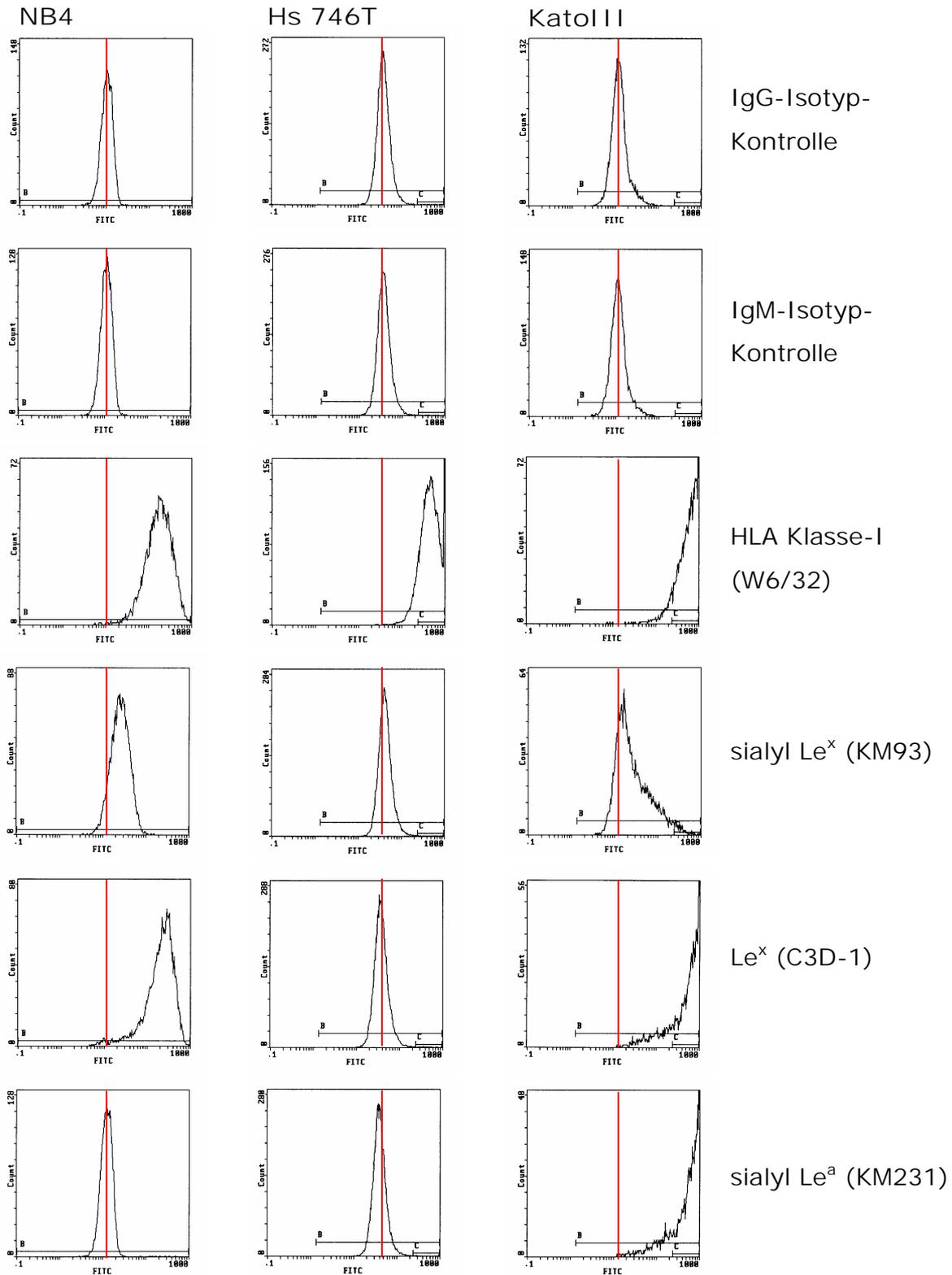


Abbildung 12: Detektion fucosylierter Oberflächen-Epitope auf der Zelllinie NB4 und diversen Magenkarzinom-Zelllinien.

Die Oberflächen-Expression fucosylierter Glykane wurde in acht Magenkarzinom-Zelllinien und der Referenz-Zelllinie NB4 flowzytometrisch validiert. Die analysierten Epitope sind rechts von den Diagrammen aufgelistet. Die Daten sind als Histogramme der logarithmisch aufgetragenen Fluoreszenzintensität (x-Achse) dargestellt und repräsentieren wenigstens zwei unabhängige Experimente. Die vertikale Markierung gibt die mittlere Fluoreszenzintensität der Isotyp-Kontrollen (Null-Linie) wieder.

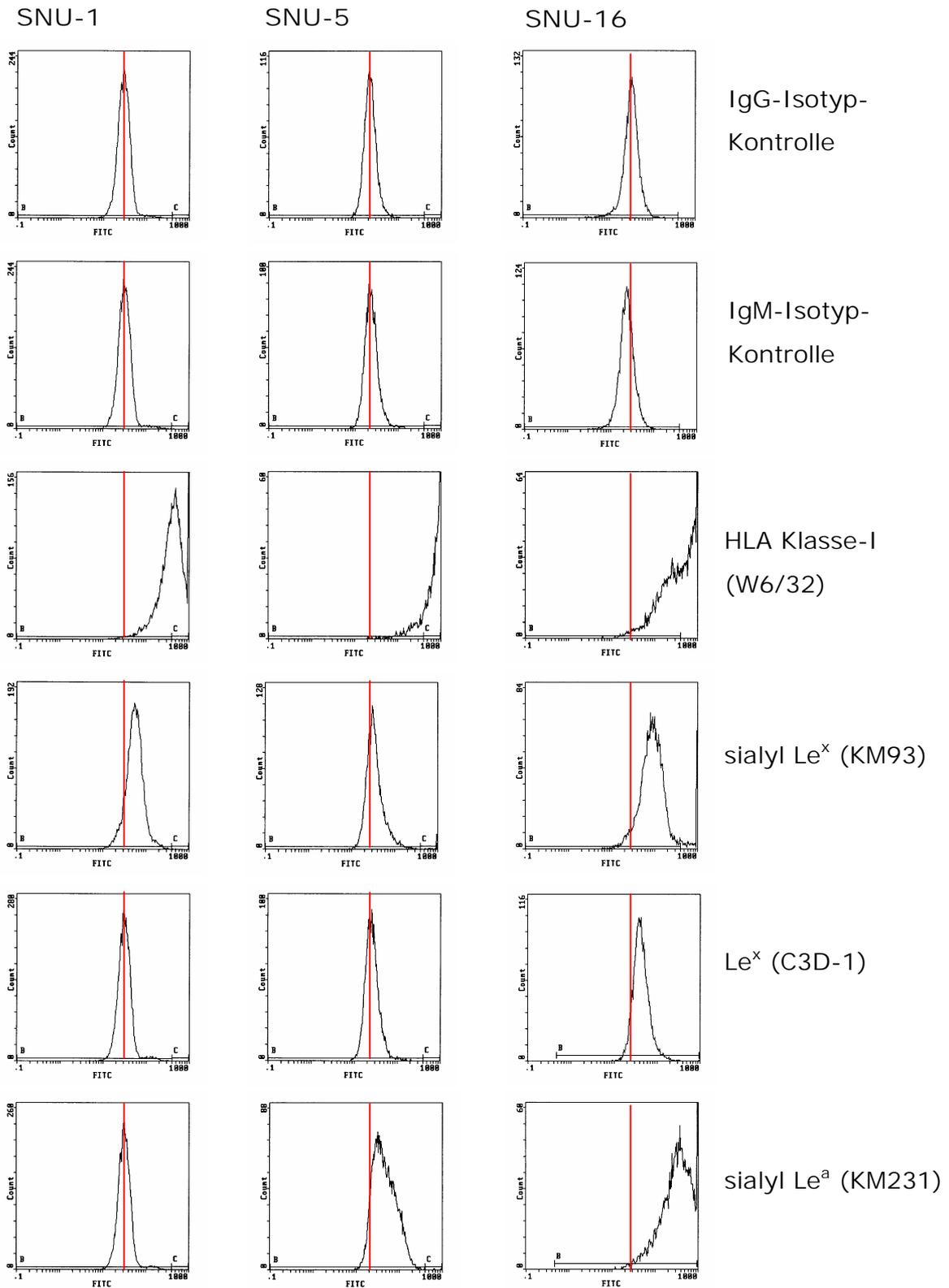


Abbildung 12: Fortsetzung

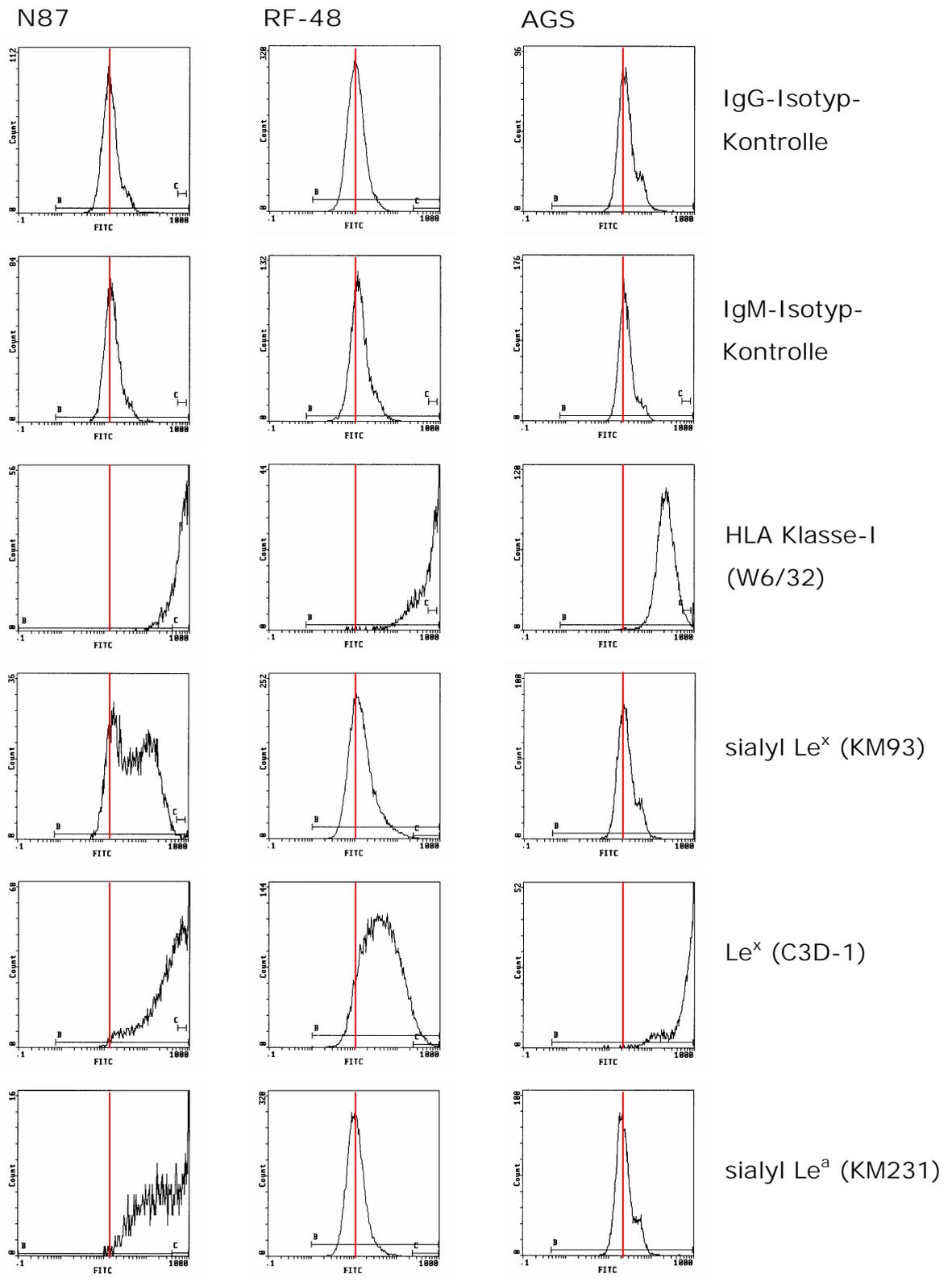


Abbildung 12: Fortsetzung

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse summarisch wiedergegeben. Als positiv (+) wurden die Messungen gewertet, deren Fluoreszenzintensität *größer* als die der parallel vermessenen Isotypkontrollen war, d. h. das Mess-Signal lag rechts von der vertikalen Markierungslinie in den Diagrammen von Abb. 12.

Tabelle 5: Oberflächenanalyse von acht Magenkarzinom-Zelllinien sowie der Zelllinie NB4

Zelllinie	HLA Klasse-I (W6/32)	Lewis^x (C3D-1)	sialyl Lewis^x (KM93)	sialyl Lewis^a (KM231)
NB4	+	+	+	-
Hs 746T	+	-	-	-
KatoIII	+	+	+	+
SNU-1	+	-	+	-
SNU-5	+	-	-	+
SNU-16	+	+	+	+
N87	+	+	+	+
RF-48	+	+	-	-
AGS	+	+	-	-

Während die promyelotische Zelllinie **NB4** nur sialyl Lewis^x (KM93) und Lewis^x (C3D-1) exprimiert, konnten auf den Tumor-Zelllinien **N87**, **SNU-16** und **KatoIII** alle drei untersuchten fucosylierten Zelloberflächen-Glykane sialyl Lewis^x (KM93), Lewis^x (C3D-1) und sialyl Lewis^a (KM231) nachgewiesen werden.

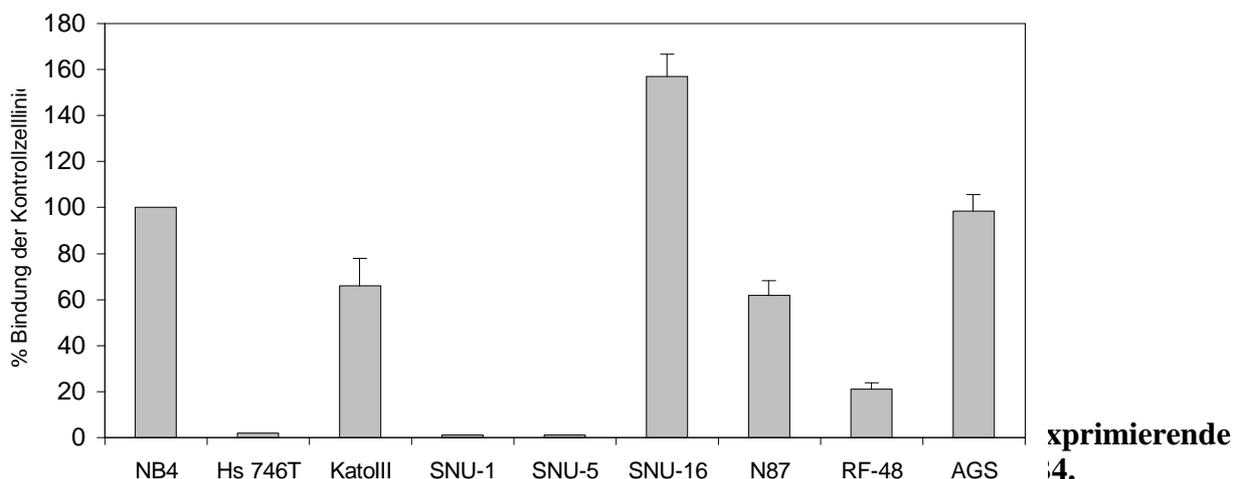
Auf **SNU-1** war ausschließlich eine (schwache) sialyl Lewis^x (KM93)-Expression zu detektieren, **SNU-5** exprimiert nur das sialyl Lewis^a Epitop (KM231).

Bei den Zelllinien **RF-48** und **AGS** ließ sich nur das Lewis^x (C3D-1) Epitop nachweisen, während die Zelloberfläche von **Hs 746T** für *keines* der analysierten fucosylierten Glykane ein detektierbares Fluoreszenzsignal ergab.

Der positive Nachweis des humanen Epitops HLA Klasse-I (W6/32) auf allen untersuchten Zelllinien bestätigte die Integrität der Messung.

3.2 Zelladhäsion an E-Selektin

Um die Expression der detektierten Oberflächenantigene mit der E-Selektin Bindungsfähigkeit zu korrelieren, wurden die acht Magenkarzinom-Zelllinien gemeinsam mit der promyelotischen Zelllinie NB4 als Positiv-Kontrolle in einem funktionellen E-Selektin-Bindungsassay untersucht. Die Messdaten wurde aus fünf voneinander unabhängigen Adhäsionsmessungen an E-Selektin exprimierenden CHO-Zellen (CHO-E) ermittelt. Jeder Messwert wurde dabei mit der parallel untersuchten unspezifischen Adhäsion an P-Selektin exprimierenden CHO-Zellen (CHO-P) korrigiert. Die einzelnen Messwerte wurden auf die Bindung von NB4 an E-Selektin bezogen, die als 100% Adhäsion gewertet wurde. Adhäsionswerte kleiner als 5% der Referenz NB4 wurden als „keine E-Selektin vermittelte Zelladhäsion“ beurteilt (Abb. 13).



Die Messdaten wurde aus fünf parallelen Messungen an CHO-E ermittelt, wobei jeder Messwert mit der gleichzeitig vermessenen unspezifischen Adhäsion an CHO-P korrigiert wurde. Die Adhäsion von NB4 an CHO-E wurde als 100% gewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte der fünf Messungen sowie die entsprechende Standardabweichung.

Bezogen auf die Referenz-Adhäsionsdaten von **NB4** (100%) zeigten die drei Zelllinien **Hs 746T**, **SNU-1** und **SNU-5** keine nachweisbare Adhäsion an E-Selektin unter den gewählten Versuchsbedingungen. Fünf der acht untersuchten Magenkarzinom-Zelllinien wiesen dagegen spezifische Bindung an das exprimierte E-Selektin der CHO-Zellen in unterschiedlicher Intensität auf: **RF-48** bindet im Vergleich zu NB4 mit 21,2% ($\pm 2,7$), **N87** mit 61,8% ($\pm 6,4$) und **Kat0III** mit 66% (± 12). **AGS** adhärirt mit nahezu gleicher Effizienz wie NB4 (98,4% $\pm 7,3$), während **SNU-16** mit 157% ($\pm 9,7$) die stärkste E-Selektin vermittelte Bindung aufweist.

3.3 Zelladhäsionsblockade durch spezifische Antikörper fucosylierter Zelloberflächen-Glykane

Die mögliche Abhängigkeit der E-Selektin-Adhäsion der Zelllinien NB4, KatoIII, SNU-16, N87, RF-48 und AGS von den Epitopen Lewis^x (C3D-1), sialyl Lewis^x (KM93) und sialyl Lewis^a (KM231) sollte durch ein Antikörper-Blockade-Experiment validiert werden. Zu diesem Zweck wurden die E-Selektin-bindenden Zelllinien mit spezifischen Antikörpern inkubiert und die verbleibende Adhäsion an E-Selektin vermessen. Die Adhäsion nach Blockade mit HLA Klasse-I (W6/32) wurde als Negativ-Kontrolle bestimmt. Da es aufgrund der Antikörperfixierung nicht möglich war, die Adhäsion der "blockierten" Magenkarzinom-Zelllinien mit Hilfe des enzymatischen Nachweissystems zu quantifizieren, wurde die Effektivität der spezifischen Antikörperblockade qualitativ durch mikroskopische Auswertung der Zelladhäsionsplatten beurteilt (Tabelle 6).

Tabelle 6: E-Selektin vermittelte Adhäsion der Zelllinien NB4, KatoIII, SNU-16, N87, RF-48 und AGS nach spezifischer Blockade mit mAK.

Die Zelllinien wurden mit unterschiedlichen mAK blockiert und die E-Selektin vermittelte Adhäsion im Vergleich zu einem HLA Klasse-I blockierenden mAK (W6/32) gezeigt. + bedeutet eine Verringerung der Adhäsion im Vergleich zu W6/32-Proben; - bedeutet keine sichtbare Veränderung der Adhäsion an E-Selektin.

Zelllinie	HLA Klasse-I (W6/32)	Lewis ^x (C3D-1)	sialyl Lewis ^x (KM93)	sialyl Lewis ^a (KM231)
NB4	-	+	+	+
KatoIII	-	+	+	+
SNU-16	-	+	+	+
N87	-	+	+	+
RF-48	-	-	-	-
AGS	-	+	-	-

In allen sialyl Lewis^x exprimierenden Zelllinien, die wie in Abschnitt 3.2 dargestellt eine deutliche E-Selektin-Bindung gezeigt haben (NB4, KatoIII, SNU-16, N87), konnte die Adhäsion an CHO-E mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers KM93 reduziert werden. Analog wurde bei allen Lewis^x und sialyl Lewis^a exprimierenden Zelllinien eine Verringerung der E-Selektin-Bindung durch Blockade mit C3D-1 (Lewis^x) und KM231 (sialyl Lewis^a) nachgewiesen. In keinem Fall konnte jedoch eine vollständige Adhäsions-Blockade erreicht werden.

Obwohl bei der Oberflächenanalyse der Zelllinie RF-48 nur Lewis^x (C3D-1) detektiert werden konnte, war eine Reduktion der Zelladhäsion von RF-48 mit Hilfe des mAK C3D-1 nicht zu beobachten. Hingegen wurde die Adhäsion von SNU-16 nach C3D-1-Bindung signifikant reduziert, was die Funktionalität von C3D-1 belegt.

Zusammenfassend war also eine eindeutige Korrelation zwischen der Expression fucosylierter Oberflächenepitope [Lewis^x (C3D-1), sialyl Lewis^x (KM93), sialyl Lewis^a (KM231)] mit der Fähigkeit, unter *low-shear-stress*-Bedingungen an E-Selektin binden zu können, nicht nachweisbar. Die bisherigen Ergebnisse wurden daher durch eine Adhäsionsmessung nach enzymatischer Desialisierung der Zelloberfläche weiterführend analysiert.

3.4 Einfluss der Desialisierung von Zelloberflächen-Glykanen auf die Adhäsion an E-Selektin

Wie in den vorhergehenden Abschnitten beschrieben, hängt die Selektin-abhängige Zelladhäsion von speziellen Liganden ab, die in der Regel sialylierte, fucosylierte Glucosamine als Bindungsgruppen tragen. Um weitere Hinweise über die Selektin-vermittelte Bindung zu erhalten, sollte der Einfluss der korrekten Sialisierung (Modifikation von Glykanen mit $\alpha(2,3)$ gebundener Sialinsäure) auf den funktionellen Phänotyp untersucht werden. Hierfür wurden alle E-Selektin bindenden Zelllinien (NB4, KatoIII, SNU-16, N87, RF-48 und AGS) enzymatisch desialisiert und die Adhäsion an CHO-E-Zellen gemessen. Zur Kontrolle wurde jeweils ein unbehandeltes Aliquot der Enzym-markierten Zellen gemessen und das Ergebnis als 100% Adhäsion definiert. Der Erfolg der Neuraminidasebehandlung (quantitative Desialisierung von sialyl Lewis^x zu Lewis^x und von sialyl Lewis^a zu Lewis^a) wurde flowzytometrisch kontrolliert (siehe Abschnitt 3.1).

Tabelle 7: Spezifische Adhäsion von desialisierten Zelllinien an E-Selektin

Zelllinie	E-Selektin-Bindung <i>nach</i> Desialisierung
NB4	59 %
KatoIII	43%
SNU-16	90%
N87	200 %
RF-48	75%
AGS	keine Änderung

Wie in Tabelle 7 dargestellt, zeigten NB4 und KatoIII eine signifikante Reduktion der E-Selektin Bindung (um ca. 40-60%) nach der Desialisierung der Zelloberfläche, die sich durch eine Reduktion von sialyl Lewis^x zu Lewis^x bei NB4 und KatoIII, sowie von sialyl Lewis^a zu Lewis^a bei KatoIII erklären lassen könnte.

Im Gegensatz dazu konnte die Bindung von SNU-16 nur um 10% reduziert werden, obwohl diese Zellen ebenfalls sialyl Lewis^x und sialyl Lewis^a exprimieren.

Bei der Zelllinie AGS blieb die Adhäsion nach Desialisierung der Oberfläche unverändert in Übereinstimmung mit der flowzytometrischen Oberflächenanalyse, bei der ausschließlich *nicht*-sialisierte Glykane (Lewis^x) detektiert wurden.

Obwohl auf der Oberfläche der RF-48 Zellen ebenfalls nur Lewis^x-Epitope nachgewiesen wurden, verringert sich nach Desialisierung die Adhäsion jedoch um 25%. Diese Daten geben einen Hinweis auf die Expression *sialisierter* Epitope auf der Zelloberfläche von RF-48, die sich offensichtlich von den Epitopen sialyl Lewis^x oder sialyl Lewis^a unterscheiden (siehe Abschnitt 3.3). Schließlich kann es bei der Zelllinie N 87 nach einer Desialisierung der Zelloberfläche nicht zu einer Verminderung, sondern vielmehr zu einer nachhaltigen Erhöhung der E-Selektin vermittelten Zelladhäsion, was bislang nicht erklärt werden kann, da sowohl sialyl Lewis^x als auch sialyl Lewis^a auf der Zelloberfläche der unbehandelten Zelle detektiert werden konnten.

Da durch Desialisierung die Adhäsion an E-Selektin in keiner der getesteten Zelllinien komplett unterdrückt werden konnte, sollte nun in einem künstlichen *fucT*-Expressionsmodell in CHO-Zellen näher untersucht werden, welchen Einfluss bestimmte $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferasen auf die Bereitstellung fucosylierter Oberflächenantigene und das daraus resultierende Adhäsionsverhalten an E-Selektin nehmen..

4 Charakterisierung von *fucT6* und *fucT7* exprimierenden CHO-Zellklonen

4.1 Etablierung von Fucosyltransferase-Gene exprimierenden CHO-Zellklonen

Da wie in Abschnitt 2 dargestellt, nur die mRNA der Gene *fucT6* und *fucT7* in *allen* untersuchten Magenkarzinom-Zelllinien nachweisbar war, und die Expression dieser beiden Gene zudem eine ausgeprägte Heterogenität im Vergleich zu den übrigen $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferasen aufwies, sollte der Einfluss der $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase-Gene *fucT6* und *fucT7* auf die Bereitstellung fucosylierter Oberflächenantigene und den daraus resultierenden funktionellen Phänotyp vergleichend charakterisiert werden. Zusätzlich sollte validiert werden, ob bereits die Expression *eines* $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase-Gens für eine funktionelle Umprogrammierung der Zellen bezüglich ihres Adhäsionsvermögens an E-Selektin ausreichend ist.

Zu diesem Zweck wurden die beiden Gene *fucT6* und *fucT7* mit Hilfe eines RT-PCR-Experimentes aus der cDNA der Zelllinie NB4 isoliert und in den Vektor pCR®II-TOPO kloniert. Die beiden klonierten cDNA-Fragmente wurden anschließend sequenziert und die Richtigkeit durch Genbank-Analysen validiert. Sie zeigten 100% Homologie zu den veröffentlichten humanen *fucT6* (humfut41A) und *fucT7* (hsa13FT) DNA-Sequenzen.

Das Gen *fucT6* wurde durch *EcoRI*-Restriktion aus pCR®II-TOPO-*fucT6* in pIRESneo(+)MCS subkloniert und der daraus entstandene Expressionsvektor pIRESneo-F6 durch Sequenzanalyse auf die korrekte Insertion des *fucT6*-Gens überprüft (Abb. 14).

Das klonierte *fucT7*-Gen wurde durch *BamHI/XhoI*-Restriktion aus dem Vektor pCR®II-TOPO-*fucT7* ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pIRESneo(+)MCS subkloniert.

Die korrekte Insertion und Orientierung des DNA-Fragmentes wurde durch erneute Sequenzanalyse bestätigt. Der entstandene Expressionsvektor wurde als pIRESneo-F7 bezeichnet (Abb. 14).

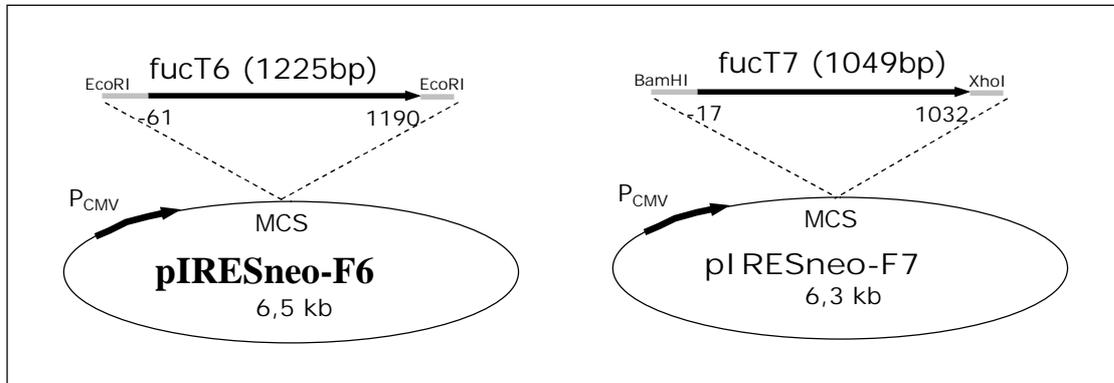


Abbildung 14: Klonierung der beiden Gene *fucT6* und *fucT7* in den Vektor pIRESneo(+)-MCS

Die beiden Gene wurden über die angezeigten Restriktionsschnittstellen in „sense“-Orientierung in die MCS (*multiple cloning site*) des Expressionsvektors subkloniert.

Die drei Vektoren pIRESneo-F6, pIRESneo-F7 sowie pIRESneo(+)-MCS wurden für die Etablierung stabiler CHO-K1-Expressionsklone verwendet die jeweils ein Fucosyltransferase-Gen (*fucT6* oder *fucT7*) exprimieren bzw. den „leeren“ Expressionsvektor als Negativkontrolle beinhalten. Die abgeleiteten stabilen CHO-Zellklone wurden als **CHO-F6**, **CHO-F7** und **CHO-pIRES** bezeichnet. Die Expression der beiden Gene *fucT6* (in CHO-F6) und *fucT7* (in CHO-F7) wurde durch ein qualitatives RT-PCR-Experiment mit CHO-pIRES als Referenz (Negativkontrolle) nachgewiesen (Abb.15).

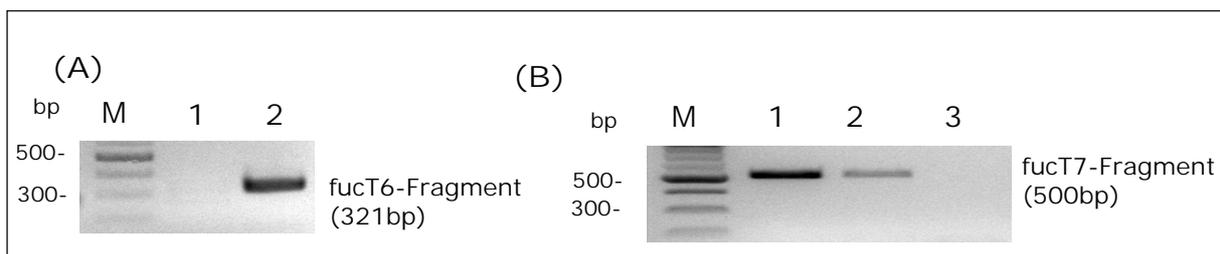


Abbildung 15: RT-PCR-Nachweis von *fucT6* und *fucT7* in CHO-Zellklonen

(A) Spur 1: *fucT6*-Nachweis in der cDNA von CHO-pIRES; Spur 2: *fucT6*-Nachweis in der cDNA von CHO-F6

(B) Spur 1: *fucT7*-Nachweis in der cDNA von NB4; Spur 2: *fucT7*-Nachweis in der cDNA von CHO-F7, Spur 3: *fucT7*-Nachweis in der cDNA von CHO-pIRES.

In der Spur M ist die 100bp DNA-Leiter aufgetragen.

4.2 *FucT6* und *fucT7* gesteuerte Expression fucosylierter Glykane auf der Zelloberfläche von CHO-Zellen

Die flowzytometrische Charakterisierung der Zelloberflächen-Glykane von CHO-pIRES, CHO-F6 und CHO-F7 sollte Aufschluss darüber geben, ob die Expression der Fucosyltransferase-Gene *fucT6* und *fucT7* die Präsentation fucosylierter Glykane auf der Zelloberfläche regulieren kann (Abb. 16).

CHO-K1-Zellen, die mit dem Expressionsvektor pIRESneo(+)MCS transfiziert wurden (CHO-pIRES), exprimierten keine nachweisbaren Mengen der Epitope sialyl Le^x (KM93), sialyl Le^a (KM231) oder Le^x (C3D-1).

Im Klon CHO-F6 war dagegen ein spezifisches Expressionssignal für die beiden Epitope sialyl Le^x (KM93) und Le^x (C3D-1) im Vergleich zu den Isotypkontrollen nachweisbar. Sialyl Lewis^a-Epitope (KM231) wurden von den CHO-F6-Zellklonen nicht exprimiert. Das nicht homogene Signal, das mit dem monoklonalen Antikörper C3D-1 (Lewis^x) bei der Analyse von CHO-F6 auftauchte, deutet möglicherweise auf eine Subpopulation an G418^R CHO-F6 Zellen hin, die das cDNA-Insert des Transformations-Vektors pIRES-F6 exzisiert haben.

Der Zellklon CHO-F7 zeigt ausschließlich eine sialyl Lewis^x –Expression (KM93) während Lewis^x (C3D-1) sowie sialyl Lewis^a (KM231) nicht detektiert werden konnten.

Somit steuerte das ***fucT6*-Gen** die Expression von Le^x (C3D-1) und sLe^x (KM93) auf der Zelloberfläche von CHO-Zellen, während ***fucT7*-Gen** ausschließlich die Expression von Glykanen ermöglichte, die das **sialyl Lewis^x-Epitop** (KM93) tragen.

Keines der beiden $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferasen-Gene war in der Lage, die Synthese der sialyl Lewis^a-Epitope (KM231) zu initiieren.

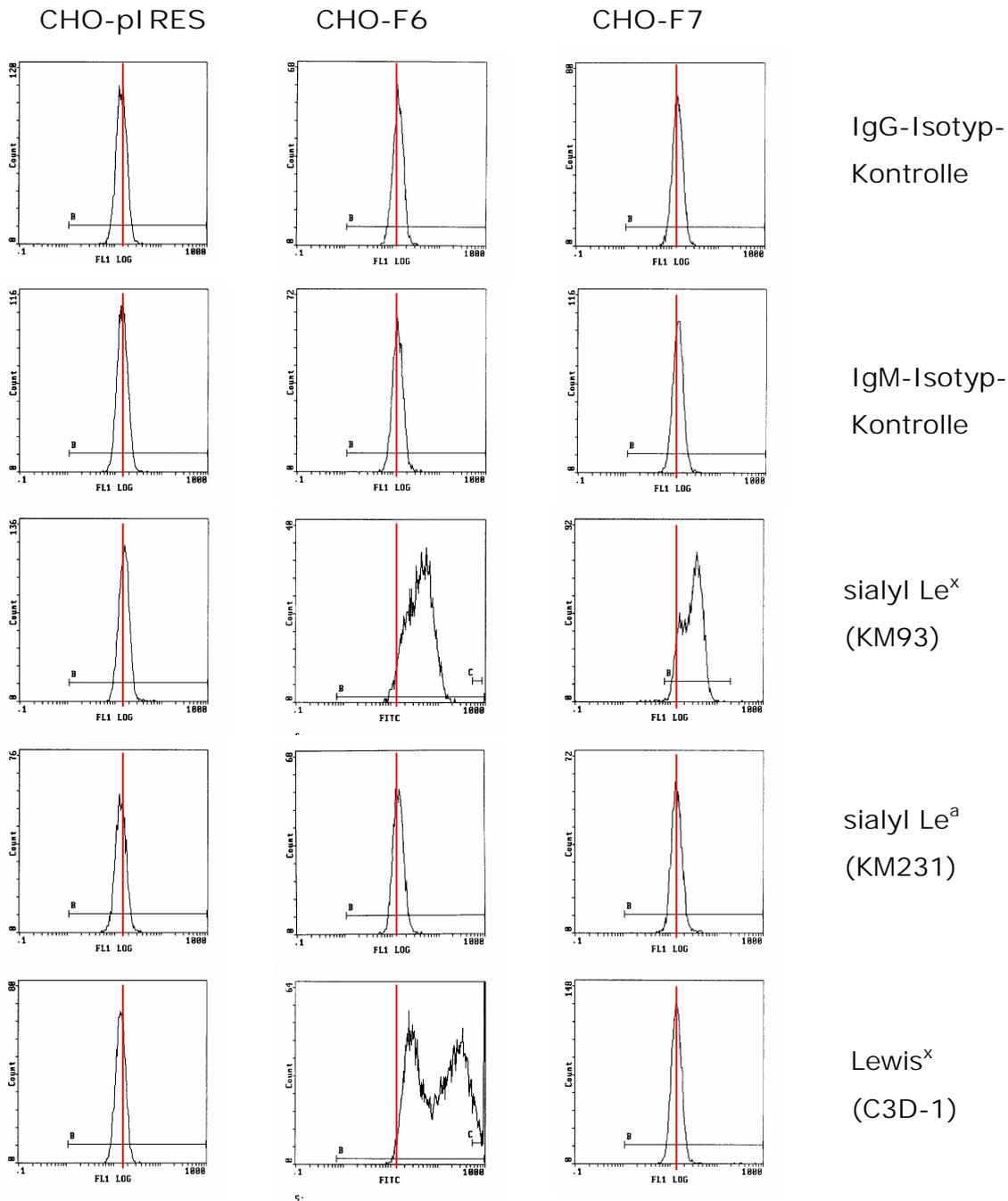


Abbildung 16: Expression von *fucT6* und *fucT7* in Korrelation zur Präsentation fucosylierter Oberflächen-Epitope.

Die Oberflächen-Expression fucosylierter Glykane wurde in den stabilen CHO-K1-Zellklonen flowzytometrisch validiert. Die analysierten Zellklone sind über den Diagrammen, die detektierten Epitope auf der rechten Seite der Diagramme aufgeführt. Die Meßdaten sind als Histogramme der logarithmisch aufgetragenen Fluoreszenzintensität (x-Achse) dargestellt und repräsentieren wenigstens zwei unabhängige Experimente. Die vertikale Markierung gibt die mittlere Fluoreszenzintensität der Isotyp-Kontrollen (Null-Linie) wieder.

4.3 Modifikation von Zelloberflächen-Glykanen der stabilen Zellklone CHO-F6 und CHO-F7 durch Desialisierung

Der Einfluss einer korrekten Sialisierung (Modifikation von Glykanen mit $\alpha(2,3)$ gebundener Sialinsäure) auf die Adhäsion von Zellen an E-Selektin wurde an den etablierten CHO-Zellklonen CHO-F6 und CHO-F7 mittels Desialisierungsexperimente untersucht. Der Effekt der Neuraminidase-Behandlung auf die sialisierten Zelloberflächen-Epitope der Zellklone CHO-F6 und CHO-F7 wurde vor und nach der Desialisierung flowzytometrisch analysiert (Abb. 17).

CHO-F6-Zellklone exprimierten sialyl Lewis^x (KM93) und Lewis^x (C3D-1). Nach der Neuraminidase-Behandlung der Zelloberfläche war sialyl Lewis^x (KM93) nicht mehr nachweisbar, d. h. die Signalhöhe entsprach der der mitgeführten Isotyp-Kontrolle. Die gleichzeitig messbare Intensitätserhöhung des Lewis^x-Signals (*rechts-shift* der logarithmisch dargestellten Kurve in Abb. 17) deutet darauf hin, dass durch die Neuraminidase-Modifikation das sialyl Lewis^x (KM93) auf der Zelloberfläche quantitativ desialisiert wurde und damit zu einem Anstieg an nachweisbaren Lewis^x (C3D-1) geführt hat. Die Isotyp-Kontrollen belegen dabei die Spezifität der Messung.

CHO-F7-Zellen exprimierten *per se* kein Lewis^x. Das sialyl Lewis^x-Signal konnte dagegen mit Hilfe von KM93 nachgewiesen werden (Abb. 17). Nach einer Desialisierung der Zellen (CHO-F7-NA) war das sialyl Lewis^x-Epitop auf der Zelloberfläche nicht mehr nachweisbar, d. h. die Signalhöhe entsprach der der mitgeführten Isotyp-Kontrolle. Zudem konnte auch ein Lewis^x-Signal (C3D-1) detektiert werden, was darauf hindeutet, dass die sialyl Lewis^x-Epitope durch die Desialisierung quantitativ zu Lewis^x- Glykanen umgewandelt wurden.

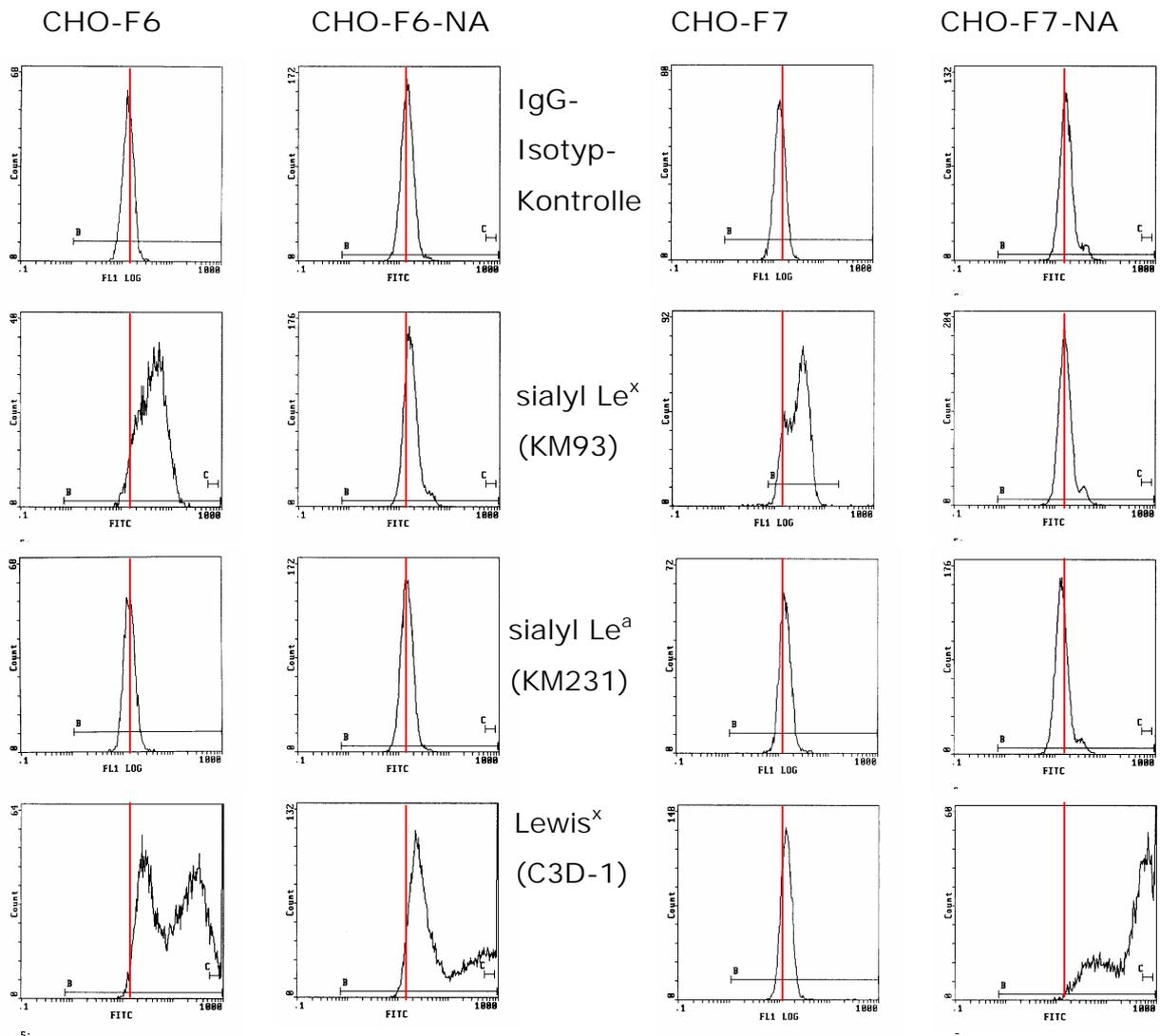


Abbildung 17: Modifikation von Zelloberflächen-Glykanen durch Neuraminidase

Die Veränderung des Zelloberflächen-Profiles nach Neuraminidase-Behandlung (NA) der Zellklone wurde flowzytometrisch vermessen. Die analysierten Zellklone sind über den Diagrammen aufgeführt, die detektierten mAK-Epitope sind in der Mitte zwischen den Diagrammen aufgelistet. Die Daten stellen Histogramme der logarithmisch aufgetragenen Fluoreszenzintensität (x-Achse) dar, und repräsentieren wenigstens zwei unabhängige Experimente. Die vertikale Markierung gibt die mittlere Fluoreszenzintensität der Isotyp-Kontrollen (Null-Linie) wieder.

4.4 Einfluss der Gene *fucT6* und *fucT7* auf die Präsentation funktioneller E-Selektin-Liganden von CHO-Zellen

Um den Einfluss der Fucosyltransferasen-Gene *fucT6* und *fucT7* und zudem den Effekt der korrekten Sialisierung der Zelloberflächen-Glykane auf die Adhäsionseigenschaften von CHO-Zellen an E-Selektin vergleichend analysieren zu können, wurde das *low-shear-stress* Adhäsions-System eingesetzt (Kapitel III, 3.3.6). Hierbei wurde die Bindung der *fucT6* und *fucT7* exprimierenden CHO-Zellklone an die E-Selektin exprimierende CHO-K1-Zelllinie (mit der Bezeichnung CHO-E) im Vergleich zur unspezifischen Adhäsion an P-Selektin exprimierende Zellen (CHO-P) untersucht. Vor der Adhäsionsmessung wurden die zu analysierenden Zellen entsprechend enzymatisch markiert und jeweils ein Aliquot der CHO-F6 und CHO-F7 mit Neuraminidase desialisiert. Die gewählten Versuchsbedingungen orientierten sich an publizierten Vorgaben [Hiraiwa *et al.*, 1996].

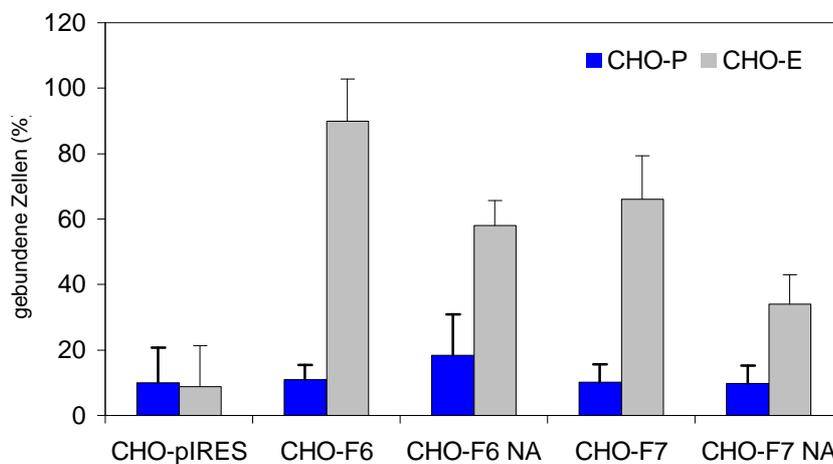


Abbildung 18: Adhäsion von CHO-pIRES, CHO-F6 und CHO-F7 an E-Selektin (CHO-E) und P-Selektin (CHO-P) exprimierende CHO-Zellen

CHO-pIRES, CHO-F6 sowie CHO-F7 wurden entsprechend der Vorschrift enzymatisch markiert und jeweils ein Aliquot mit Neuraminidase behandelt (CHO-F6-NA, CHO-F7-NA). Der Anteil adhätierender Zellen (Angabe in Prozent) wurde für alle untersuchten Zellklone in Bezug auf die maximal mögliche Adhäsion (100%) berechnet. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwert und Standardabweichung aus drei parallelen Messungen.

Wie in Abb. 18 dargestellt, zeigten die Zellklone CHO-F6 und CHO-F7 unter den gewählten Versuchsbedingungen eine starke Bindung an E-Selektin. Die Modifikation der Zelloberflächen-Glykane bewirkte in beiden Fällen (CHO-F6-NA, CHO-F7-NA) eine Reduktion der Zelladhäsion an E-Selektin um ca. 30%. Das verbliebene bzw. neu "erzeugte" Lewis^x (CHO-F7 exprimiert *per se* kein Lewis^x) ist demnach ebenfalls in der Lage eine funktionelle E-Selektin-Bindung auszubilden. Die Spezifität der Bindung in Abhängigkeit von E-Selektin wurde durch die nahezu unveränderte Adhäsion an CHO-P belegt.

Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass sowohl die Expression von *fucT6* als auch die Expression von *fucT7* in CHO-Zellen die Präsentation funktioneller E-Selektin-Liganden ermöglicht. Die Desialisierung der Zelloberfläche führte zu einer Verminderung der Bindungsfähigkeit an E-Selektin und belegt damit indirekt die teilweise Abhängigkeit der E-Selektin Bindung von sialylierten Zuckerstrukturen auf der Zelloberfläche.

4.5 Zelladhäsionsblockade durch spezifische Antikörper fucosylierter Zelloberflächen-Glykane

Die Spezifität der Zelladhäsion der CHO-F6- bzw. CHO-F7-Zellen an E-Selektin wurde abschließend durch entsprechende Antikörper-Adhäsionsblockaden validiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit den monoklonalen Antikörpern KM93 (*anti* sialyl Lewis^x) und C3D-1 (*anti* Lewis^x) inkubiert und die verbleibende Adhäsion an E-Selektin (CHO-E) überprüft (Abb. 19).

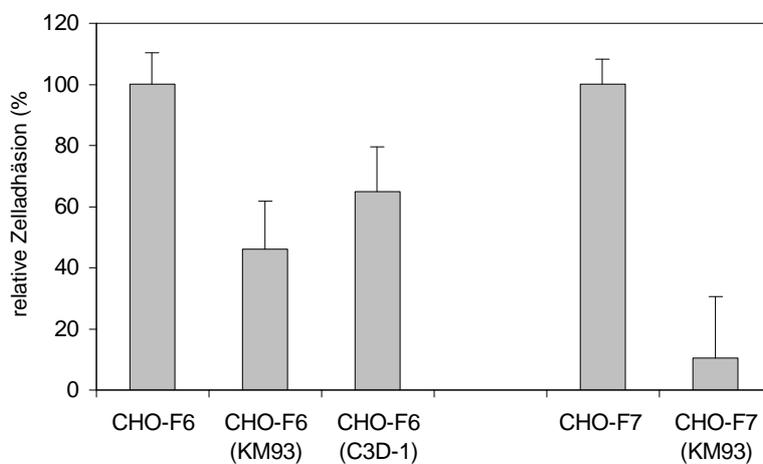


Abbildung 19: Adhäsionsblockade von CHO-F6 und CHO-F7 an E-Selektin (CHO-E) durch spezifische Antikörper

CHO-F6 und CHO-F7 wurden enzymatisch markiert und mit den monoklonalen Antikörpern KM93 (*anti* sialyl Lewis^x) und C3D-1 (*anti* Lewis^x) inkubiert. Die markierten Zellen wurden fixiert und entsprechend der Anleitung auf Zell-Adhäsionsplatten vermessen. Die Adhäsion von nicht geblockten CHO-F6- und CHO-F7-Zellen wurde als 100% definiert. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwert und Standardabweichung aus drei parallelen Messungen.

Die Adhäsion von CHO-F6-Zellen an E-Selektin konnte durch Blockade der Zellen mit dem monoklonalen Antikörper KM93 (*anti* sialyl Lewis^x) um ca. 50% reduziert werden, während die Blockade der Lewis^x-Epitope (C3D-1) nur zu einer 30%-igen Verminderung der Bindung führte. Die Expression des Fucosyltransferase-Gens *fucT6* kann demnach die Präsentation funktioneller Oberflächenepitope regulieren, mit deren Hilfe die CHO-F6-Zellen funktionell an E-Selektin binden können.

Die E-Selektin vermittelte Adhäsion von CHO-F7-Zellen ließ sich durch eine Blockade mit KM93 (*anti* sialyl Lewis^x) um 90% reduzieren. Auch das *fucT7*-Gen trug demnach zur Synthese funktioneller Zelloberflächenliganden vom sialyl Lewis^x-Typ (KM93) bei, mit deren Hilfe eine Bindung an E-Selektin erreicht werden kann.

V Diskussion

Die klinische Prognose von Tumor-Patienten ist in der Hauptsache vom *Metastasierungspotenzial* des Tumors abhängig und wird nur in wenigen Fällen von der Ausprägung des Primärtumors *per se* beeinflusst. Detaillierte Analysen der Zelloberfläche isolierter Tumorzellen deuten darauf hin, dass maligne Transformationen oftmals von ausgeprägten Veränderungen der Zelloberflächen-Glykanstruktur begleitet sind, die in einigen Fällen mit einem aggressiveren Metastasierungsverhalten und hämatogener Streuung der Tumorzellen korrelieren [Dennis *et al.*, 1987]. Tumorzellen exprimieren dabei häufig Poly-*N*-Acetylglucosamin-Epitope, die ihrerseits einen stark erhöhten Fucosylierungsgrad aufweisen [Ronin, C., 1998]. Diese Poly-*N*-Acetylglucosamin-Epitope vom sialyl Lewis^x-Typ fungieren als Liganden von Adhäsionsmolekülen der Selektin-Familie, wodurch die Adhäsion von Tumorzellen vorwiegend an E-Selektin der vaskulären Endothelzellen als wesentlicher Metastasierungs-schritt ermöglicht wird [Lowe *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 1994; Ito *et al.*, 1997; Wagers *et al.*, 1997]. Die klinische Relevanz von sialyl Lewis^x wurde bereits mehrfach durch Studien belegt, die dieses Epitop als Prognosemarker für die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren bestätigten [Nakamori *et al.*, 1993; Dabelsteen, E., 1996; Nakamori *et al.*, 1997]. Neuere Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass die transkriptionelle Überexpression von $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferasen als „Schlüsselenzyme“ der Biosynthese fucosylierter Oberflächenepitope [Lowe *et al.*, 1990; Wagers *et al.*, 1997; Weston *et al.*, 1999-B; Petretti *et al.*, 2000] in den Zellen des Primärtumors zusätzliche Aussagen über das Metastasierungs-potenzial und die Prognose für die betroffenen Patientengruppe erlauben könnte [Ito *et al.*, 1997; Petretti *et al.*, 1999].

Die Analyse der Expressionsprofile der bisher bekannten fünf $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferase-Gene in acht Magenkarzinom-Zelllinien mit unterschiedlichem Phänotyp und Metastasierungsverhalten war deshalb primärer Gegenstand der vorliegenden Dissertationsarbeit, die zudem zur weiteren Aufklärung des Zusammenhangs zwischen der Präsentation von fucosylierten Tumorzelloberflächen-Epitopen und deren Bindungsfähigkeit an E-Selektin in Abhängigkeit vom Expressionsprofil der detektierten Fucosyltransferase-Gene beitragen sollte.

1 Nachweis der *fucT*-Genexpression in Magenkarzinom-Zelllinien

Im Biosyntheseweg fucosylierter Glykane stellt die terminale $\alpha(1,3)$ -Fucosylierung einen Schlüsselschritt dar, so dass die Expression der fünf $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferasen Einfluss auf die Präsentation fucosylierter Glucosamine auf der Zelloberfläche haben sollte [Fukuda, M., 1994; Lowe, J., 1994; Petretti *et al.*, 2000]. Für den vergleichenden Nachweis der *fucT*-mRNA-Expression wurde neben einem qualitativen Testsystem eine kompetitive RT-PCR mit internen, heterologen DNA-Kompetitoren für die fünf $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase-Gene *fucT3*, *fucT4*, *fucT5*, *fucT6* und *fucT7* sowie das Haushaltsgen *pgk1* erstmals in unserem Labor etabliert. Die heterologen DNA-Kompetitoren wurden aus exogenen DNA-Fragmenten synthetisiert, die benötigten Äquivalenzbereiche austitriert und die Linearität der Koamplifikation im erforderlichen Konzentrationsbereich nachgewiesen. Da sowohl die gewünschte *target* cDNA als auch der zugehörige DNA-Kompetitor mit nur einem Primerpaar im gleichen Reaktionsgefäß amplifiziert wurden, war eine Validierung der exponentiellen Amplifikationsphase der PCR-Reaktion nicht notwendig [Becker-Andre *et al.*, 1989; Becker-Andre, M. 1993]. Mit Hilfe dieser Messmethodik konnte nun ein möglicher Zusammenhang zwischen der Expression relevanter *fucT*-Gene, dem erstellten Oberflächenprofil fucosylierter Epitope und dem daraus resultierenden E-Selektin bindenden Phänotyp überprüft werden.

Sowohl alle untersuchten Magenkarzinom-Zelllinien als auch die promyelotische Referenz-Zelllinie NB4 exprimierten mindestens zwei (*fucT6* und *fucT7*) der fünf $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferasen, wobei die transkriptionelle Expression dieser beiden Gene eine ausgeprägte Heterogenität aufwies. *fucT3*-Expression war in drei (KatoIII, SNU-16, N87) von acht Magenkarzinom-Zelllinien qualitativ nachweisbar, während *fucT5* in keiner Zelllinie detektiert werden konnte. Mit nur einer Ausnahme (SNU-1) wurde *fucT4* in allen anderen Zelllinien in vergleichbarer Stärke exprimiert. Die nachfolgend analysierten Daten zur Präsentation der Zelloberflächenepitope und Adhäsion waren demnach durch wenigstens zwei $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferasen determiniert.

In keinem Fall konnte jedoch eine Korrelation zwischen dem Phänotyp der Tumor-Zelllinie bzw. ihrem Metastasierungsverhalten *in vivo* (siehe Kapitel III, Abschnitt 2.2.5) und dem jeweiligen *fucT*-Expressionsprofil eruiert werden.

2 Adhäsion von Magenkarzinom-Zelllinien an E-Selektin in Korrelation zur Präsentation von fucosylierten Zelloberflächen-Glykanen

E-Selektin wird nach spezifischer Aktivierung der Endothelzellen durch Zytokine und andere lösliche Mediatoren für ca. 24h auf der Zelloberfläche präsentiert und ist für die Rekrutierung von Entzündungs- und metastasierenden Tumorzellen aus dem Blutstrom verantwortlich. Die Bindung zwischen E-Selektin und seinen Liganden wird sehr schnell ausgebildet und muss ausreichend stark sein, um die mobilen Zellen auch gegen die physikalischen Scherkräfte des Blutstroms abbremsen zu können [Maly *et al.*, 1996]. Unter diesen Gesichtspunkten wurde in der vorliegenden Arbeit eigens ein *in vitro*-Adhäsionsmodell etabliert, welches die Analyse von E-Selektin abhängigen Adhäsionsprozessen unter der Einwirkung von geringen Scherkräften (*low-shear-stress*-Modell) ermöglicht.

Die Analyse der E-Selektin vermittelten Adhäsion der acht Magenkarzinom-Zelllinien zeigte im Vergleich zur promyelotischen Zelllinie NB4 eine ausgesprochene Heterogenität im Adhäsionsverhalten an E-Selektin, die jedoch unabhängig vom Phänotyp (epithelial, sphäroid), dem Wachstumsverhalten (Suspensionskultur, adhärentes Wachstum) und der *in vivo*-Metastasierungseigenschaft der jeweiligen Zelllinie waren. Bezogen auf die Referenz-Zelllinie NB4, deren Adhäsion als 100% gewertet wurde, konnten drei unterschiedliche funktionelle Phänotypen unter den gewählten *low-shear-stress*-Versuchsbedingungen differenziert werden:

- a) *keine* Adhäsion an E-Selektin: **Hs 746T**; **SNU-5**; **SNU-1**
- b) *moderate* Adhäsion an E-Selektin (\leq NB4): **RF-48** (21,2% \pm 2,7); **N87** (61,8% \pm 6,4);
KatoIII (66% \pm 12); **AGS** (98,4% \pm 7,3)
- c) *starke* Adhäsion an E-Selektin ($>$ NB4): **SNU-16** (157% \pm 9,7)

Da die Heterogenität im Adhäsionsverhalten an E-Selektin auf Unterschieden in der Expression fucosylierter Glykane auf der Zelloberfläche beruhen könnte, wurden die Adhäsionsdaten mit der flowzytometrisch gemessenen Expression fucosylierter Epitope verglichen. Dabei zeigte sich, dass alle adhärierenden Zelllinien zumindest ein Epitop exprimierten, welches *in vitro* in der Lage ist an E-Selektin zu binden [Varki, A., 1997].

In unseren Experimenten konnte jedoch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Präsentation eines fucosylierten Epitops und der Adhäsion der Zellen an E-Selektin eruiert werden. Die Zelllinie Hs 746T exprimierte z.B. kein nachweisbares sialyl Lewis^a (KM231), sialyl Lewis^x (KM93) oder Lewis^x (C3D-1) und konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen auch nicht an E-Selektin adhären. Im Gegensatz dazu exprimierten SNU-5-Zellen das sialyl Lewis^a-Epitop (KM231) und SNU-1-Zellen das sialyl Lewis^x-Epitop (KM93) – beide waren jedoch ebenfalls *nicht* in der Lage, unter den gegebenen Versuchsbedingungen an E-Selektin zu binden. Daraus lässt sich folgern, dass die Präsenz dieser Epitope *per se* nicht zwingend zur Adhäsion an E-Selektin führt.

Bei den meisten untersuchten Zelllinien, die in unserem experimentellen Ansatz an E-Selektin adhären, konnte die Bindung der Zellen durch spezifische Blockade mit monoklonalen Antikörpern gegen sialyl Le^x (KM93), sialyl Le^a (KM231) und Lewis^x (C3D-1) signifikant reduziert werden, was als weiterer Hinweis auf eine spezifische Beteiligung dieser Epitope am Adhäsionsprozess gewertet werden kann. Andererseits exprimierte die Zelllinie RF-48 Lewis^x (C3D-1) auf der Zelloberfläche – die Adhäsion an E-Selektin war allerdings unabhängig von diesem Epitop, wie durch Blockade-Experimente demonstriert wurde. Überraschenderweise verminderte eine enzymatische Desialisierung der Zelloberfläche jedoch die Adhäsion, obwohl *kein sialyliertes* Oberflächenepitop (KM93, KM231) nachweisbar war. Die von Lewis^x (C3D-1) unabhängige Adhäsion der Zelllinie RF-48 könnte demnach zumindest teilweise von sialisierten Epitopen bewerkstelligt werden, die mit den verwendeten Antikörpern nicht detektiert werden konnten. In diesem Kontext berichteten auch andere Arbeitsgruppen von der Expression fucosylierter Glykane auf Zelllinien, die zumindest *in vitro* nicht an E-Selektin adhären konnten [Wittig *et al.*, 1996; Varki, A., 1997]. Dies legt die Annahme nahe, dass die Bindung an E-Selektin nicht alleine von den beschriebenen fucosylierten Glykanen, sondern zusätzlich von der korrekten weiteren Glykosylierung der Protein- oder Lipid-Trägermoleküle abhängig sein könnte, durch die sie auf der Zelloberfläche präsentiert werden [Phillips *et al.*, 1990; Mulligan *et al.*, 1993; Dabelsteen, E., 1996].

3 Vergleichende Betrachtung von *fucT*-Genexpression, Präsentation fucosylierter Zelloberflächen-Glykane und Zelladhäsion an E-Selektin

FucT3 ist die einzige Fucosyltransferase, die sialyl Lewis^a-Epitope synthetisieren kann [Kukowska-Latallo *et al.*, 1990; Sueyoshi *et al.*, 1994]. Übereinstimmend damit konnten wir sLe^a (KM231) auch nur auf der Zelloberfläche von *fucT3*-mRNA exprimierenden Zellen (KatoIII, N87, SNU-16) nachgewiesen. Eine Ausnahme bildete die Zelllinie SNU-5: sie exprimierte sLe^a auf der Zelloberfläche, obwohl kein mRNA-Signal für *fucT3* messbar war. Da allerdings die *fucT3*-Signale auch in den „positiven“ Zelllinien N87, SNU-16 und KatoIII nur sehr schwach ausgeprägt waren, ist es denkbar, dass eine möglicherweise vorhandene *fucT3*-Expression in SNU-5 unter der Nachweisgrenze des RT-PCR-Meßsystems blieb. Obwohl sialyl Lewis^a von vielen Tumor-Typen exprimiert wird, konnte bisher keine Korrelation mit dem Metastasierungspotenzial nachgewiesen werden [Dabelsteen, E., 1996]. Auch in unserem E-Selektin abhängigen Adhäsionssystem war kein signifikanter Zusammenhang zwischen Präsentation und Bindungsfähigkeit erkennbar. Die E-Selektin-Bindung konnte durch KM231 zwar reduziert werden, sialyl Lewis^a alleine reichte aber offensichtlich nicht aus, um unter *low-shear-stress*-Bedingungen die Adhäsion an E-Selektin zu bewirken. Allerdings muss auch in diesem Fall berücksichtigt werden, dass SNU-5 die sialyl Le^a-Epitope eventuell nicht auf funktionellen Adhäsions-Liganden präsentiert [Varki, A., 1997; Ramos *et al.*, 1998].

Die Genexpression der **FucT4** war mit Ausnahme von SNU-1 in allen untersuchten Zelllinien in vergleichbarer Stärke nachweisbar. Diese generalisierte Expression von *fucT4* in Magenkarzinom-Zelllinien korreliert mit Untersuchungen des mRNA-Glycosyltransferase-Expressionsmusters in humanen Magenkarzinomen sowie gastrointestinalen Zelllinien [Wittig *et al.*, 1996]. Von zwölf untersuchten Glycosyltransferasen, die unmittelbar in die Synthese glykosylierter Zelloberflächen-Liganden involviert sind, konnte im tumorigenen Gewebe von Magenkarzinomen nur eine signifikante Überexpression der Gene *fucT4* und *st3*[GalIV] (Galβ1-3(4)GlcNAc-R α2,3-Sialyltransferase IV) nachgewiesen werden [Petretti *et al.*, 1999; Petretti *et al.*, 2000]. Eine funktionelle Korrelation zwischen der *fucT4*-Expression und der Fähigkeit der Zellen unter *low-shear-stress*-Bedingungen an E-Selektin zu adhären, konnten wir in

unserem Adhäsionsmodell dagegen nicht zeigen. Interessanterweise konnten SNU-5 und Hs746T nicht an E-Selektin binden, obwohl sie im Vergleich zu KatoIII, AGS und SNU-16 vergleichbare *fucT4*-Expressionsniveaus erreichten. Dieser Befund steht möglicherweise in Zusammenhang mit Daten von John Lowe et al., die ein synergistisches Zusammenwirken von FucT4 und FucT7 *in vivo* belegen. Während ein *knock-out* des *fucT4*-Gens im Mausmodell die Adhäsionseigenschaften von Entzündungszellen an stimuliertes Endothel nicht verändert, und *fucT7-knock-out* Mäuse nur eine Verringerung in der Zelladhäsion aufweisen, können die Entzündungszellen nach einem *fucT4 / fucT7* Doppel-*knock-out* nicht mehr an das Endothel adhären [Lowe, J., 1998].

FucT5 scheint keinen Einfluss auf die E-Selektin vermittelte Adhäsion der untersuchten Magenkarzinom-Zelllinien im *in vitro*-Adhäsionsmodell zu haben, da keine der untersuchten Zelllinien *fucT5* exprimiert. Übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Gruppen bleibt die patho/physiologische Funktion von FucT5 damit weiterhin unbeantwortet [Yago *et al.*, 1993]. Neuere Untersuchungen geben jedoch erste Hinweise auf eine Beteiligung von FucT5 bei Rheumatoider Arthritis (RA), da isolierte RA-Fibroblasten eine spezifische Überexpression des *fucT5*-Gens zeigen [Smithers *et al.*, 1998]. Detailliertere Untersuchungen stehen allerdings noch aus.

FucT6 ist neben FucT3 die zweite $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferase, welche die Expression der zwei fucosylierten Glykane sialyl Lewis^x und Lewis^x auf der Oberfläche von Zellen beeinflussen kann. Beide Epitope sind funktionelle E-Selektin-Liganden, wie unsere Adhäsionsexperimente mit einer *fucT6*-exprimierenden CHO-Zelllinie (CHO-F6) gezeigt haben. Die Blockade von CHO-F6 mit KM93 (anti sialyl Le^x) sowie C3D-1 (anti Lewis^x) führte dabei zu einer Reduktion der durch E-Selektin vermittelten Zelladhäsion, was eine direkte Beteiligung dieser fucosylierten Glykane am Adhäsionsprozess demonstriert. In den untersuchten Magenkarzinom-Zelllinien war jedoch ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der *fucT6*-Expression, der Präsentation fucosylierter Epitope und der Adhäsion an E-Selektin nicht klar erkennbar, da die identifizierten Oberflächen-Antigene jeweils auch durch eine andere exprimierte Fucosyltransferase bereitgestellt werden könnten. So war z.B. nicht differenzierbar, ob das sialyl Lewis^x-Signal in KatoIII oder SNU-16 über *fucT6* oder *fucT7*-Expression reguliert wird.

Die Transfektionsexperimente mit CHO-Zellen belegten aber zweifelsfrei, dass zumindest *in vitro* bereits die Expression von *fucT6* ausreicht, um den funktionellen Phänotyp (Induktion der Adhäsionsfähigkeit an E-Selektin) der Zelle verändern zu können. In umgekehrter Weise führte kürzlich eine *Antisense*-vermittelte Deregulation von *fucT6* in Kolonkarzinom-Zelllinien zu einer nachhaltigen Reduktion der Tumorprogression *in vivo* (Mausmodell) [Hiller *et al.*, 2000].

Das Enzym **FucT7** gilt als die wichtigste $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferase bei der Synthese funktioneller E-Selektin-Liganden [Knibbs *et al.*, 1996; Wittig *et al.*, 1996; Wagers *et al.*, 1997]. Entsprechend konnten wir zeigen, dass die Expression von *fucT7* in CHO-Zellen ausreicht, um ihnen einen E-Selektin bindenden Phänotyp zu verleihen. Durch Adhäsions-Blockaden mit KM93 (anti sialyl Lewis^x) ließ sich diese neu gewonnene Funktionalität wieder deutlich reduzieren. Überraschenderweise scheint dagegen das *fucT7*-Expressionsniveau in den diversen Magenkarzinom-Zelllinien nicht mit dem untersuchten Oberflächenprofil der fucosylierten Glykane sowie deren Bindungsfähigkeit an E-Selektin zu korrelieren. So zeigten z.B. AGS-Zellen ein vergleichsweise starkes *fucT7*-mRNA-Signal – auf der Zelloberfläche konnte allerdings kein sialyl Lewis^x nachgewiesen werden. In SNU-5 war ebenfalls ein starkes *fucT7*-Signal detektierbar, wohingegen sLe^x nicht zu belegen war. Obwohl ein direkter Vergleich der relativen mRNA-Expression der beiden Zelllinien AGS und SNU-5 ein nahezu identisches *fucT*-Expressionsprofil erkennen ließ (die Gene *fucT3* und *fucT5* waren nicht nachweisbar bei vergleichbarem Expressionsverhalten von *fucT4*, *fucT6* und *fucT7*), exprimierte AGS nur Lewis^x, während SNU-5 nur sialyl Lewis^a-Epitope trug. Interessanterweise konnten im *low-shear-stress*-Adhäsionsassay die AGS-Zellen an das E-Selektin binden, während dies für SNU-5 nicht möglich war. *In vivo* haben sich dagegen paradoxerweise AGS-Zellen als nicht-metastasierend erwiesen, wohingegen SNU-5-Zellen in den Ascites metastasierten [Park *et al.*, 1990]

4 Fazit und Ausblick

Die von uns und anderen Arbeitsgruppen erhobenen Daten lassen somit den Schluss zu, dass das transkriptionelle Expressionsniveau der fünf $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase-Gene diverser Magenkarzinom-Zelllinien keine zuverlässigen Aussagen über ihre Fähigkeit erlaubt, *in vivo* zu metastasieren oder *in vitro* an E-Selektin zu adhären. Die Präsentation fucosylierter Epitope *per se* ist jedoch von der Expression der *fucT*-Gene abhängig, wobei zumindest in CHO-Zell-experimenten bereits die Expression nur einer $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase ausreichte, um das Oberflächenprofil und die damit verbundenen funktionellen Eigenschaften der Zellen (E-Selektin-Bindung) nachhaltig zu verändern. Diese Daten scheinen insoweit mit den Ergebnissen anderer Forscher zu korrelieren, als jene darauf hindeuten, dass die transkriptionelle Überexpression von spezifischen Glycosyltransferase-Genen in den Zellen des Primärtumors mit dessen Metastasierungspotenzial assoziiert ist [Ito *et al.*, 1997; Petretti *et al.*, 1999]. Auch in allen von uns untersuchten Zelllinien, die eine ausgeprägte Adhäsion an E-Selektin zeigten, war das relative Expressionsniveau einzelner *fucT*-Gene entsprechend erhöht. In diesem Zusammenhang ist es zudem denkbar, dass das in den Zelllinien validierte heterogene Expressionsprofil der *fucT*-Gene mit anderen, hier nicht in Betracht gezogenen Zellfunktionen im Rahmen der Metastasierungsfähigkeit korreliert.

Da fucosylierte Epitope auf Tumorzellen *in vivo* als Liganden der Selektine auf vaskulären Endothelzellen dienen, geht man davon aus, dass sie das Metastasierungsverhalten diverser Tumorarten entscheidend modulieren können [Sasaki *et al.*, 1994; Wagers *et al.*, 1997]. Wie wir zeigen konnten, gibt die Präsenz dieser Epitope *per se* aber keinen Hinweis auf die E-Selektin-Bindungsfähigkeit der Zellen, weshalb die Adhäsion an E-Selektin nicht alleine von den beschriebenen fucosylierten Glykanen, sondern zusätzlich von deren Trägermolekülen abhängig zu sein scheint. Die eingehende Analyse dieser Trägermoleküle sollte demnach weitere wesentliche Einblicke in den Adhäsionsprozess und die damit assoziierte Emigrationsfähigkeit von mobilen Zellen geben können [Varki, A., 1997; Wagers *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1998]. Inwieweit die fucosylierten Epitope sialyl Lewis^x, Lewis^x und sialyl Lewis^a von unterschiedlichen Trägerstrukturen der Tumorzellen in strukturell unterschiedlicher Form präsentiert werden können und damit deren Funktionalität beeinflussen, ist ebenfalls noch

ziemlich unklar. Wagers *et al.* (1997) berichteten z. B. von mehr als sieben Varianten des sialyl Lewis^x-Motifs auf der Zelloberfläche von Leukozyten, die in unterschiedlicher Ausprägung den Adhäsionsprozess zu modulieren scheinen.

Zweifellos sind jedoch zur weiteren Klärung der Funktion der $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferasen im Prozess der Entzündung und Metastasierung zusätzliche Antisense-Modelle vonnöten, mit deren Hilfe der Einfluss der einzelnen FucTs im komplexen Regulationsmechanismus der Zellen analysiert werden könnte. Erste Versuchsreihen sind bereits durchgeführt worden und deuten auf neue Therapie-Möglichkeiten mit Hilfe einer *Antisense*-vermittelten Gentherapie hin [Hiraiwa *et al.*, 1996; Klopocki *et al.*, 1998; Weston *et al.*, 1999-B].

Ob sich darüber hinaus die Entwicklung von sLe^x und sLe^a-Mimetika zur Reduktion der Adhäsion von Entzündungs- und Tumorzellen an vaskuläre Selektine [Phillips *et al.*, 1990; Mulligan *et al.*, 1993; Dabelsteen, E., 1996] als erfolgreiches Therapiekonzept bei Entzündung und/oder Tumor verifizieren lässt, bleibt ebenfalls noch abzuwarten.

VI Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe einer neu etablierten semiquantitativen RT-PCR-Messung das mRNA-Expressionsprofil relevanten $\alpha(1\rightarrow3)$ Fucosyltransferase-Gene in acht Magenkarzinom-Zelllinien validiert und mit der Expression von fucosylierten Zelloberflächen-Epitopen verglichen. Die gemessenen Expressionsprofile wurden anschließend mit dem funktionellen Phänotyp der Zellen korreliert um so Rückschlüsse auf die Beteiligung diskreter Fucosyltransferasen am funktionellen Verhalten von Tumorzellen zu erhalten.

Fucosylierte Glykane vom sialyl Lewis X-Typ, die auf der Zelloberfläche von Tumorzellen präsentiert werden, können als Liganden von E-Selektin fungieren und sind möglicherweise auch an hämatogenen Metastasierungsprozessen beteiligt [Matsura et al., 1998]. Im Biosyntheseweg fucosylierter Glykane stellt die terminale $\alpha(1,3)$ -Fucosylierung einen Schlüsselschritt dar, so dass die (transkriptionelle) Überexpression von $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferasen in den Zellen des Primärtumors, weiterführende Aussagen über das Metastasierungspotenzial sowie die Prognose für die betroffenen Patientengruppe ermöglichen könnte [Ito et al., 1997; Petretti et al., 1999].

VII Literaturverzeichnis

Araki, M., Araki, K., Biancone, L., Stamenkovic, I., Izui, S., Yamamura, K.-I. and Vassalli, P. (1997). The role of E-selectin for neutrophil activation and tumor metastasis in vivo. *Leukemia*, 3, 209-212.

Aruffo, A., Kolanus, W., Walz, G., Fredman, P. and Seed, B. (1991). CD62/P-selectin recognition of myeloid and tumor cell sulfatides. *Cell*, 67, 35.

Barranco, S. C. *et al.* (1983). Heterogenous responses of an in vitro model of human stomach cancer to anticancer drugs. *Invest. New Drugs*, 1, 117-127.

Baumhueter, S. N., Dybdal, C., Kyle, C. and Lasky, L. A. (1994). Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood*, 84, 2554-2565.

Becker-Andre, M. and Hahlbrock, K. (1989). Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Res.*, 17(22), 9437-9446.

Becker-Andre, M. (1993). Absolute levels of mRNA by polymerase chain reaction-aided transcript titration assay. *Methods Enzymol.*, 218, 420-445.

Berg, E. L., Magnani, J., Warnock, R. A., Robinson, M. K. and Butcher E. C. (1992). Comparison of L-selectin and E-selectin ligand specificities: the L-selectin can bind to the E-selectin ligands sialyl Le^x and sialyl Le^a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184, 1048.

Beum, P. V., Singh, J., Burdick, M., Hollingsworth, M. A. and Cheng, P. W. (1999). Expression of core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase in a human pancreatic cancer cell line results in altered expression of MUC1 tumor-associated epitopes. *J. Biol. Chem.*, 274 (35), 24641-24648.

Bevilacqua, M. P. and Nelson, R. M. (1993). Selectins. *J. Clin. Invest.* 91, 379-387.

Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid Res.* 377, 385-386.

- Brandley, B. K., Kiso, M., Abbas, S., Nikrad, P., Srivastava, O., Foxall, C., Oda, Y. and Hasegawa, A. (1993). Structure function studies on selectin carbohydrate ligands. Modifications to fucose, sialic acid and sulphate as a sialic acid replacement. *Glycobiology*, 3, 633-639.
- Bresalier, R. S., Ho, S. B., Schoeppner, H. L., Kim, Y. S., Sleisenger, M. H., Brodt, P. and Byrd, J. C. (1996). Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis. *Gastroenterology*, 110, 1354-1367.
- Burke, M., Weyrich, A., Zhong-Li, Z., Gaeta, F., Forrest, M. and Lefer, A. (1994). Sialyl Lewis X containing oligosaccharide attenuates myocardial reperfusion injury in cats. *J. Clin. Invest.*, 93, 1140-1147.
- Butcher, E. C. and Picker, L. J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, 272, 60-66.
- Chandrasekaran, E. V., Rakesh, K. J., Larsen, R. D., Wlasichuk, K., DiCioccio, R. A. and Matta, K. L. (1996). Specificity analysis of three clonal and five non-clonal α 1,3-L-fucosyltransferases with sulfated, sialylated or fucosylated synthetic carbohydrates as acceptors in relation to the assembly of 3'-sialyl-6'-sulfo Lewis x (the L-selectin ligand) and related complex structures. *Biochemistry*, 35, 8925-8933.
- Collins, T. A., Williams, G. I., Johnston, J., Kim, J., Eddy, R., Shows, T., Gimbrone, M. A. and Bevilacqua, M. P. (1991). Structure and chromosomal localization of the gene for endothelial-leukocyte adhesion molecule I. *J. Biol. Chem.*, 266, 2466-2473.
- Daar, A. S., Fuggle, S. V., Fabre, S. W., Ting, A. and Morris, P. J. (1984). The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. *Transplantation*, 38, 287-292.
- Dabelsteen, E. (1996). Cell surface carbohydrates as prognostic markers in human carcinomas. *Journal of Pathology*, 179, 358-369.
- Dennis, J. W. (1986). Effects of swainsonine and polyinosinic: polycytidylic acid on murine tumor cell growth and metastasis. *Cancer Research*, 46, 5131.
- Dennis, J. W., Laferté, S., Waghorne, C., Breitman, M. L. and Kerbel, R. S. (1987). β 1 \rightarrow 6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science*, 236, 582.

- Dorfman, R. F., Gatter, K. C., Pulford, K. A. F. and Mason, D. A. (1986). An evaluation of the utility of anti-granulocyte and anti-leukocyte monoclonal antibodies in the diagnosis of Hodgkin's disease. *Am. J. Path.*, 123, 508-519.
- Feizi, T. (1985). Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature*, 314, 53.
- Fukuda, M. N., Dell, A., Oates, J. E., Wu, P., Klock, J. C. and Fukuda, M. (1985). Structures of glycosphingolipids isolated from human granulocytes. The presence of a series of linear poly-N-acetyllactosaminylceramide and its significance in glycolipids of whole blood cells. *J. Biol. Chem.*, 260, 1067.
- Fukuda, M., (ed.) (1992). In: *Cell surface carbohydrates and cell-development*, CRC Press, Boca Raton, FL., 127.
- Fukuda, M., (1994). In: *Molecular Glycobiology*, Fukuda, M. and Hindsgaul, O., ed., Oxford University Press, UK, 1-30.
- Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K. & Bunn, H. F. (1990). Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87, 2725-2729.
- Guyer, D. A., Moore, K. L., Lynam, E. B, Schammel, C. M. G., Rogelj, S., MacEver, R. P. and Sklar, L. A. (1996). P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) is a ligand for L-selectin in neutrophil aggregation. *Blood*, 88, 2415-2421.
- Hakomori, S. I., (1985). Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Research*, 45, 2405-2414.
- Hanahan, D. (1985). In: *DNA Cloning, Volume 1*, Glover, D., ed., IRL Press Ltd., London, UK.
- Hiller, K. M., Mayben, J. P., Bendt, K. M., Manousos, G. A., Senger, K., Cameron, H. S. and Weston, B. W. (2000). Transfection of alpha(1,3)fucosyltransferase antisense sequences impairs the proliferative and tumorigenic ability of human colon carcinoma cells. *Mol. Carcinog.*, 27(4), 280-288.

Hiraiwa, N., Dohi, T., Kawakami-Kimura, N., Yumen, M., Ohmori, K., Maeda, M. and Kannagi, R. (1996). Suppression of sialyl Lewis x expression and E-selectin-mediated cell adhesion in cultured human lymphoid cells by transfection of antisense cDNA of an $\alpha(1,3)$ fucosyltransferase(7). *J. Biol. Chem.*, 271(49), 31556-31561.

Hiraoka, N., Petryniak, B., Nakayama, J., Tsuboi, S., Suzuki, M., Yeh, J. C., Izawa, D., Tanaka, T., Miyasaka, M., Lowe, J. B. and Fukuda, M. (1999). A novel, high endothelial venule-specific sulfotransferase expresses 6-sulfo sialyl Lewis(x), an L-selectin ligand displayed by CD34. *Immunity*, 11(1), 79-89.

Humphries, M. J., Matsumoto, K., White, S. L. and Olden, K. (1986). Inhibition of experimental metastasis by castanospermine in mice: blockage of two distinct stages of tumor colonization by oligosaccharide processing inhibitors. *Cancer Research*, 46, 5215.

Imai, Y., Lasky, L. A. and Rosen, S. D. (1993). Sulphatation requirement for GlyCAM-1, an endothelial ligand for L-selectin. *Nature*, 361, 555.

Innis *et al.*, eds., (1991). *PCR protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., San Diego, CA.

Ito, H., Hiraiwa, N., Sawada-Kasugai, M., Akamatsu, S., Tachikawa, T., Kasai, Y., Akiyama, S., Ito, K., Takagi, H. and Kannagi, R. (1997). Altered mRNA expression of specific molecular species of fucosyl- and sialyl-transferases in human colorectal cancer tissues. *Int. J. Cancer*, 71, 556-564.

Jorgensen T., Berner, A., Kaalhus, O., Tveter, K. J., Danielsen, H. E. and Bryne, M. (1995). Up-regulation of the oligosaccharide sialyl Lewis^x: a new prognostic parameter in metastatic prostate cancer. *Cancer Research*, 55, 1818-1819.

Kao, F. T. and Puck, T. T. (1969). Complementation analysis on virus-fused chinese hamster cells with nutritional markers. *Science*, 164, 312-314.

Klopocki, A. G., Laskowska, A., Antoniewicz-Papis, J., Duk, M., Lisowska, E. and Ugorski, M. (1998). Role of sialosyl Lewis(a) in adhesion of colon cancer cells: the antisense RNA approach. *Eur. J. Biochem.*, 253(1), 309-318.

- Koszidin, K. L. and Bowen, B. R. (1992). The cloning and expression of a human $\alpha(1,3)$ fucosyltransferase capable of forming the E-selectin ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 187, 152-157.
- Kukowska-Latallo, J. F., Larsen, R. D., Nair, R. P. and Lowe, J. B. (1990). A cloned human cDNA determines expression of a mouse a mouse stage-specific embryonic antigen and the Lewis blood group $\alpha(1,3/1,4)$ fucosyltransferase. *Genes Develop.*, 4, 1288-1303.
- Lanotte, M. Martin-Thouvenin, V., Najman, S., Balerini, P., Valensi, F. and Berger, R. (1991). NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelotic leukemia (M3). *Blood*, 77(5), 1080-1086.
- Lasky, L. A. (1995). Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 113-139.
- Laszik, Z., Jansen, P. J., Cummings, R. D., Tedder, T. F., McEver, R. P. and Moore K. L. (1996). P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Blood*, 88, 3010-3021.
- Lowe, J. B., Stoolman, L. M., Nair, R. P., Larsen, R. D., Berhend, T. L. and Marks, R. M. (1990). ELAM-1-dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA. *Cell*, 63, 475.
- Lowe, J. B., Kukowska-Latallo, J. F., Nair, R. P., Larsen, R. D., Marks, R. M., Macher, B. A., Kelly, R. J. and Ernst, L. K. (1991). Molecular cloning of a human fucosyltransferase gene that determines expression of the Lewis x and VIM-2 epitopes but not ELAM-1 dependent cell-adhesion. *J. Biol. Chem.*, 266, 17467-17477.
- Lowe, J. B. (1994). In: *Molecular Glycobiology*, Fukuda, M. and Hindsgaul, O., ed., Oxford University Press, UK, 164-205.
- Lowe, J. B. (1997). Selectin ligands, leukocyte trafficking and fucosyltransferase genes. *Kidney Int.*, 51(5), 1418-1426.
- Lowe, J. B. (1998). Fucosyltransferases and selectin ligands. *Keystone Symposium march 22 – 28: Molecular mechanisms of leukocyte trafficking*; Organizer: Steven Rosen and Geoffrey Kansas; Lake Tahoe, Calif., USA.

Lo, S. K., Golenbock, D. T., Sass, P. M., Maskati, A., Xu, H and Silverstein, R. L. (1997). Engagement of the Lewis X antigen (CD15) results in monocyte activation. *Blood*, 89(1), 307-314.

Maehara, M., Yagita, M., Isobe, Y., Hoshino, T. and Nakagawara, G. (1993). Dimethyl sulfoxid (DMSO) increases expression of sialyl Lewis x antigen and enhances adhesion of human gastric carcinoma (NUGC4) cells to activated endothelial cells. *Int. J. Cancer*, 54, 296-301.

Majuri, M.-L., Mattila, P. and Renkonen, R. (1992). Recombinant E-selectin-protein mediates tumor cell adhesion via sialyl-Le^a and sialyl-Le^x. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 182(3), 1376-1382.

Maly, P., Thall, A., Petryniak, B., Rogers, C. E., Smith, P. L., Marks, R. M., Kelly, R. J., Gersten, K. M., Cheng, G., Saunders, T. L., Camper, S. A., Camphausen, R. T., Sullivan, F. X., Isogai, Y., Hindsgaul, O., von Andrian, U. H. and Lowe, J. (1996). The alpha(1,3)-fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell*, 86(4), 643-653.

McEver R.P., Moore K.L., Cummings R.D. (1995). Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem*. 270, (19), 11025-8.

Mian, A. J. and Percival, E. (1973). Carbohydrates of the brown seaweed *Himanthalia lorea* and *Bifurcaria bifucata*. *Carbohydr. Res.*, 26, 147.

Moyer, M. P. (1983). Culture of human gastrointestinal epithelial cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 174, 12-15.

Mulligan, M. S., Lowe, J. B., Larsen, R. D., Walker, L., Maemura, K. and Fukuda, M. (1993). Protective effects of sialylated oligosaccharides in immune complex-induced acute lung injury. *J. Exp. Med.* 178, 623.

Nakamura, M., Kudo, T., Narimatsu, H., Furukawa, Y., Kikuchi, J., Asakura, S., Yang, W., Iwase, S., Hatake, K. and Miura, Y. (1998). Single glycosyltransferase, core 2 beta1→6-N-acetylglucosaminyltransferase, regulates cell surface sialyl-Le^x expression level in human pre-B lymphocytic leukemia cell line KM3 treated with phorbol ester. *J. Biol. Chem.*, 273(41), 26779-26789.

Nakasaki, H., Mitomi, T., Noto, T., Ogoshi, K., Hanaue, H., Tanaka, Y., Makuuchi, H., Clausen, H. and Hakomori, S. (1989). Mosaicism in the expression of tumor-associated carbohydrate antigens in human colonic and gastric cancers.

Cancer Research, 49, 3662-3669.

Nakomori, S., Kameyama, M., Imaok, S., Furukawa, H., Ishikawa, O., Sasaki, Y., Kabuto, T., Iwanaga, T., Matsushita, Y. and Irimura, T. (1993). Increased expression of sialyl-Lewis-X antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma:

clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Res.*, 53, 3632-3637.

Nakomori, S., Kameyama, M., Imaok, S., Furukawa, H., Ishikawa, O., Sasaki, Y., Izumi, Y. and Tatsuro Irimura, M. S. (1997). Involvement of carbohydrate antigen sialyl Lewis^x in colorectal cancer metastasis. *Dis. Colon Rectum*, 40, 420-431.

Park, J. G. *et al.* (1990). Characteristics of cell lines established from human gastric carcinoma. *Cancer Res.*, 50, 2773-2780.

Petretti, T., Schulze, B., Schlag, P. M. and Kimmner, W. (1999). Altered mRNA expression of glycosyltransferases in human gastric carcinomas.

Biochim. Biophys. Acta, 1428 (2-3), 209-218.

Petretti, T., Kimmner, W., Schulze, B. and Schlag, P. M. (2000). Altered mRNA expression of glycosyltransferase in human colorectal carcinomas and liver metastases.

Gut, 46(3), 359-366.

Phillips, M. L., Nudelman, E., Gaeta, F. C. A., Perez, M., Singhal, A. K. and Hakomori, S. I. (1990). ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Le^x.

Science, 250, 1130.

Picker, L. J., Warnock, R. A., Burns, A. R., Doerschuk, C. M., Berg, E. L. and Butcher, E. C. (1991). The neutrophil LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins

ELAM-1 and GMP-140. *Cell*, 66, 921.

Ramos, C. L., Smith, M. J., Snapp, K. R., Kansas, G. S., Stickney, G. W., Ley, K. and Lawrence, M. B. (1998). Functional characterization of L-selectin ligands on human neutrophils and leukemia cell lines: Evidence for mucinlike ligand activity distinct from P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood*, 91(3), 1067-1075.

Reguigne-Arnould, I., Wolfe, J., Hornigold, N., Faure, S., Mollicone, R., Oriol, R. and Coullin, P. (1996). Fucosyltransferase genes are dispersed in the genome: FUT7 is located on 9q34.3 distal to D9s1830. *CRASE*, 319(9), 783-788.

Renkonen, J., Paavonen, T. and Renkonen, R. (1997). Endothelial and epithelial expression of sialyl Lewis^x and sialyl Lewis^a in lesions of breast carcinoma. *Int. J. Cancer*, 74, 296-300.

Rhodes, J. M. (1996). Unifying hypothesis for inflammatory bowel disease and associated colon cancer: sticking the pieces together with sugar. *Lancet*. 347, 40-44.

Ronin, C. (1998). Remodeling of glycoprotein and carbohydrate antigens. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 36(6), 373-378.

Rosen, S. D and Bertozzi, C. R. (1994). The selectins and their ligands. *Curr. Opin. Cell Bio.* 6, 663-673.

Rosen, S. D and Bertozzi, C. R. (1996). Leukocyte adhesion – two selectins converge on sulphate. *Curr. Biol.*, 6, 261-264.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.

San Blas, G. and Cunningham, W. L. (1974). Structure of cell wall and xocellular mannans from the yeast *Hansenula holstii*. *Biochem. Biophys. Acta*. 354, 233.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5436-5467.

Sasaki, K., Kurata, K., Funayama, K., Nagata, M., Watanabe, E., Ohta, S., Hanai, N. and Nishi, T. (1994). Expression cloning of a novel alpha 1,3 fucosyltransferase that is involved in biosynthesis of the sialyl-Lewsi-X carbohydrate determinants in leukocytes. *J. Biol. Chem.*, 268, 14730-14737.

Schachter, H. (1994). In: *Molecular Glycobiology*, Fukuda, M. and Hindsgaul, O., ed., Oxford University Press, UK, 89-162.

Sekiguchi, M., *et al.* (1978). Establishment of cultured cell lines derived from a human gastric carcinoma. *Jpn. J. Exp. Med.*, 48, 61-68.

Skinner, M. P., Fournier, D. J., Andrews, R. K., Gorman, J. J., Chesterman, C. N. and Berndt, M. C. (1989). Characterization of human platelet GMP-140 as a heparin-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164, 1373-1379.

Smith, H. S. (1979). In vitro properties of epithelial cell lines established from human carcinomas and nonmalignant tissue. *J. Natl. Cancer Inst.*, 62, 225-230.

Smithers, N., Nicholl, D. and Edbrooke, M. (1998). Identification of α 1,3-fucosyltransferase mRNA in inflammatory joint tissue. Poster# 216; *Keystone Symposium march 22 – 28: Molecular mechanisms of leukocyte trafficking*; Organizer: Steven Rosen and Geoffrey Kansas; Lake Tahoe, Calif., USA.

Stegmaier, M., Levinovitz, A., Isenmann, S., Borges, E., Lenter, M., Kocher, H. P., Kleuser, B. and Vestweber, D. (1995). The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature*, 373, 615-620.

Stoolman, L. M., Tenforde, T. S. and Rosen, S. D. (1984). Phosphomannosyl receptors may participate in the adhesive interaction between lymphocytes and high endothelial venules. *J. Cell. Biol.* 99, 1535.

Sueyoshi, S., Tsuboi, S., Sawada-Hirai, R., Dang, U. N., Lowe, J. and Fukuda, M. (1994). Expression of distinct fucosylated oligosaccharides and carbohydrate-mediated adhesion efficiency directed by two different α -1,3-fucosyltransferases. *J. Biol. Chem.*, 269(51), 32342-32350.

Suzuki, H. and Kashiwagi, H. (1991). Molecular biology of cytokine effects on vascular endothelial cells. *Int. Rev. Exp. Path.* 32, 95-148.

Symington, F. W., Hedges, D. L. and Hakomori, S. I. (1985). Glycolipid antigens of human polymorphonuclear neutrophils and the inducible HL-60 myeloid leukemia line. *J. Immunol.*, 134, 2498.

Tedder, T. F., Isaacs, C. M., Ernst, T. J., Demetri, G. D., Adler, A. D. and Distchele, C. M. (1989). Isolation and chromosomal localization of cDNAs encoding a novel lymphocyte cell surface molecule, LAM-1. *J. Exp. Med.* 170, 123-133.

- Todderud, G., Alford, J., Millsap, K. A., Aruffo, A. and Tramposch, K. M. (1992). PMN-binding to P-selectin is inhibited by sulfatides. *Cell*, 67, 35.
- Togayachi, A., Kudo, T., Ikehara, Y., Iwasaki, H., Nishihara, S., Andoh, T., Higashiyama, M., Kodama, K., Nakamori, S. and Narimatsu, H. (1999). Upregulation of Lewis enzyme (FUT3) and plasma-type alpha1,3fucosyltransferase(6) expression determines the augmented expression of sialyl Lewis x antigen in non-small lung cancer. *Int. J. Cancer*, 83(1), 70-79.
- Toppila, S., Lauronen, J., Mattila, P., Turunen, J. P., Penttilä, L., Paavonen, T., Renkonen, O. and Renkonen, R. (1997). L-selectin ligand in rat high endothelium: multivalent sialyl Lewis x glycans are high-affinity inhibitors of lymphocyte adhesion. *Eur. J. Immunol.*, 27, 1360-1365.
- Varki, A., (1997). Selectin Ligands: Will the real ones please stand up? *J. Clin. Invest.* 99 (2), 158-162.
- Vestweber, D. (1996). Ligand-specificity of the selectins. *J. Cell. Biochem.*, 61, 585-591.
- Voet, D. and Voet, J. G. (1992). In: Biochemie, Kap. 21-3 *Biosynthese von Oligosacchariden und Glycoproteinen*, VCH-Verlag Weinheim, New York, Basel, Cambridge.
- Wagers, A. J., Lowe, J. and Kansas, G. (1996). An important role for the α 1,3-fucosyltransferase(7), in leukocyte adhesion to E-selectin. *Blood*, 88(6), 2125-2132.
- Wagers, A. J., Stoolman, L.M., Kannagi, R., Craig, R. and Kansas, G.S. (1997). Expression of leukocyte fucosyltransferase regulates binding to E-selectin. *J. Immunol.* 159, 1917-1929.
- Waltz, G., Aruffo, A., Kolanus, W., Bevilacqua, M. and Seed, B. (1990). Recognition of ELAM-1 of the sialyl-Le^x determinant on myeloid and tumor cells. *Science*, 250, 1132.
- Watkins, W. M., (1980). Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis, and P blood group system. *Adv. Hum. Genet.*, 10, 1.
- Weber *et al.*, (1995). Effect of lipopolysaccharid on transfection efficiency in eucaryotic cells. *BioTechniques* 19, 930.

Weston, B. W., Smith, P. L., Kelly, R. J. and Lowe, J. B. (1992). Molecular cloning of a fourth member of a human $\alpha(1,3)$ fucosyltransferase gene family. Multiple homologous sequences that determine expression of the Lewis x, sialyl Lewis x and difucosyl Lewis x epitopes. *J. Biol. Chem.*, 267, 24575.

Weston, B. W., Hiller, K. M., Mayben, J. P., Manousos, G., Nelson, C. M., Klein, M. B. and Goodman, J. L. (1999-A). A cloned CD15s-negative variant of HL-60 cells is deficient in expression of FUT7 and does not adhere to cytokine-stimulated endothelial cells. *Eur. J. Haematol.*, 63(1), 42-49.

Weston, B. W., Hiller, K. M., Mayben, J. P., Manousos, G., Bendt, K. M., Liu, R. and Cusack, J. C. Jr. (1999-B). Expression of human $\alpha(1,3)$ fucosyltransferase antisense sequences inhibits selectin-mediated adhesion and liver metastasis of colon carcinoma cells. *Cancer Res.*, 59(9), 2127-2135.

Whelan, J., (1996). Selectin synthesis and inflammation. *TIBS* 21, 65-69.

Wittig, B. M., Thees, R., Kaulen, H., Gott, K., Bartnik, E., Schmitt, C., Meyer zum Büschenfelde, K.-H. and Dippold, W. (1996). $\alpha(1,3)$ fucosyltransferase expression in E-selectin-mediated binding of gastrointestinal cells. *Int. J. Cancer*, 67, 80-85.

Yago, K., Zenita, K., Ginya, H., Sawada, M., Ohmori, K., Okuma, M., Kannagi, R. and Lowe, J. (1993). Expression of $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferases which synthesize sialyl Le^x and sialyl Le^a, the carbohydrate ligands for E- and P-selectins, in human malignant cell lines. *Cancer Res.*, 53, 5559-5565.

Zöllner, O. & Vestweber, D. (1996). The E-selectin ligand-1 is selectively activated in CHO cells by the $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferase IV and VII. *J. Biol. Chem.* 271, 33002-33008.

VIII Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1996 bis Juni 2000 in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Marianne Jochum angefertigt.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Marianne Jochum, die mir dieses sehr interessante Thema anvertraut hat. Sie hatte immer ein offenes Ohr für unkonventionelle Ideen und gewährte mir zudem den nötigen Forschungsfreiraum zur Ausgestaltung des Themas und zur Umsetzung der wissenschaftlichen Ideen. Darüber hinaus möchte ich mich bei ihr auch für die übertragene Verantwortung innerhalb der Arbeitsgruppe und das mir damit erwiesene Vertrauen bedanken.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Gutensohn für die freundliche Vertretung meiner Doktorarbeit vor der biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität bedanken.

Des weiteren bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Hans Fritz für die hervorragenden Forschungsbedingungen in seinem Institut sowie für die Ermöglichung des interdisziplinären Austausches mit anderen Forschungsgruppen im Rahmen von internationalen Tagungen und Seminaren.

Mein ganz persönlicher Dank gilt natürlich „meiner Cornelia“, mit deren Hilfe ich auch die schwierigeren Phasen dieser Arbeit locker und mit ganz viel Spaß meistern konnte.

Bei Dr. Alexander Faußner und Dr. Christian Ries möchte ich mich für die fachliche Unterstützung und die ausführlichen wissenschaftlichen Diskussionen bedanken. Dr. Christian Sommerhof danke ich für die interessanten Diskussionen.

Ich möchte mich ebenfalls bei der gesamten Arbeitsgruppe „Jochum“ insbesondere bei Annemarie Oettl, Dr. Cornelia Gippner-Steppert, Thomas Pitsch, Steffi Plewan, Maria Meier, Ruza Hell sowie Dirk Weidner für die schöne Zeit und die vielen kurzweiligen Kaffeerunden bedanken. Zum Schluss noch herzlichen Dank an Sigrid Köhler und Tatjana Tannenber.

IX Lebenslauf

Andreas Koch
Wotanstr. 16
82110 Germering

Geburtsort: München
Geburtsdatum: 09.04.1970
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

September 1976 – Juli 1980	Grundschule Germering
ab September 1980	Max-Born-Gymnasium Germering
Mai 1989	Abitur
September 1989 – Oktober 1990	Zivildienst in der Kinderhilfe Fürstenfeldbruck
ab dem WS 90/91	Biologiestudium an der Ludwig-Maximilians Universität München
November 1992	Diplomvorprüfung
Februar 1996	Abschluss als Diplom-Biologe
Hauptfach: Mikrobiologie	
Nebenfach 1: Biochemie	
Nebenfach 2: Virologie (med. Mikrobiol.)	
Nebenfach 3: Pflanzenphysiologie	
April 1995 – Februar 1996	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie und Genetik der LMU unter der Leitung von Herrn Dr. Brakhage
Juni 1996 – Juli 2000	Promotion in der Abteilung für Klinische Biochemie; Chirurgische Klinik Innenstadt unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Jochum
Juli 2000	Ausbildung zum European Patent Attorney in der Biotechnologie-Abteilung der Kanzlei Vossius und Partner, München
seit April 2001	Kandidat in der Ausbildung zum Deutschen Patentanwalt

Germering, den 20. Oktober 2001

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne des § 12(3) der Promotionsordnung vom 27. November 1991 von Frau Prof. Dr. Marianne Jochum betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, 2004

.....
(Andreas Koch)

Dissertation eingereicht am 2004

1. Berichterstatter
2. Berichterstatter
3. Berichterstatter (Sondervotum)

Prof. Dr. Wolf Gutensohn
PD Dr. Hans Weiher
Prof. Dr. Marianne Jochum

Tag der mündlichen Prüfung

15. April 2004