

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Aus dem Institut für Anatomie und  
Experimentelle Morphologie  
des Zentrums für Experimentelle Medizin

Direktor: Prof. Dr. med. Udo Schumacher

## **Untersuchung zur Expression der Glykosyltransferasen GALNT 2, GALNT 3 und GALNT 6 in metastasierenden und nichtmetastasierenden Tumorzelllinien**

### **Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Mathias Krüger  
aus Bremerhaven

Hamburg 2014

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 09.11.2015**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. U. Schumacher**

**Prüfungsausschuss, 2. Gutachterin: Prof. Dr. S. Klutmann**

**Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. E. Laack**

## **Widmung**

Für meine Familie:

Marion und Manfred Krüger

Christa und Walter Kiesewetter

Christa und Egon Krüger

# Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung .....	1
2	Einleitung.....	2
2.1	Glykosyltransferasen .....	2
2.1.1	GALNT 2, 3 und 6 .....	2
2.2	Metastasierungskaskade .....	3
2.3	Lewis Blutgruppen Antigene .....	5
3	Material und Methoden.....	7
3.1	Material .....	7
3.1.1	Tumorzelllinien .....	7
3.1.1.1	Formalin fixierte und paraffinierte humane Tumoren (in vivo gewachsene Tumorzellen).....	8
3.1.1.2	Humane Tumorzelllinien (in vitro gewachsene Tumorzellen) ...	8
3.1.2	Primer.....	9
3.1.2.1	Effizienz der Primerpaare .....	11
3.2	Methoden.....	12
3.2.1	RNA-Isolation .....	12
3.2.1.1	RNA-Isolation aus paraffinierten humanen Tumoren.....	12
3.2.1.2	RNA-Isolation aus kultivierten Zelllinien.....	13
3.2.1.3	RNA-Isolation aus Mausblut .....	14
3.2.2	Bestimmung der RNA-Konzentration .....	14
3.2.3	cDNA-Synthese.....	14
3.2.3.1	cDNA-Synthese aus der RNA paraffinierter humaner Tumore	15
3.2.3.2	cDNA-Synthese aus der RNA kultivierter Zelllinien .....	16
3.2.4	Semi-nested PCR.....	17
3.2.5	Relative Quantifizierung mittels Real-Time PCR per Lightcycler® Instrument .....	18
3.2.5.1	LightCycler® Instrument .....	19
3.2.5.2	Reagenzien für die LightCycler®-Läufe .....	19
3.2.5.3	Durchführung der Messungen am LightCycler®.....	20

3.2.6	Gelelektrophorese zur PCR-Produktkontrolle .....	22
3.2.7	DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte .....	25
4	Ergebnisse .....	26
4.1	Ergebnisse der Gelelektrophorese zur Kontrolle der am LightCycler® entstandenen PCR-Produkte .....	26
4.1.1	PCR-Produktkontrolle von GALNT 2 mithilfe eines Agarosegels ..	28
4.1.2	PCR-Produktkontrolle von GALNT 3 mithilfe eines Agarosegels ..	29
4.1.3	PCR-Produktkontrolle von GALNT 6 mithilfe eines Agarosegels ..	30
4.2	Messergebnisse der relativen Quantifizierung von GALNT 2 in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren am LightCycler® .....	31
4.2.1	Relative Expression von GALNT 2 (in vitro gewachsene Zellen) ..	31
4.2.2	Vergleichende Darstellung der relativen Expression von GALNT 2 in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren .....	32
4.3	Messergebnisse der relativen Quantifizierung von GALNT 3 in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren am LightCycler® .....	33
4.3.1	Relative Expression von GALNT 3 (in vitro gewachsene Zellen) ..	33
4.3.2	Vergleichende Darstellung der relativen Expression von GALNT 3 in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren .....	34
4.4	Messergebnisse der relativen Quantifizierung von GALNT 6 in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren am LightCycler® .....	35
4.4.1	Relative Expression von GALNT 6 (in vitro gewachsene Zellen) ..	35
4.4.2	Vergleichende Darstellung der relativen Expression von GALNT 6 in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren .....	36
4.6	Relative Expression von GALNT 2, 3 und 6 in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren (in vitro versus in vivo) .....	37
4.6.1	Vergleichende tabellarische Darstellung der relativen Expression von GALNT 2, 3, und 6 in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren.....	37
5	Diskussion .....	39

5.1	Expressionsvergleich der GALNTs in vivo und in vitro.....	40
5.1.1	Expressionsverhalten von GALNT 2, 3 und 6 .....	41
6	Zusammenfassung.....	44
7	Abkürzungsverzeichnis.....	45
8	Literaturverzeichnis .....	47
9	Danksagung .....	51
10	Lebenslauf.....	52
11	Eidesstattliche Erklärung.....	53

# 1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Seit längerer Zeit wird in der Glykobiologie eine unterschiedliche Expression von Glykosylierungsenzymen zwischen normalen Zellen und Tumorzellen beobachtet. Überwiegend wird davon ausgegangen, dass die veränderte Glykosylierung in Tumoren das Ergebnis der initialen onkogenetischen Transformation darstellt. Somit liegt der Verdacht nahe, dass die Glykosylierung auch eine Schlüsselrolle bei der Einleitung der Invasion und Metastasierung einnimmt. Die unterschiedliche Glykosylierung kann die Tumorzellinvasion und Metastasierung fördern oder auch inhibieren.

Ziel dieser Arbeit ist es die Expression von m-RNA der Polypeptid-GalNac-Transferasen (GALNT) 2, 3 und 6 mittels relativer Quantifizierung (RT-PCR) an metastasierenden und nichtmetastasierenden Primärtumoren in Xenograftmodellen humaner Tumorzellen zu untersuchen. Zum Aufzeigen eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Ausprägung der Expression von Glykosyltransferasen im Tumor und der Metastasierung wurden die Ergebnisse vergleichend dargestellt. Zusätzlich soll durch die unmittelbare Gegenüberstellung der Untersuchung kultivierter Tumorzellen (in vitro gewachsene Tumorzellen) mit xenotransplantierten Tumoren (in vivo gewachsene Tumoren) eine Aussage zur Vergleichbarkeit der Expression der Transferasen in vivo und in vitro erfolgen.

In dieser Untersuchung wurde ein Spektrum von drei unterschiedlichen Tumorentitäten mit unterschiedlich stark ausgeprägten Metastasierungsverhalten eingesetzt. Zur Anwendung kamen epitheliale Tumoren wie Mamma- und Kolonkarzinome sowie neuroektodermale Melanome.

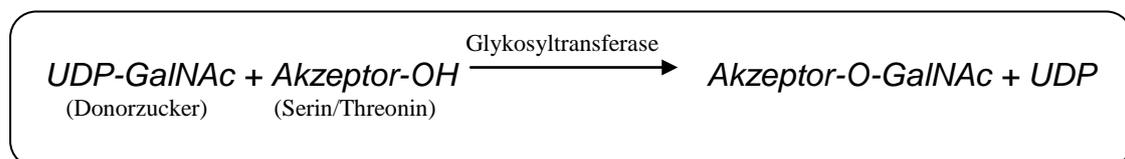
## 2 Einleitung

### 2.1 Glykosyltransferasen

Glykosyltransferasen sind Enzyme, die an der Biosynthese von Glykokonjugaten auf Zelloberflächen beteiligt sind. Sie katalysieren in einem posttranslationalen Prozess den Transfer eines Zuckermoleküls auf einen freien Akzeptor. Dieser Akzeptor kann von einem Glykan, Protein oder Lipid gebildet werden. Die meisten humanen Glykosyltransferasen sind äußerst substrat- und akzeptorspezifisch. Glykosyltransferasen sind als Typ II Transmembranproteine im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat lokalisiert (Brooks et al. 2002a).

#### 2.1.1 GALNT 2, 3 und 6

Die Glykosyltransferasen 2, 3 und 6 (UDP- $\alpha$ -D-N-Acetylglaktosamin: Polypeptid N-Acetylgalaktosaminyltransferasen / ppGalNAcTs / EC: 2.4.1.41) katalysieren den Transfer von GalNAc (N-acetyl-D-galactosamin) vom UDP-GalNAc zu der Hydroxylgruppe eines Serin- oder Threoninrests einer Polypeptidkette und initiieren damit die erste o-glykosidische Bindung (Brooks et al. 2002b). Diese neue Verbindung spiegelt das Tn-Epitop wider.



**Abbildung 1:** Reaktionsschema der Glykosyltransferasen 2, 3 und 6

Das entstandene Glykoprotein wird als Mucin-Typ klassifiziert. Die o-Glykosylierung ändert sich während der Entwicklung, Differenzierung und bei Krankheiten. Da die Glykosyltransferasen 2, 3 und 6 eine initiale Schlüsselrolle

bei der Mucinglykosylierung einnehmen, ist ihre genauere Untersuchung für das Verständnis der Metastasierung von hohem Interesse (Brooks et al. 2002c).

GALNT 2 (Proteinname: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2) wird im Körper ubiquitär als sogenanntes „housekeeping enzym“ exprimiert. Sie besitzt ein breites Substratspektrum für Peptide, wie beispielsweise EA2, Muc5AC, Muc1a und Muc1b (Wandall et al. 1997). Es wird vermutet, dass GALNT 2 an der o-Glykolysierung des Immunglobulins A1 in der Hinge-Region beteiligt ist (Iwasaki et al. 2002).

GALNT 3 (Proteinname: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3) ist ein gewebespezifisches Enzym, dessen Expression im Gegensatz zu GALNT 2 hoch reguliert ist. Sie ist substratspezifisch für die Glykoproteine gp120, EA2, Muc2 und Muc5 (Wandall et al. 1997). Es wird angenommen, dass GALNT3 Fibronectin in vivo glykolysiert. Zudem glykolysiert sie den Wachstumsfaktor FGF23, der eine zentrale Rolle in der Phosphat-Hämostase einnimmt (Kato et al. 2006).

GALNT 6 (Proteinname: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6) ist wie GALNT 3 ein gewebespezifisches Enzym, dessen Expression hoch reguliert ist. Es wird vermutet, dass es Anteil an der Synthese von onkofetalem Fibronectin nimmt. Außerdem ist es an der Glykosylierung von Muc1a, Muc2, EA2 und Fibronectinpeptiden beteiligt (Bennett et al. 1999).

## **2.2 Metastasierungskaskade**

Grundsätzlich ist das Auftreten von Metastasen mit einer schlechten Prognose für den betroffenen Patienten verbunden. Wünschenswert wäre es, die Metastasierung therapeutisch zu kontrollieren oder zumindest deren Auftreten besser vorhersagen zu können.

Der Ablauf der Metastasierungskaskade hängt von vielen Faktoren ab:

1. Zunächst kommt es zur Vermehrung der Tumorzellen und somit zur Vergrößerung des Primärtumors. Währenddessen können die neoplastischen Zellen, bedingt durch Veränderungen in der epigenetischen Regulation, dynamisch und reversibel verschiedene

Stadien von epithelialen und mesenchymalen Erscheinungsformen durchleben. Diese Veränderungen in der epigenetischen Regulation, initiiert durch bestimmte Transkriptionsfaktoren, werden als „epithelial-mesenchymal transitions (EMTs)“ bezeichnet. TGF- $\beta$  stellt einen der wichtigsten Transkriptionsfaktoren dar, der für die Einleitung des EMT-Programms verantwortlich ist und folglich die Invasion und Metastasierung fördert (Tam und Weinberg 2013). Die dabei entstehenden quasi-mesenchymalen Zellen haben im Gegensatz zu den ortständigen epithelialen Zellen ihre adhärenenten Fähigkeiten verloren und können infolgedessen den Zellverband des Primärtumors verlassen und streuen.

2. Gelangen eine oder mehrere, sich im quasi-mesenchymalen Stadium befindlichen, Tumorzellen durch das Stroma zu einem Blut- oder Lymphgefäß, können sie mit ihrem Zellkörper die Basalmembran des Gefäßes überwinden und somit in das Gefäßlumen gelangen. In einigen Fällen kann dieser Prozess auch von Makrophagen unterstützt werden (Tam und Weinberg 2013).
3. Auf ihrem Weg durch das Gefäßlumen muss die Metastase verschiedenen Noxen, wie biologischen, physikalischen und chemischen Stress, widerstehen, um zu überleben.
4. Am Ende ihres Weges durch das Gefäßlumen kann die Metastase die Transmigration der Leukozyten imitieren. Hierzu exprimiert sie auf ihrer Oberfläche Liganden, die über E- und P- Selektine eine Verbindung zum Endothel aufbauen. Im weiteren Verlauf überwindet die, im quasi-mesenchymalen Stadium befindliche, Metastase erneut die Basalmembran, um sich in einem anderen Gewebe oder Organ abzusiedeln.
5. Im neuen Gewebe oder Organ angelangt kommt es, durch lokale Transkriptionsfaktoren angeregt, zu einer erneuten Veränderung in der epigenetischen Regulation der Metastase. Der quasi-mesenchymale Zellzustand wird nun über die Einleitung des MET-Programms (mesenchymal-epithelial transitions) zurück in einen quasi-epithelialen

Zellzustand transferiert (Samatov et al. 2013). Infolgedessen können die Tumorzellen, die nun den Sekundärtumor bilden, Haftmechanismen auf ihrer Zelloberfläche ausbilden, die für eine Ortständigkeit im Gewebe sorgen. Durch weitere Zellproliferation dehnt sich der Sekundärtumor im Absiedlungsgebiet räumlich aus.

In dieser Untersuchung liegt der Fokus im Bereich der Metastasierungskaskade im Speziellen auf den Zelladhärenzen während der Absiedlung einer Metastase und dem Ablauf der Transmigration. Hierzu wird das Expressionsverhalten der Glykosyltransferasen GALNT 2, 3 und 6 in metastasierenden und nichtmetastasierenden Tumorzelllinien vergleichend an soliden Tumoren (in vivo) und mobilen kultivierten Zellen (in vitro) untersucht.

### **2.3 Lewis Blutgruppen Antigene**

Sialyl Lewis x (SLe<sup>x</sup>) und Sialyl Lewis a (SLe<sup>a</sup>) sind membranständige o-glykosydisch gebundene Tetrasaccharide. Sie spielen im Körper unter anderem eine wichtige Rolle bei der Zell-zu-Zell Erkennung (Pang et al. 2011). Leukozyten sowie Tumorzellen exprimieren SLe<sup>x</sup> und SLe<sup>a</sup> als Antigene auf ihrer Zelloberfläche. Diese Antigene besitzen die Fähigkeit spezifisch über E-Selektin an der Endothelmembran zu binden, um im weiteren Verlauf die Basalmembran des Gefäßes zu überwinden und in das umliegende Stroma zu gelangen.

In Tumorzellen ist die Expression der Antigene stark erhöht (Brooks et al. 2002d). SLe<sup>x</sup> und SLe<sup>a</sup> sind in der aktuellen Tumorforschung von großem Interesse, da ihre Expression mit gesteigertem Metastasierungspotential, verstärkter Malignität und Invasivität assoziiert wird (Hakomori 2002; Kannagi 1997).

Mittels des CA19-9 Antikörpers kann SLe<sup>a</sup> auf der Oberfläche von Tumorzellen nachgewiesen werden. Ein positives Ergebnis spricht mit hoher Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein eines sich im fortgeschrittenen Stadium befindlichen epithelialen Tumors (Matsui et al. 2004).

Da die Glykosyltransferasen GALNT 2, 3 und 6 die erste O-glykosydische Bindung an einem Protein katalysieren, kann davon ausgegangen werden, dass sie an der Synthese von SLe<sup>x</sup> und SLe<sup>a</sup> beteiligt sind. Aus diesem Grund wurde die Expression von GALNT 2, 3 und 6 in verschiedenen Tumorentitäten mit unterschiedlich hohem Metastasierungspotential untersucht.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Tumorzelllinien

In den folgenden Tabellen 1 und 2 sind die im Experiment verwendeten humanen Tumorzelllinien mit Entität, Ursprung und Metastasierungsgrad dargestellt. Alle Zelllinien wurden zuvor auf Mykoplasmen untersucht. Es wurden ausschließlich mykoplasmenfreie Zelllinien eingesetzt.

**Tabelle 1:** Kolon- und Mammakarzinomzelllinien (nach Schumacher und Adam, 1997)

Tumorzelllinie	Tumorart	Ursprung	Metastasierungsgrad im Versuchstier
SW 480	Kolonkarzinom	—	0/7
HT 29	Kolorektales Adenokarzinom	Primärtumor des Darms	9/9
HT 29 mdr	Kolonkarzinom	—	—
HBL 100	Mammakarzinom	Muttermilch	0/4
MCF 7	Mammakarzinom	Pleuraerguß	6/8

**Tabelle 2:** Melanomzelllinien (nach Thies et al., 2007)

Tumorzelllinie	Tumorart	Ursprung	Metastasierungsgrad im Versuchstier
FEMX-1	Malignes Melanom	Metastatischer Lymphknoten	7/10
MV3	Malignes Melanom	Metastatischer Lymphknoten	8/10
MeWo	Malignes Melanom	Metastatischer Lymphknoten	6/10

### **3.1.1.1 Formalin fixierte und paraffinierte humane Tumoren (in vivo gewachsene Tumorzellen)**

Zunächst wurden SCID-Mäusen (**SCID** *severe combined immunodeficiency*) Tumorzellen transplantiert, die jeweils aus einer der oben genannten humanen Tumorzelllinien stammten. Das Ziel war hierbei, nach erfolgreicher Etablierung der Zellen, die Gewinnung eines im lebenden Organismus gewachsenen Tumors. Den SCID-Mäusen wurden jeweils 200 µl einer Lösung aus 1 ml Zellkulturmedium und  $5 \times 10^6$  kultivierten Tumorzellen zwischen die Schulterblätter injiziert. Nach Erreichen einer Tumorgroße von 1/10 des ursprünglichen Körpergewichts einer Maus oder dem Ulzerieren eines Tumors wurde dieser entnommen. Weiterhin wurden die Mäuse auf Metastasen untersucht und die entnommenen Tumoren in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

### **3.1.1.2 Humane Tumorzelllinien (in vitro gewachsene Tumorzellen)**

Der in vitro-Versuch wurde mit humanen Tumorzelllinien durchgeführt. Die Kultivierung der humanen Tumorzelllinien erfolgte in einem RPMI 1640 Medium (L-Glutamin mit 2g Glukose pro Liter, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in einem Inkubator bei 37°C und einer mit 5% CO<sub>2</sub> angereicherten Atmosphäre. Dem Medium wurden zusätzlich 100 U/ml Penicillin und 10000 µl/ml Streptomycin sowie 10% fetales Kalbsserum (FCS; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben. Am Ende der Wachstumsphase wurden die humanen Tumorzellen zur RNA-Isolation mit einer Phosphat gepufferten Kochsalzlösung (PBS; 50 mM Phosphat, 150 mM NaCl; pH 7.4) gewaschen und trypsinisiert. Im Anschluss an die Trypsinisierung wurden die Tumorzelllinien für 3 Minuten in einer Zentrifuge (Hettich Zentrifugen, Universal 32 R, Tuttlingen, Deutschland) bei 1500 U/min zentrifugiert. Das dabei entstandene Zellpellet konnte zur folgenden RNA-Isolation abpipettiert werden.

### 3.1.2 Primer

Die für die Untersuchung verwendeten Primer wurden auf der Internetseite der Gendatenbank des National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) ausgewählt. Dabei standen folgende Kriterien im Vordergrund:

- a) Die intronüberschreitende Lage, um bei der Untersuchung eine Verwechslung von cDNA mit genomischer DNA zu vermeiden.
- b) Möglichst dicht beieinander liegende Schmelzpunkte eines Primerpaares, um die technische Durchführung und Vergleichbarkeit der Experimente zu gewährleisten.

Die Herstellung erfolgte bei der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland). Für die Anwendung wurden die Primer in einer Konzentration von 100 pmol/µl verdünnt.

Die 5`-3` Primer werden als „forward Primer“ und die 3`-5` Primer als „reverse Primer“ bezeichnet. Bei der „semi-nested PCR“ wurde zunächst durch den „forward a Primer“ ein längeres Amplifikat gebildet, woraus im zweiten Schritt durch den „forward Primer“ das kleine Produkt gebildet wurde. In beiden Schritten wurde der „reverse Primer“ eingesetzt.

**Tabelle 3:** *humaner Actinprimer*

<b>humaner Actin - Primer</b>		
<b>Primersequenz</b>	<b>Schmelzpunkt (T<sub>m</sub>)</b>	<b>Produktlänge (bp)</b>
<b>forward a</b> 5`-AGA AAA TCT GGC ACC ACA CC-3`	57,3°C	190
<b>forward</b> 5`-CCA ACC GCG AGA AGA TGA-3`	56,0°C	97
<b>reverse</b> 5`-CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG-3`	61,4°C	-

**Tabelle 4: GALNT 2 - Primer**

<b>GALNT 2 - Primer</b>		
<b>Primersequenz</b>	<b>Schmelzpunkt (T<sub>m</sub>)</b>	<b>Produktlänge (bp)</b>
<b>forward a</b> 5`-GGG GAA AAT TGA GAA AGT GCG-3`	57,9°C	185
<b>forward</b> 5`-TCA CTG CGA GTG TAA TGA GCA-3`	57,9°C	71
<b>reverse</b> 5`-CAA CCC GAG TCC TGT CCT C-3`	61,0°C	-

**Tabelle 5: GALNT 3 - Primer**

<b>GALNT 3 - Primer</b>		
<b>Primersequenz</b>	<b>Schmelzpunkt (T<sub>m</sub>)</b>	<b>Produktlänge (bp)</b>
<b>forward a</b> 5`-GGA AAA GGA ACG TGG GGA AGC- 3`	61,8°C	204
<b>forward</b> 5`-CCA GAC ACT CGA CCT CCT G-3`	61,0°C	125
<b>reverse</b> 5`-CTG TGG ACA GTT CTA AGC AAC G- 3`	60,3°C	-

**Tabelle 6: GALNT 6 - Primer**

<b>GALNT 6 - Primer</b>		
<b>Primersequenz</b>	<b>Schmelzpunkt (T<sub>m</sub>)</b>	<b>Produktlänge (bp)</b>
<b>forward a</b> 5`-AGG AGC ACC TAA AGG AGA AGC-3`	59,8°C	208
<b>forward</b> 5`-TTC CTG GAT GCC CAC TGT-3`	56,0°C	71

<b>reverse</b> 5`-TTG TCC TCA GCG ATT CGA G-3`	56,7°C	-
---	--------	---

*GALNT*: Homo sapiens UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc)

Alle Primerpaare wurden an Maus-cDNA kontrolliert, um nachzuweisen, dass keine genomische Maus-DNA durch die Primer amplifiziert wird.

### 3.1.2.1 Effizienz der Primerpaare

Für jede Glykosyltransferase wurde eine Standardkurve erstellt. Hierzu wurde von einer cDNA-Probe eine Verdünnungsreihe angesetzt, deren Konzentration zuvor photometrisch bestimmt wurde. Die am LightCycler® eingesetzte Verdünnungsreihe ergab in der Auswertung eine Kurve (Standardkurve), die für die quantitative Bestimmung der Probenexpression als Bezugsebene Anwendung fand. Für eine exakte Quantifizierung mussten die PCR-Läufe unter optimalen Voraussetzungen durchgeführt werden. Dabei stellte die Konsistenz innerhalb der Zyklen, eine möglichst lineare Standardkurve sowie eine hohe Primereffizienz (> 90%) die Grundlage der exakten Quantifizierung dar. Die Effizienz der verwendeten Primerpaare schwankte zwischen 94,5% und 98,5%. Im Idealfall verlaufen die Messungen identisch, wobei die Abstände zwischen den einzelnen Verdünnungsschritten gleich bleiben. Zudem wird das PCR-Produkt in jedem Zyklus exponentiell verdoppelt. Zur Berechnung der Primereffizienz wird folgende Formel angewendet:

Effizienz:  $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation kamen zwei verschiedene Isolations-Kits der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) zur Anwendung. Beide Kits wenden zur Isolierung der RNA aus dem Zelllysat bzw. den Paraffinschnitten der Tumore, Eluations- und Waschvorgänge an. Ebenso werden in beiden Kits spezifische Trenn- und Bindungssäulen mit unterschiedlichen Silica-Gelmembranen in einer Zentrifuge angewandt. Dabei wurden verschiedene Puffer eingesetzt. Sämtliche Proben wurden auf Eis lagernd verarbeitet.

#### 3.2.1.1 RNA-Isolation aus paraffinierten humanen Tumoren

Zunächst wurde das überstehende Paraffin der eingebetteten Tumore mittels eines Skalpells entfernt. Die ersten 10 mit Hilfe eines Mikrotoms hergestellten Schnitte wurden verworfen, um möglichst homogene kontaminationsfreie Schnitte zu erhalten. Weiter wurden jeweils 3 mal 8 Schnitte (10 µm dick) pro Tumor hergestellt und in 3 separaten RNase freien 2 ml Tubes gesammelt. Für die Isolation kam der RNeasy FFPE-Kit (**FFPE** formalin fixed, **p**araffin embedded) der Firma Qiagen zum Einsatz. Dabei wurde sorgfältig einer Kontamination vorgebeugt, indem alle verwendeten Werkzeuge, besonders die Klinge des Mikrotoms, mit RNase away (Molecular BioProducts, San Diego; CA, USA) gesäubert wurden. Um eine ausreichende Menge an RNA zu erhalten, wurde die nach der Isolation separat gewonnene RNA eines Tumors zusammengeführt. Zum Lösen des Paraffins wurden die Schnitte unter Zugabe von 1 ml Xylol-Ersatz 10 Sek. gevortext. Um eine vollständige Trennung des Xylol-Paraffin-Gemisches von den Zellbestandteilen zu erhalten, folgte ein Zentrifugieren auf höchster Stufe für 120 Sek. Im Anschluss wurde das Xylol-Paraffin-Gemisch von dem sich absetzenden Zellpellet abpipettiert und verworfen. Zur Entfernung des gesamten Xylol-Paraffin-Anteils wurde das Pellet

unter Zugabe von 1 ml Ethanol (100%) ein weiteres Mal zentrifugiert und der Xylol-Paraffin-Anteil nochmals verworfen. Im weiteren Verlauf wurde exakt nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Die an der Membran der Säule gebundene RNA wurde in zwei aufeinanderfolgenden Schritten mittels im Kit enthaltenen RNase freien Wassers eluiert. Für die Eluation wurden jeweils 15 µl des RNase freien Wassers direkt auf die Membran pipettiert ohne sie mit der Pipette zu berühren. Anschließend wurde 60 Sek. lang auf höchster Stufe zentrifugiert. Nach abgeschlossener Isolation konnten 90 µl RNA-Lösung pro Tumor gewonnen werden. Für alle Zentrifugationsschritte wurde das Modell Universal 32 R der Firma Hettich aus Deutschland verwendet.

### **3.2.1.2 RNA-Isolation aus kultivierten Zelllinien**

Die RNA-Isolation aus den in Nährlösung gewachsenen Zellkulturen wurde mit Hilfe des RNeasy Midi-Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Hierbei kam Ausgangsmaterial mit einer Minimalzellenzahl von  $5 \times 10^6$  zur Anwendung. Die Säulen des Midi-Kits sind auf eine Bindungsmenge von 1 mg RNA ausgelegt. Dabei werden nur Fragmente mit einer Basenlänge von über 200 bp in der Membran zurückgehalten. Kleinere Fragmente wie tRNA, rRNA und 5sRNA gelangen durch die Membran, so dass fast ausschließlich große mRNA-Fragmente abgefangen werden. Die über die Membran abgefangene mRNA wurde mit 2 ml Lysispuffer aus dem Kit wieder in Lösung gebracht. Anschließend erfolgte eine physikalische Homogenisierung durch eine Kanüle mit einem Durchmesser von 0,9 mm. Die Lösung wurde mehrmals durch die Kanüle aufgezogen. Im weiteren Verlauf wurde 2 ml Ethanol (70%) zur Lösung hinzu pipetiert. Die entstandene Lösung wurde wiederum für weitere Aufbereitungsvorgänge in RNeasy spin columns des Kits überführt. Die Eluation erfolgte mittels RNase-freien Wassers. Um einen möglichst hohen Gewinn an RNA sicherzustellen, wurde der Vorgang zweimal durchgeführt.

### **3.2.1.3 RNA-Isolation aus Mausblut**

Zwei Mäusen wurden nach tiefer Narkose Blut aus dem Herzen oder aus der retroorbitalen Region mit einer Spritze entnommen. Die RNA-Isolation wurde mittels des QIAmp RNA Blood Mini Kits der Firma QIAGEN ausgeführt. Nach einer Lysierung der Erythrozyten wurde aus den gewonnenen Leukozyten RNA isoliert.

### **3.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration**

Die RNA-Konzentration der isolierten RNA wurde mithilfe eines Photospektrometers (Smart Spec 2000™, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) durchgeführt. Der RNA-Lösung wurden 10 µl entnommen und mit destilliertem Wasser im Verhältnis von 1:10 verdünnt. Bevor die Konzentrationsmessung stattfinden konnte, musste eine Eichung des Gerätes erfolgen. Diese wurde mit destilliertem Wasser durchgeführt. Anschließend wurden zur Konzentrationsbestimmung die bei der Verdünnung entstandenen 100 µl RNA-Lösung eingesetzt. Das Photospektrometer arbeitet in Wellenlängenbereichen von 260 nm, 280 nm und 320 nm. Die Konzentration wurde in µg/ml angegeben. Für den Erhalt des exakten Wertes mussten die Daten, aufgrund der zuvor vorgenommenen Verdünnung, mit dem Faktor 10 umgestellt werden.

### **3.2.3 cDNA-Synthese**

Um im weiteren Verlauf des Experiments eine PCR durchführen zu können, musste aus der gewonnenen mRNA (messenger RNA) cDNA (complementary DNA) synthetisiert werden. Im Zuge dessen kam das Enzym der RNA abhängigen DNA-Polymerase Reverse Transkriptase zur Anwendung. Dieses benötigt zur Aktivierung einen Primer. Da degradierte mRNA der paraffinierten Tumoren und nichtdegradierte mRNA der kultivierten Zelllinien eingesetzt wurde, mussten zwei unterschiedliche Primer verwendet werden. Zum einen der spezifisch bindende Anchored-oligo(dT)<sub>18</sub> Primer, der bei nichtdegradierter Zelllinien - RNA Anwendung fand. Zum anderen der unspezifisch bindende

Random Hexamer Primer, der bei degradierter mRNA von paraffinierten Tumoren einen ausreichenden Gewinn an cDNA verspricht.

### 3.2.3.1 cDNA-Synthese aus der RNA paraffinierter humaner Tumoren

Die RNA der in Paraffin eingebetteten Tumoren lag aufgrund von Verarbeitungsmethoden (Fixierung) und natürlich vorkommender Nekrosen des Tumors in degradierter Form vor. Um trotz der ungünstigen Voraussetzungen einen ausreichenden Gewinn an cDNA zu erhalten, wurde der unspezifisch bindende Random Hexamer Primer aus dem First Strand Transcriptor cDNA Synthesis Kit der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Zur weiteren Steigerung des cDNA-Gewinns wurde die unverdünnte Maximalmenge der gewonnenen RNA zur Synthese verwendet. Durch diese Maßnahmen konnte die Nachweisgrenze der später erfolgten Real-Time-PCR überschritten werden.

Die Pipettierschemata Mastermix 1 und 2 wurden nach Angaben des Herstellers zusammengestellt. Nach Zusammenstellung des Mastermix 1 wurde der Inhalt für 10 Minuten bei 65°C in einem Thermocycler (Personal Cycler, Biometra, Göttingen, Deutschland) inkubiert, um den Primern Bindungsmöglichkeit zu geben und sekundäre RNA-Strukturen zu denaturieren. Im Anschluss wurde Mastermix 1 zu Mastermix 2 pipettiert und für eine weitere Inkubation bei 55°C für 30 Minuten im Thermocycler platziert.

**Tabelle 7:** Pipettierschema (Mastermix 1) des ersten Ansatzes der cDNA-Synthese (RNA aus paraffinierten humanen Tumoren)

<b>Mastermix 1 (paraffinierte Tumoren)</b>	
RNA-Lösung	12 µl
Random-Hexamer-Primer	2 µl
Gesamtvolumen	14 µl

**Tabelle 8:** Pipettierschema (Mastermix 2) des zweiten Ansatzes der cDNA-Synthese (RNA aus paraffinierten humanen Tumoren)

<b>Mastermix 2 (paraffinierte Tumoren)</b>	
Reaktionspuffer	4,0 µl
RNAse Inhibitor	0,5 µl
Desoxynukleotide (dNTP's)	2,0 µl
Reverse Transkriptase	0,5 µl
Gesamtvolumen	7,0 µl

### 3.2.3.2 cDNA-Synthese aus der RNA kultivierter Zelllinien

Die cDNA-Synthese aus der RNA der kultivierten Zelllinien wurde mittels des spezifisch bindenden Anchored-oligo(dT)<sub>18</sub> Primers durchgeführt. Der Primer entstammt dem First Strand Transcriptor cDNA Synthesis Kit (Firma Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Um einen funktionell störungsfreien Ablauf der Synthese zu garantieren musste stets exakt die gleiche Masse von 1500 ng RNA eingesetzt werden. Zur Berechnung des Volumens der RNA-Lösung wurde zunächst die RNA-Konzentration in ng/µl bestimmt. Anschließend wurde das Ergebnis durch 1500 geteilt, um das einzusetzende RNA-Lösungs-Volumen in µl zu erreichen. Zum Erhalt der gewünschten RNA-Lösungskonzentration wurde mit Water PCR grade verdünnt. Nach Angaben des Herstellers wurden die Pipettierschemata (Mastermix 1 und -2) zusammengestellt. Der Programmablauf gestaltete sich identisch zum Programmablauf der cDNA-Synthese aus der RNA paraffinierter humaner Tumoren.

**Tabelle 9:** Pipettierschema (Mastermix 1) des ersten Ansatzes der cDNA-Synthese (RNA aus kultivierten Zelllinien)

<b>Mastermix 1 (kultivierte Zelllinien)</b>	
RNA-Lösung + Water PCR grade	12 µl
Anchored-oligo(dT) <sub>18</sub> Primer	1 µl
Gesamtvolumen	13 µl

**Table 10:** Pipettierschema (Mastermix 2) des zweiten Ansatzes der cDNA-Synthese (RNA aus kultivierten Zelllinien)

<b>Mastermix 2 (kultivierte Zelllinien)</b>	
Reaktionspuffer	4,0 µl
RNase-Inhibitor	0,5 µl
Desoxynukleotide (dNTP's)	2,0 µl
Reverse Transkriptase	0,5 µl
Gesamtvolumen	7,0 µl

### 3.2.4 Semi-nested PCR

Bei der semi-nested PCR wird das Produkt der ersten PCR in einer zweiten PCR eingesetzt und amplifiziert. Diese Vorgehensweise sichert eine ausreichende Produktmenge, selbst wenn das Template nur in einer geringen Menge vorliegt. In diesem Fall wurde eine Real-Time PCR als zweite PCR durchgeführt. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der semi-nested PCR gegenüber Kontaminationen, wurde besonderer Wert auf die exakte und saubere Verarbeitung gelegt.

Für die semi-nested PCR wurde das Taq PCR Core Kit 1000 Units von der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Der verwendete Thermocycler (Modell: Personal Cycler) stammt von der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland). Für die Produktherstellung wurden die forward a-Primer und die reverse-Primer der jeweiligen Gene eingesetzt. Sämtliche zur Anwendung gebrachten Primer sind in den Tabellen 3 – 6 aufgelistet.

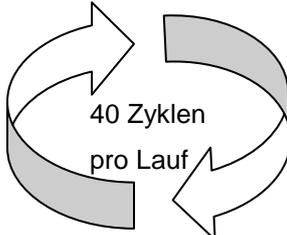
Das bei der Herstellung durch den forward a-Primer entstandene größere Produkt wurde zur relativen Quantifizierung weiterhin in der zweiten PCR (Real-Time PCR) eingesetzt. Dabei wurde als Referenz das Housekeeping-Gen hAct (humanes  $\beta$ -Actin) verwendet. Der Nachweis dieses Gens in einer PCR kann als Positivkontrolle gewertet werden.

**Table 11:** Pipettierschema (Mastermix) des semi-nested PCR-Ansatzes (Thermocycler)

Mastermix (Thermocycler)	
Water PCR grade	15,3 µl
PCR-Puffer (10x)	2,0 µl
Desoxynukleotide (dNTP`s)	0,4 µl
forward a-Primer	0,1 µl
reverse-Primer	0,1 µl
Taq-Polymerase	0,1 µl
Gesamtvolumen	18,0 µl

**Table 12:** Thermocyclerprogramm für den semi-nested PCR-Lauf

Programmverlauf des Thermocyclers	
Denaturierung	30 Sek. bei 94°C
Annealing	30 Sek. bei 57°C
Amplifikation	60 Sek. bei 72°C



### 3.2.5 Relative Quantifizierung mittels Real-Time PCR per Lightcycler®

Die zweite PCR der semi-nested PCR wurde zur relativen Quantifizierung des Produktes als Real-time PCR am LightCycler® Instrument (LightCycler® 2.0 Instrument, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Mit der Methode der relativen Quantifizierung kann das Expressionsverhalten eines bestimmten Gens im Verhältnis zu einem Referenzgen analysiert werden. Der LightCycler® ermöglicht eine quantitative Echtzeitmessung der zyklisch entstehenden Produkte in einem geschlossenen System, das nicht den sich ständig ändernden äußeren Einflüssen unterlegen ist.

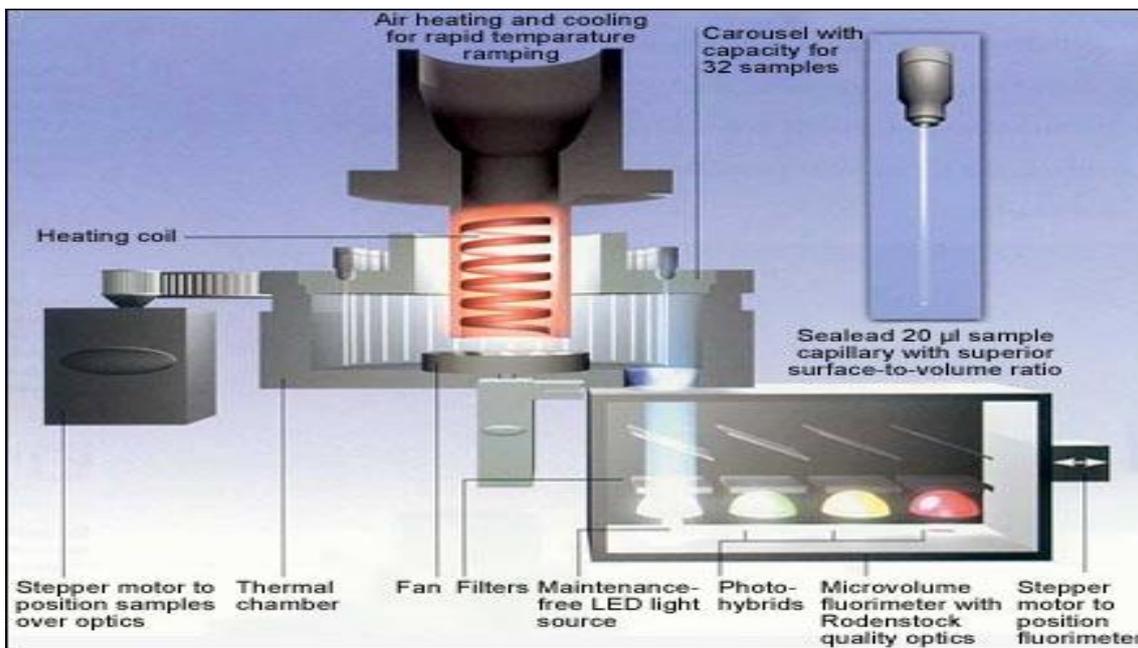
Alle entstandenen Ergebnisse müssen relativ zur Expression des

Housekeeping-Gens  $\beta$ -Aktin betrachtet werden.

### 3.2.5.1 LightCycler® Instrument

Das LightCycler Instrument (LightCycler® 2.0 Instrument, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) ist schematisch betrachtet ein an einen PC gekoppelter Thermocycler mit einer Fluorimeteroptik.

Zum Markieren der zyklisch anfallenden PCR-Produkte wurde ein fluoreszierender Farbstoff namens SYBR Green® (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) eingesetzt.



**Abbildung 1:** Funktionsschema des LightCycler® Instruments

**Quelle:** [http://www.tib-molbiol.de/gen\\_images/1064410995768.jpg](http://www.tib-molbiol.de/gen_images/1064410995768.jpg)

### 3.2.5.2 Reagenzien für die LightCycler®-Läufe

Die Kombination der Reagenzien (LC-Mix), welche für die Durchführung der LightCycler-Läufe benötigt wurden, entstammen dem LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kit der Firma Roche Diagnostics (Mannheim,

Deutschland). Dieser LC-Mix beinhaltet folgende Bestandteile:

- SYBR Green I® (unspezifisch bindender Fluoreszenzfarbstoff)
- FastStart Taq-DNA-Polymerase (katalysierendes Enzym)
- MgCl<sub>2</sub> mit einer Endkonzentration von 1mM (Cofaktor)
- Nukleotidmix („Produktgrundbausteine“)

Zur Einleitung der Reaktion muss die bei Raumtemperatur inaktive FastStart Taq-DNA-Polymerase durch eine Inkubation für 10 Minuten bei 95°C aktiviert werden.

Die Annealingtemperatur für alle Primerpaare (h-ACT, GALNT2, GALNT3, GALNT 6) betrug 62°C. Die cDNA-Proben wurden im Verhältnis 1:10 mit water PCR-Grade verdünnt eingesetzt.

### **3.2.5.3 Durchführung der Messungen am LightCycler®**

Aufgrund der hohen Sensibilität der LightCycler®-Messmethode gegenüber Kontaminationen aus der Umgebung, wurden alle Messungen in einem separaten, geschlossenen Raum ohne Fenster durchgeführt. Zusätzlich wurde vor jedem Lauf die Arbeitsfläche sowie alle Instrumente gründlich mit einer 70 prozentigen Ethanollösung gereinigt, um einer Kontamination der Proben vorzubeugen.

Die Versuchsreihen wurden in verschließbaren Glaskapillaren (LightCycler® Capillaries, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Für die extrahierte cDNA der kultivierten Zelllinien kamen Kapillaren mit einem Volumen von 20 µl und 100 µl zum Einsatz. Der niedrigere cDNA-Gewinn, aufgrund geringer cDNA-Konzentration in den paraffinierten Tumoren, erforderte gegenüber den kultivierten Zelllinien ein höheres Probenvolumen. Demzufolge wurde für die cDNA aus paraffinierten Tumoren ausschließlich Kapillaren mit einem Volumen von 100 µl verwendet.

Die entsprechenden Proben wurden außerhalb des LightCyclers® mittels Pipette (Eppendorf Research Plus, Hamburg, Deutschland) in die Kapillaren pipettiert. Zum Schutz der Proben vor Kontaminationen aus der Umluft wurden

die Kapillaren gleich im Anschluss verschlossen. Darauf folgte das Zentrifugieren der Proben in den unteren Anteil der Kapillaren. Letztlich wurden alle Kapillaren in das Karussell des LightCyclers® platziert, sodass im Anschluss die Analyse der Proben erfolgen konnte.

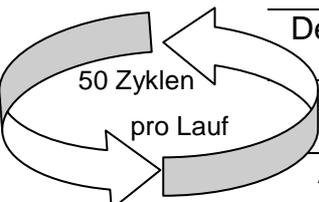
Zur relativen Quantifizierung der amplifizierten Produkte musste für jedes zu untersuchende Gen eine Standardkurve erstellt werden, die eine Effizienzbestimmung der Primerpaare ermöglicht. Hierzu wurde zunächst das große PCR-Produkt eines Gens (GALNT 2, -3 oder -6) mit dem forward a und reverse Primer in einer Semi-Nested-PCR am Thermocycler hergestellt. Es kam ausschließlich cDNA aus der kultivierten Zelllinie von HBL 100 zur Anwendung. Im Anschluss wurde das kleine PCR-Produkt in einer Verdünnungsreihe von  $10^{-3}$  bis  $10^{-10}$  mittels des forward- und rev-Primers am LightCycler® amplifiziert. Weiterhin wurde für die relative Quantifizierung ein konstanter Eichpunkt in Form eines Kalibrators benötigt. Dieser stammte aus der Verdünnungsreihe der am Thermocycler durchgeführten Semi-Nested-PCR. Als Kalibrator wurde das große PCR-Produkt von HBL 100 in der Verdünnungsstufe  $10^{-5}$  eingesetzt. Alle verwendeten Primer wurden jeweils unter einem optimalen PCR-Protokoll angewendet.

**Tabelle 13:** Pipettierschema (Mastermix) zur Real-Time PCR am LightCycler® in 20 µl-Kapillaren (ausschließlich cDNA kultivierter Zelllinien) und 100 µl-Kapillaren (cDNA kultivierter Zelllinien und cDNA paraffinierte Tumoren)

<b>Mastermix (LightCycler®)</b>		
<b>Bestandteile</b>	<b>20 µl-Kapillaren</b>	<b>100 µl-Kapillaren</b>
forward Primer	0,4 µl	0,25 µl
reverse Primer	0,4 µl	0,25 µl
FastStart DNA Master SYBR Green I	4,0 µl	10,00 µl
Water PCR grade	13,2 µl	28,00 µl
cDNA-Probe	2,0 µl	10,00 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl	48,50 µl

**Tabelle 14:** Programmverlauf des LightCyclers®

<b>Programmverlauf (LightCycler®)</b>		
<b>Programmabschnitt</b>	<b>20 µl-Kapillaren</b>	<b>100 µl-Kapillaren</b>
Aktivierung der Polymerase	10 min bei 95°C	10 min bei 95°C
Denaturierung	5 Sek. bei 95°C	15 Sek. bei 95°C
Annealing	5 Sek. bei 62°C	15 Sek. bei 62°C
Amplifikation	12 Sek. bei 72°C	25 Sek. bei 72°C



### 3.2.6 Gelelektrophorese zur PCR-Produktkontrolle

Die am Thermocycler und LightCycler® entstandenen PCR-Produkte wurden zur Kontrolle einer Gelelektrophorese mit einem drei prozentigen Agarosegel unterzogen. Nach Etablierung geeigneter PCR-Protokolle je Primerpaar wurde jeder am Thermocycler und LightCycler® abgeschlossene Lauf kontrolliert. Zur

Herstellung des drei prozentigen Agarosegels wurde, zu einem mit 50 ml TBE-Puffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) gefüllten Erlenmeyerkolben, 1,5 g Seakem LE Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) hinzugegeben und für zwei Minuten in einer Mikrowelle erwärmt. Im Anschluss wurde nach Abkühlung der Lösung, jedoch bevor sie in eine feste gelartige Form überging, 2 µl Ethidiumbromid (Promega Catalys AG, Wallisellen, Schweiz) hinzupipettiert und gut vermengt. Unmittelbar nach der Vermengung des Ethidiumbromids wurde die noch gießfähige Lösung in eine Form gegossen. Die Form war mit einem Kamm ausgestattet, der als Platzhalter für die Probenaufnahmen (Taschen/Kammern) diente. Nach Eintreten des festen Gelzustandes wurde er aus der Form entfernt.

Jeweils die erste Tasche/Kammer einer Reihe auf der linken Seite des Agarose-Gels wurde mit einem 100 Basenpaar DNA-Marker (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) befüllt. So konnte nach dem Lauf, anhand der Banden des 100 Basenpaar DNA-Markers, die Produktgröße der anderen eingesetzten Proben vergleichend eingeschätzt werden.

Die anderen Taschen/Kammern wurden mit dem zu kontrollierenden PCR-Produkt-Ansatz befüllt. Dazu wurde, wie folgend in Tabelle 15 abgebildet, ein Mastermix zusammengestellt.

**Tabelle 15:** Pipettierschema (Mastermix) des PCR-Produkt-Ansatzes für die Gelelektrophorese

<b>Mastermix (Gelelektrophorese)</b>	
destilliertes Wasser	9 µl
Loading-Buffer	3µl
PCR-Produkt	3 µl
Gesamtvolumen	15 µl

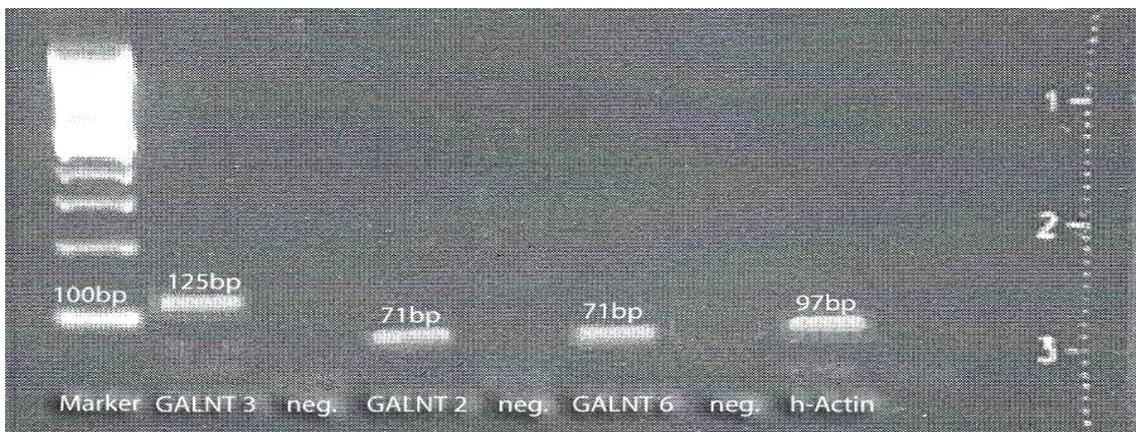
Zum Start der Elektrophorese wurde an das Agarose-Gel, welches in ein Trafogerät der Firma Consort Electrophoresis Power Supply (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) eingebracht war, für etwa 40-50 Minuten eine Spannung von

120 V angelegt. Abhängig von Größe und Ladung der DNA-Moleküle bewegen sich diese mit unterschiedlicher Geschwindigkeit über das als Molekularsieb wirkende Gel. Durch das verwendete Bildgebungsverfahren (Universal Hood White Light Transilluminator, BioRad, Segrate, Italien) wird die doppelsträngige DNA sichtbar. Das dabei digital erzeugte Bild wurde mittels der Quantity One 1-D Software (BioRad, Segrate, Italien) am PC visualisiert.

Die Banden der eingesetzten PCR-Produkte können, zur Kontrolle der Produktlänge, mit den Banden des 100 Basenpaar DNA-Markers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verglichen werden. Oberhalb der Banden ist die Produktlänge in Basenpaaren (bp) angegeben.

Eingesetzt wurden in diesem Lauf von links nach rechts folgende Produkte:

- 100 Basenpaar DNA-Marker (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- GALNT 3-PCR-Produkt (mittels forward Primer generiert)
- Negativkontrolle (RNA-Probe ohne Reverse Transkriptase)
- GALNT 2-PCR-Produkt (mittels forward Primer generiert)
- Negativkontrolle (RNA-Probe ohne Reverse Transkriptase)
- GALNT 6-PCR-Produkt (mittels forward Primer generiert)
- Negativkontrolle (RNA-Probe ohne Reverse Transkriptase)
- Humanes-Actin-PCR-Produkt (mittels forward Primer generiert)



**Abbildung 2:** Agarosegel mit Banden der eingesetzten PCR-Produkte aus einem Thermocyclerlauf

### **3.2.7 DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte**

Um zusätzlich einen Nachweis darüber zu erhalten, dass die mittels der Primer amplifizierten PCR-Produkte aus den zu untersuchenden Genen (GALNT 2, -3, -6) stammen, wurden sie einer Sequenzierung unterzogen. Hierzu wurde die Nukleotid-Abfolge des PCR-Produktes bestimmt und mit der Nukleotid-Abfolge des zu untersuchenden Gens verglichen.

Die Sequenzierung erfolgte am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf im Institut für Pathologie (Direktor Prof. Dr. med. G. Sauter). Das Ergebnis der Untersuchung bestätigte den Ursprung der PCR-Produkte aus den Genen (GALNT 2, -3, -6).

## 4 Ergebnisse

Vor Untersuchung der Tumorzellen wurden alle Primer auf ihre Spezifität hin an Maus-cDNA getestet. Das Ergebnis zeigte, dass keine genomische Maus-DNA durch die Primer amplifiziert wurde.

In den ersten LightCycler®-Läufen wurden kultivierte Tumorzellen in 20 µl-Kapillaren zur relativen Quantifizierung eingesetzt. Aufgrund der relativ niedrig ausfallenden RNA-Konzentration xenotransplanteder Tumoren musste für eine vergleichende Untersuchung kultivierter Tumorzellen und xenotransplanteder Tumoren (in vitro versus in vivo) das Probenvolumen vergrößert werden. Demgemäß wurden folgende Untersuchungen in 100 µl-Kapillaren am LightCycler® durchgeführt. Hierbei wurde jedes Gen (GALNT 2, 3, 6) an jeweils drei unterschiedlichen Chargen der RNA kultivierter Tumorzellen und xenotransplanteder Tumoren untersucht. Die Proben wurden grundsätzlich paarig eingesetzt.

Zur PCR-Produktkontrolle wurden nach LightCycler®- und ThermoCycler®-Läufen Agarosegele angefertigt, mit deren Hilfe eine eingeschränkte Bewertung der Produktqualität ermöglicht wurde. Zur abschließenden Gewinnung eines evidenten Nachweises über das Vorliegen der gesuchten PCR-Produkte, erfolgte eine Sequenzierung am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf im Institut für Pathologie (Direktor Prof. Dr. med. G. Sauter). Das Ergebnis der Sequenzierung bestätigte den Ursprung der PCR-Produkte aus den Genen (GALNT 2, 3, 6).

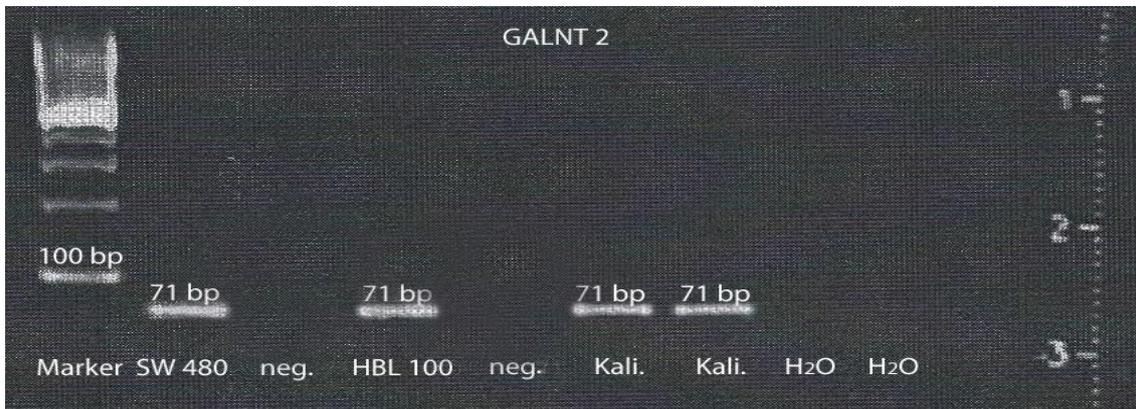
### 4.1 Ergebnisse der Gelelektrophorese zur Kontrolle der am LightCycler® entstandenen PCR-Produkte

Zur initialen Identifizierung der in den PCR-Läufen entstandenen Produkte, wurden diese der Gelelektrophorese unterzogen. Die durch dieses Verfahren gewonnenen Informationen tragen nur eingeschränkt zum eindeutigen Nachweis der entstandenen Produkte bei, da das Verfahren nur auf einem

optischen Vergleich der entstandenen Produktbanden mit den Banden des 100 Basenpaar DNA-Markers beruht. Die Nukleotidsequenz der untersuchten Probe wird außer Acht gelassen. Somit kann der eindeutige Nachweis ausschließlich über eine Sequenzierung erfolgen, bei der die Nukleotidsequenz der gesuchten Glykosyltransferase mit der Nukleotidsequenz der untersuchten Probe verglichen wird.

Beispielhaft wurden in den folgenden Abbildungen 3, 4 und 5 Agarosegele mit den jeweils am LightCycler entstandenen PCR-Produkten der Glykosyltransferasen GALNT 2, 3 und 6 dargestellt. In jedem Lauf wurde ein 100 Basenpaar DNA-Marker auf das Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich bestand der Lauf aus jeweils einer Negativkontrolle, zwei Kalibratoren und zwei Wasserkontrollen. Die Produkte wurden mittels forward und reverse primer in den Zelllinien SW 480 und HBL 100 generiert. Als Negativkontrolle wurde ein Produkt verwendet, welches aus einer cDNA-Synthese hervorging, bei der keine Reverse Transkriptase eingesetzt wurde. Durch das Weglassen der Reversen Transkriptase wurde keine RNA in DNA umgeschrieben. Somit wird in der Negativkontrolle keine Bande erwartet. Für die Wasserkontrolle wurde ausschließlich destilliertes Wasser eingesetzt. Der verwendete Kalibrator wurde aus der Zelllinie HBL 100 hergestellt und um den Faktor  $10^{-5}$  verdünnt. Anhand des 100 Basenpaar DNA-Markers ist die Größe (in Basenpaaren = bp) der Produkte, aus denen sich die Banden darstellen, abzuschätzen.

#### 4.1.1 PCR-Produktkontrolle von GALNT 2 mithilfe eines Agarosegels



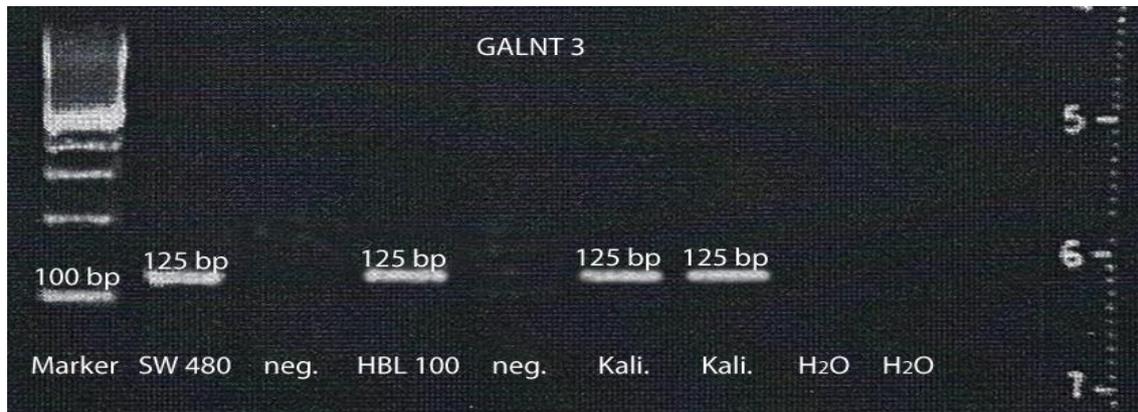
**Abbildung 3:** Darstellung eines drei-prozentigen Agarosegels zur PCR-Produktkontrolle von GALNT 2

Eingesetzt wurden in diesem Lauf von links nach rechts folgende Produkte:

- 100 Basenpaar DNA-Marker (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- GALNT 2-PCR-Produkt von SW 480
- Negativkontrolle
- GALNT 2-PCR-Produkt von HBL 100
- Negativkontrolle
- Kalibrator (HBL 100/10<sup>-5</sup>)
- Kalibrator (HBL 100/10<sup>-5</sup>)
- Wasserkontrolle
- Wasserkontrolle

Auf dem Agarosegel, dargestellt in Abbildung 3, sind deutlich sichtbare Banden des GALNT 2-PCR-Produktes, der Kalibratoren sowie des 100 Basenpaar DNA-Markers zu erkennen. Die Banden der Produkte sowie der Kalibratoren zeichnen sich auf Höhe der 71 Basenpaare ab. In den Wasser- und Negativkontrollen sind keine unerwünschten Nebenprodukte erkennbar, welche als Schlieren oder Doppelbanden sichtbar wären. Das Ergebnis der Elektrophorese deutet auf ein unverfälschtes, 71 Basenpaar großes PCR-Produkt des untersuchten Gens GALNT 2 hin.

#### 4.1.2 PCR-Produktkontrolle von GALNT 3 mithilfe eines Agarosegels



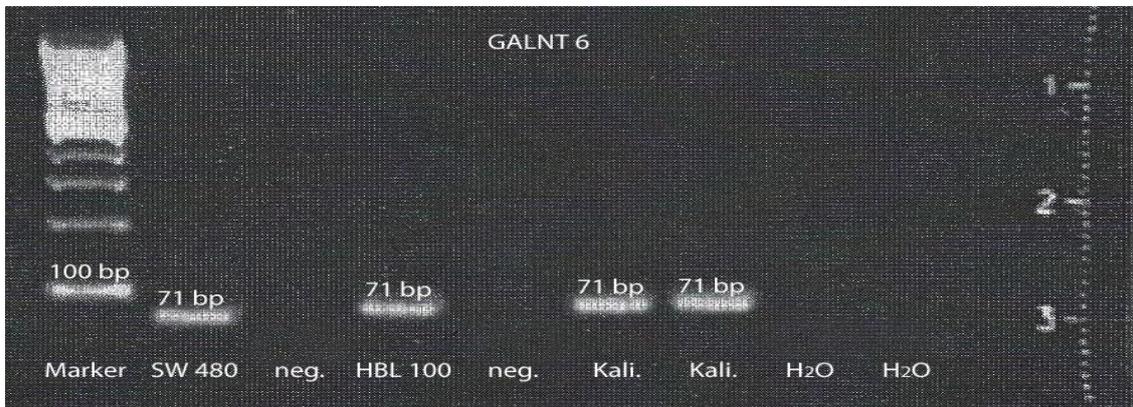
**Abbildung 4:** Darstellung eines drei-prozentigen Agarosegels zur PCR-Produktkontrolle von GALNT 3

Eingesetzt wurden in diesem Lauf von links nach rechts folgende Produkte:

- 100 Basenpaar DNA-Marker (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- GALNT 3-PCR-Produkt von SW 480
- Negativkontrolle
- GALNT 3-PCR-Produkt von HBL 100
- Negativkontrolle
- Kalibrator (HBL 100/10<sup>-5</sup>)
- Kalibrator (HBL 100/10<sup>-5</sup>)
- Wasserkontrolle
- Wasserkontrolle

Auf dem in Abbildung 4 dargestellten Agarosegel sind deutliche Banden des GALNT 3-PCR-Produktes, des 100 Basenpaar DNA-Markers und der Kalibratoren sichtbar. Wie in Abbildung 3 sind auch in dieser Abbildung keine Schlieren oder Doppelbanden in den Wasser- und Negativkontrollen zu erkennen, die auf Nebenprodukte hindeuten würden. Das Ergebnis der Elektrophorese zeigt Banden auf Niveau der 125 Basenpaare. Es ist zu vermuten, dass es sich um das untersuchte Gen GALNT 3 handelt.

#### 4.1.3 PCR-Produktkontrolle von GALNT 6 mithilfe eines Agarosegels



**Abbildung 5:** Darstellung eines drei-prozentigen Agarosegels zur PCR-Produktkontrolle von GALNT 2

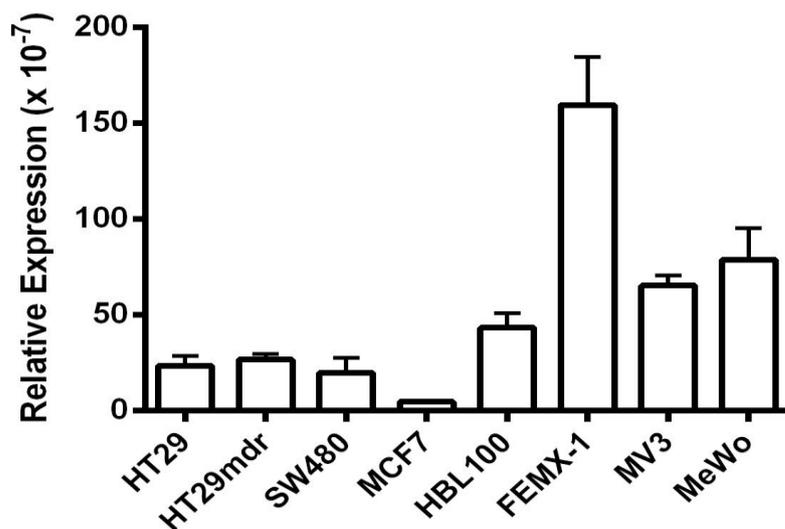
Eingesetzt wurden in diesem Lauf von links nach rechts folgende Produkte:

- 100 Basenpaar DNA-Marker (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- GALNT 6-PCR-Produkt von SW 480
- Negativkontrolle
- GALNT 6-PCR-Produkt von HBL 100
- Negativkontrolle
- Kalibrator (HBL 100/10<sup>-5</sup>)
- Kalibrator (HBL 100/10<sup>-5</sup>)
- Wasserkontrolle
- Wasserkontrolle

Abbildung 5 stellt ein Agarosegel dar, auf welchem deutliche Banden des GALNT 6-PCR-Produktes, des 100 Basenpaar DNA-Markers und der Kalibratoren zu sehen sind. Wie in den beiden vorherigen Abbildungen sind auch in dieser Abbildung keine Schlieren oder Doppelbanden in den Wasser- und Negativkontrollen erkennbar. Das Ergebnis der Elektrophorese deutet auf ein unverfälschtes, 71 Basenpaar großes PCR-Produkt des untersuchten Gens GALNT 6 hin.

## 4.2 Messergebnisse der relativen Quantifizierung von GALNT 2 in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren am LightCycler®

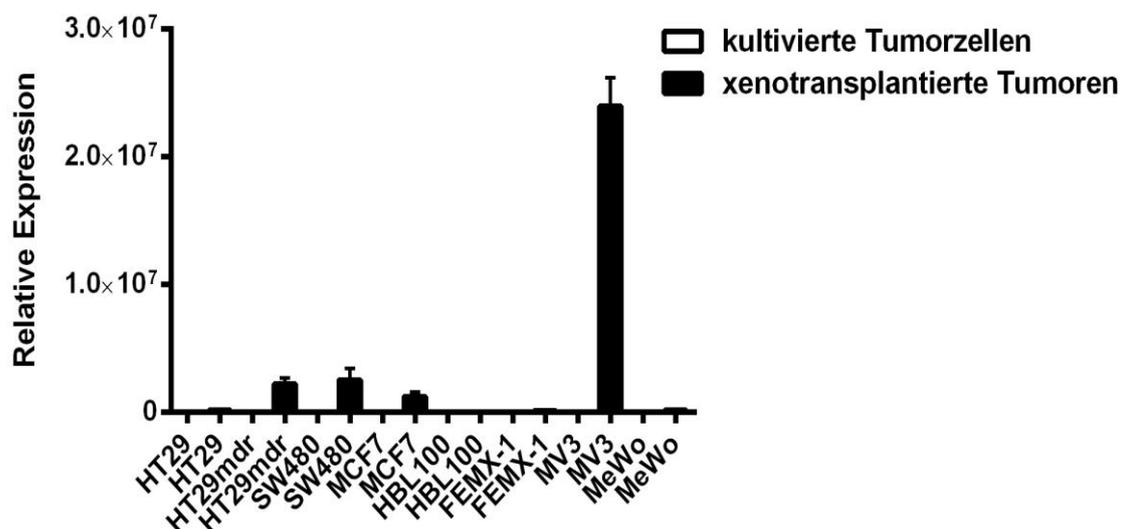
### 4.2.1 Relative Expression von GALNT 2 (in vitro gewachsene Zellen)



**Abbildung 6:** Darstellung der relativen Expression von GALNT 2 in kultivierten Tumorzellen (gemessen in 20 µl-Kapillaren am LightCycler®)

In Abbildung 6 wird die geringe Expression von GALNT 2 in Kolon- und Mammakarzinomen im Vergleich zur Expression in Melanomen deutlich. Eine Ausnahme bildet in dieser Gruppe das Mammakarzinom HBL 100 mit einer durchschnittlich verdoppelten Expression. Die Expression von GALNT 2 in Melanomen zeigt sich verglichen zur Expression in Kolon- und Mammakarzinomen stark erhöht. Außerordentlich stark erhöht stellt sich die Expression bei FEMX-1 dar. Im Vergleich zu MV 3 und MeWo erscheint sie verzweifacht.

#### 4.2.2 Vergleichende Darstellung der relativen Expression von GALNT 2 in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren



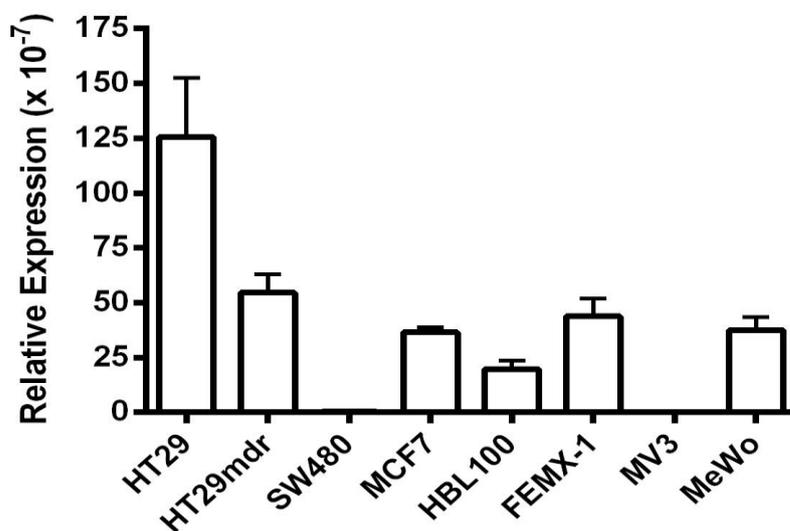
**Abbildung 7:** Darstellung der relativen Expression von GALNT 2 in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren (gemessen in 100  $\mu$ l-Kapillaren am LightCycler®)

Die vergleichende Darstellung der Expressionsergebnisse von GALNT 2 in Abbildung 7 offenbart die geringe Expression in kultivierten Tumorzellen gegenüber der Expression in xenotransplantierten Tumoren. Die Expressionswerte in kultivierten Tumorzellen sind vergleichsweise so gering, dass ausschließlich die Expressionswerte xenotransplantierteter Tumoren in der grafischen Darstellung zum Ausdruck kommen.

Die Expression von GALNT 2 in Melanom MV3 zeigt sich hingegen bei xenotransplantierten Tumoren im Vergleich zu den in vitro gewachsenen Zellen als besonders stark ausgeprägt. Die Expression in den beiden anderen Melanomen FEMX-1 und MeWo ist wiederum kaum vorhanden. Ebenso gering erscheint die Expression beim Kolonkarzinom HT 29. Im Mammakarzinom HBL 100 wird GALNT 2 nicht exprimiert. Die Kolonkarzinome HT 29 mdr und SW 480 sowie das Mammakarzinom MCF 7 weisen im Vergleich zu MV 3 in xenotransplantierten Tumoren eine stark verminderte Expression auf.

### 4.3 Messergebnisse der relativen Quantifizierung von GALNT 3 in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren am LightCycler®

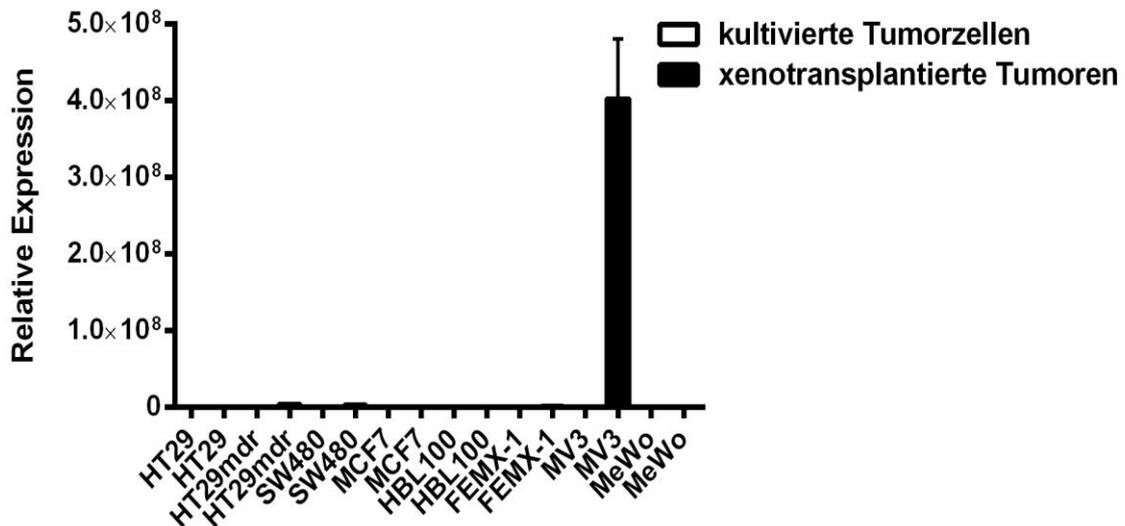
#### 4.3.1 Relative Expression von GALNT 3 (in vitro gewachsene Zellen)



**Abbildung 8:** Darstellung der relativen Expression von GALNT 3 in kultivierten Tumorzellen (gemessen in 20 µl-Kapillaren am LightCycler®)

Die Expression von GALNT 3 zeigt in der Darstellung von Abbildung 8 bei den Kolonkarzinomen HT 29, HT 29 mdr und SW 480 starke Unterschiede. In HT 29 erscheint die Expression insgesamt am stärksten. Im Vergleich zu HT 29 stellt sich die Expression bei HT 29 mdr um die Hälfte reduziert dar. SW 480 exprimiert GALNT 3 nicht. Bei den Mammakarzinomen scheint MCF 7 eine doppelt so hohe Expression aufzuweisen wie HBL 100. Unter den Melanomen weist MeWo eine mit MCF 7 vergleichbare Expression auf. Bei MV 3 ist keine Expression ersichtlich.

#### 4.3.2 Vergleichende Darstellung der relativen Expression von GALNT 3 in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren



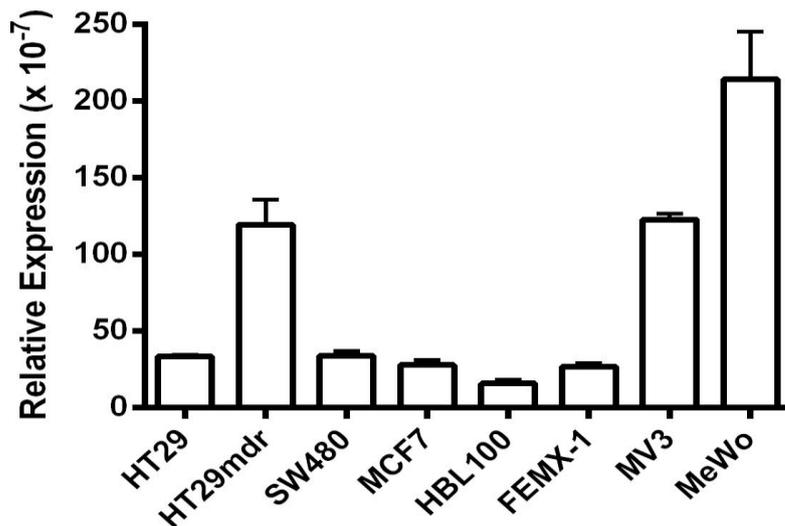
**Abbildung 9:** Darstellung der relativen Expression von GALNT 3 in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren (gemessen in 100 µl-Kapillaren am LightCycler®)

Abbildung 9 offenbart wie Abbildung 7 die geringe Expression der Glykosyltransferase in kultivierten Tumorzellen gegenüber der Expression in xenotransplantierten Tumoren. Die Expressionswerte in kultivierten Tumorzellen erscheinen vergleichsweise so gering, dass ausschließlich Expressionswerte der xenotransplantierten Tumoren in der grafischen Darstellung sichtbar werden.

Dabei hebt sich Melanom MV 3, mit dem stärksten Expressionsergebnis in xenotransplantierten Tumoren, hervor. In den Kolonkarzinomen HT 29 mdr und SW 480 ist eine schwache, in der Abbildung kaum sichtbare Expression zu erkennen. Bei allen weiterhin dargestellten xenotransplantierten Tumoren der Abbildung 9 ist keine Expression von GALNT 3 vorhanden.

#### 4.4 Messergebnisse der relativen Quantifizierung von GALNT 6 in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren am LightCycler®

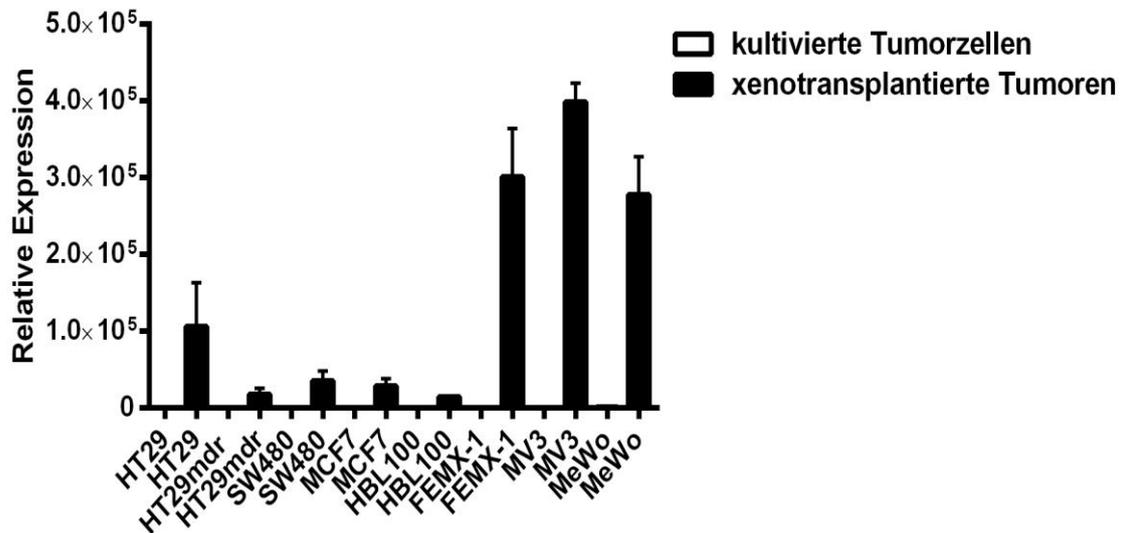
##### 4.4.1 Relative Expression von GALNT 6 (in vitro gewachsene Zellen)



**Abbildung 10:** Darstellung der relativen Expression von GALNT 6 in kultivierten Tumorzellen (gemessen in 20 µl-Kapillaren am LightCycler®)

In Abbildung 10 erscheint die Expression von GALNT 6 in den Kolonkarzinomen HT 29 und SW 480 auf gleichem Niveau und HT 29 mdr mit der dreifachen Rate. Auf annähernd gleichem Niveau wie HT 29 mdr liegt die Expression von GALNT 6 bei MV 3. Bei den Mammakarzinomen zeigt sich im Vergleich zu den weiterhin betrachteten Zelllinien die geringste Expression. MCF 7 weist eine doppelt so hohe Expression wie HBL 100 auf. MeWo zeigt sich im Vergleich zu allen anderen Zelllinien mit der stärksten Expression. Bei MV 3 stellt sich die Expression im Vergleich zu MeWo um annähernd die Hälfte reduziert dar.

#### 4.4.2 Vergleichende Darstellung der relativen Expression von GALNT 6 in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren



**Abbildung 11:** Darstellung der relativen Expression von GALNT 6 in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren (gemessen in 100  $\mu$ l-Kapillaren am LightCycler®)

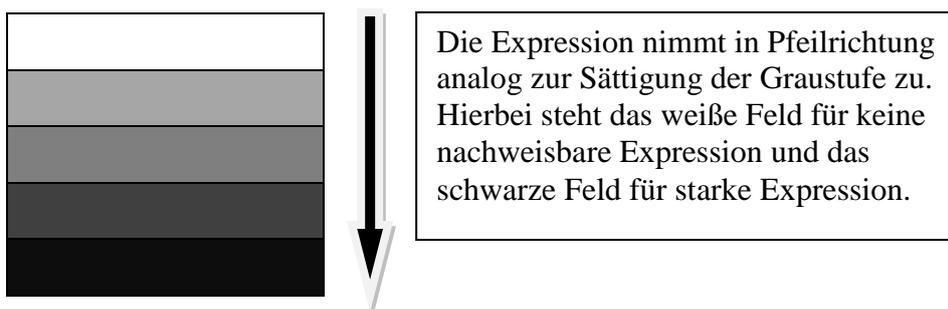
In Abbildung 11 offenbart sich ebenso wie in Abbildung 7 und 9 die geringe Expression der Glykosyltransferase in kultivierten Tumorzellen gegenüber der Expression in xenotransplantierten Tumoren. Die Expressionswerte in kultivierten Tumorzellen erscheinen vergleichsweise so gering, dass nur die Expressionswerte der xenotransplantierten Tumoren von der Grafik erfasst werden.

In Abbildung 11 ist eine stark erhöhte Expression von GALNT 6 in den xenotransplantierten Tumoren der Melanomen ersichtlich. Besonders hoch fällt das Expressionsergebnis bei MV 3 aus. Die Expressionsergebnisse der Kolon- und Mammakarzinome in xenotransplantierten Tumoren erscheinen im Vergleich zu den Melanomen gering. Unter den Kolon- und Mammakarzinomen stellt sich die Expression von HT 29 am höchsten dar.

## 4.6 Relative Expression von GALNT 2, 3 und 6 in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren (in vitro versus in vivo)

Folgender Vergleich der Expressionsergebnisse zwischen den unterschiedlichen Genen kann objektiv gesehen nur als Annäherung an das tatsächliche Ergebnis betrachtet werden. Die Expressionsergebnisse sind streng genommen nur innerhalb der Messreihe eines Gens miteinander vergleichbar, da die Bedingungen zwischen den einzelnen LightCycler®-Läufen voneinander abweichen können.

Für die grafische Darstellung des Expressionsgrades wurde die folgende Bewertungsform gewählt:



### 4.6.1 Vergleichende tabellarische Darstellung der relativen Expression von GALNT 2, 3, und 6 in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren

Die folgende Tabelle stellt Expressionsergebnisse von GALNT 2, 3 und 6 in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren vergleichend dar. Es wurden ausschließlich Ergebnisse der 100 µl-Kapillaren miteinander verglichen. Zusätzlich wurde jeder Zelllinie der Metastasierungsgrad beigelegt.

**Tabelle 18:** Tabellarisch vergleichende Darstellung der relativen Expression von GALNT 2, 3 und 6 in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren (in vitro versus in vivo)

kultivierte/ xenotransplantierte Tumorzellen	Relative Expression der Glykosyltransferasen					
	GALNT 2		GALNT 3		GALNT 6	
	in vitro	in vivo	in vitro	in vivo	in vitro	in vivo
HT 29 (9/9)	■	□	■	□	■	■
HT 29 mdr ( - )	■	■	■	□	■	□
SW 480 (0/7)	■	■	□	□	■	■
MCF 7 (6/8)	■	■	■	□	■	■
HBL 100 (0/4)	■	□	■	□	□	□
FEMX-1 (7/10)	■	□	■	□	■	■
MV 3 (8/10)	■	■	□	■	■	■
MeWo (6/10)	■	□	■	□	■	■

Anhand der Auswertung der in Tabelle 18 dargestellten Expressionsergebnisse lässt sich bei GALNT 6 (in vivo) eine Korrelation zwischen Expression und Metastasierung erahnen. Hierbei stellt MCF 7, mit einer geringen Expression trotz relativ starker Metastasierungstendenz, eine Ausnahme dar. Die weiteren Ergebnisse von GALNT 2, 3 und 6 (in vitro) lassen keinen konstanten Zusammenhang zwischen Expression und Metastasierung erkennen. Nur vereinzelt korreliert die Expression der untersuchten Glykosyltransferasen mit dem Metastasierungsgrad.

## 5 Diskussion

In der Onkologie wird der Metastasierung eine große klinische Bedeutung beigemessen, da von ihrem Auftreten die Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten stark abhängt. Deshalb ist es wichtig, diesen Prozess zu verstehen, um in ihm therapeutisch eingreifen zu können. Bei der Metastasierung spielt die Interaktion der Tumorzelle mit den Nachbarzellen und der sie umgebenden Matrix eine besondere funktionelle Rolle. Um den molekularen Ablauf der Metastasierung verstehen zu können, müssen deshalb besonders die durch Zelladhäsionsmoleküle vermittelten Interaktionen der Tumorzelle verstanden werden. Die Expression von Zelladhäsionsmolekülen spielt während der Metastasierung eine große funktionelle Rolle. Für die Absiedlung einer Metastase aus dem Zellverband des Primärtumors muss die Expression bestimmter epithelialer Zelladhäsionsmoleküle im Primärtumor herabreguliert werden. Dem hingegen müssen für den Austritt einer Metastase aus dem Gefäßsystem in das Zielgewebe andere eher mesenchymale Zelladhäsionsmoleküle der metastatischen Zellen herauf reguliert werden, damit die Tumorzelle an das Endothel am Zielort der Metastase anheften kann. Dabei exprimiert die Tumorzelle Selektinliganden, die aus speziellen Zuckerresten bestehen und von Selektinen erkannt werden. Selektine sind zuckerbindende Transmembranglykoproteine, die meist von Endothelzellen exprimiert werden, wenn eine Entzündung vorliegt. Sie erkennen Zuckerreste auf den Leukozyten und damit binden sie die Leukozyten an die Endothelzelle. Durch diesen Mechanismus werden Leukozyten am Ort einer Entzündung festhalten. Nur über geeignete Selektinliganden, an deren Biosynthese Glykosyltransferasen beteiligt sind, kann die Metastase am Endothel binden und in das umliegende Gewebe transmigrieren.

Die pathophysiologische Bedeutung der GALNTs für die Onkologie wird schon seit einigen Jahren intensiv untersucht. Besonders auffällig erscheint hierbei die unterschiedliche Expression von GALNTs in Tumorzellen und normalen Zellen. Größtenteils wird angenommen, dass die veränderte Expression der

Transferasen im Tumor und die damit verbundene Veränderung der Glykosylierung als Ergebnis der malignen Transformation zu betrachten ist. Infolgedessen wird den GALNTs eine Schlüsselrolle bei der Einleitung der Metastasierung und Invasion zugeordnet.

Gegenstand dieser Arbeit ist es, das Expressionsverhalten der GALNTs 2, 3 und 6 an metastasierenden und nichtmetastasierenden Primärtumoren *in vitro* und *in vivo* vergleichend zu untersuchen. Es sollte herausgefunden werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression der Transferasen und der Metastasierung besteht. Nach Xenotransplantation der humanen Tumorzellen in SCID-Mäuse entwickelten sich Primärtumore, die mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurden. Dabei zeigte sich, dass die Expression von Oberflächenzuckern in den Primärtumoren anders war, als die von den gleichen Tumorzellen, wenn diese *in vitro* in der Zellkultur gewachsen waren (Schumacher et al. 1996). Besonders interessant erscheinen die Veränderungen der adhärenz Eigenschaften von Tumorzellen, da sie eine bedeutende Rolle bei der Metastasierung einnehmen. Zudem soll die Frage nach der Vergleichbarkeit der Expression von GALNTs *in vivo* und *in vitro* gestellt werden. In der Untersuchung wird davon ausgegangen, dass sich die gemessene mRNA-Konzentration annähernd analog zur intrazellulären Enzymkonzentration verhält. Weiterhin wird angenommen, dass ein Anstieg der Enzymkonzentration eine erhöhte Oberflächenexpression von Glykokonjugaten nach sich zieht. Eine Prüfung dieser Sachverhalte konnte diese Untersuchungsmethode naturgemäß nicht leisten.

## **5.1 Expressionsvergleich der GALNTs *in vivo* und *in vitro***

Die Untersuchung des Expressionsverhaltens der GALNTs in kultivierten Tumorzellen und xenotransplantierten Tumoren zeigt eine stark voneinander abweichende Expression der Transferasen. Es wurde festgestellt, dass das Expressionsmuster, der *in vivo* und *in vitro* erfolgten Untersuchungen, weitestgehend nicht in Deckung gebracht werden kann. Zudem stellte sich

heraus, dass die Expression, gemessen in kultivierten Tumorzellen, im Vergleich zu den xenotransplantierten Tumoren, generell äußerst niedrig ausfällt. In den vergleichenden Darstellungen der Abbildungen 7, 9 und 11, gemessen in 100 µl-Kapillaren, ist die Expression der kultivierten Tumorzellen nicht nachweisbar. Als gut nachweisbar stellt sich hingegen die Expression der Transferasen in xenotransplantierten Tumoren in denselben Tumoren dar.

In den folgenden Abschnitten wird die Expression der GALNTs 2, 3 und 6 in den drei Entitäten Kolon, Mamma und malignem Melanom untersucht. Es wurden unterschiedliche Zelllinien der zuvor genannten Entitäten mit ihrem aus der Forschung bekannten Metastasierungsverhalten zugrunde gelegt.

### **5.1.1 Expressionsverhalten von GALNT 2, 3 und 6**

Nach Brooks et al. (2002) wird ein intrazellulärer Expressionsanstieg bei Glykosyltransferasen im Allgemeinen mit malignen Veränderungen in Verbindung gebracht. Lange et al. (2014) gehen von einer Förderung der Metastasierung durch einen Expressionsanstieg von Transferasen aus, die an der Kernstruktur 1 und 2 agieren. Da die untersuchten GALNTs an der Bildung der Kernstrukturen beteiligt sind, trifft die Aussage auch auf sie zu. Freire-de-Lima et al. (2011) zeigten in ihrer Untersuchung an Prostatatumorzellen, dass eine unterdrückte Expression von GALNT 3 und 6 den Effekt von TGF- $\beta$  auf onkofetale Fibronectin inhibiert und somit die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des EMT-Prozesses sinkt. Nach Park et al. (2010) resultiert die Glykolysierung von MUC 1 durch GALNT 6 in einer Förderung der Zellproliferation und Invasion. Park et al. (2011) erklären, dass Brustkrebszelllinien das Wachstum invasiv ausrichten, wenn das Fibronectin der Extrazellulärmatrix durch Überexpression von GALNT 6 O-glykolysiert wird. Zudem demonstrieren Park et al. (2011) in einem dreidimensionalen Transfektionsmodell die durch GALNT 6 - Überexpression entstandene Zerstörung der Brustdrüsenstruktur. Als Basis der Untersuchung diente die Brustkrebszelllinie MCF10A. Maupin et al. (2010) weisen in ihren

Untersuchungen ein hohes Expressionslevel von GALNT 3 in EMT induzierten Pankreastumorzelllinien nach. Taniuchi et al. (2011) weisen ebenfalls hohe Expressionslevel von GALNT 3 im Pankreastumor nach und gehen aufgrund dessen von invasivem Tumorwachstum aus. Sämtliche soeben aufgeführten Untersuchungsergebnisse unterstützen die Annahme, dass eine erhöhte Expression mit einer gesteigerten Metastasierungswahrscheinlichkeit assoziiert wird. Laut White et al. (1995) wird GALNT 2 im Körper ubiquitär exprimiert. GALNT 3 und 6 werden hingegen reguliert und nur in spezifischen Organen exprimiert. Ausschließlich im Pankreas und Testis wurde das natürliche Vorkommen von GALNT 3 beschrieben (Bennett et al. 1996). Die Expression von GALNT 6 ist im gesunden Körper nach Bennett et al. (1999) auf Plazenta und Trachea beschränkt.

Durchgängig konnte die Expression der GALNTs 2, 3 und 6 in allen untersuchten Primärtumoren nachgewiesen werden. Wurden Transferasen ausnahmsweise in der in vivo Untersuchung nicht exprimiert, so wurden sie in der in vitro Untersuchung exprimiert und umgekehrt. Bei GALNT 6 (in vivo) konnte in den Entitäten Kolon und Melanoma ein Zusammenhang zwischen der Expression der Transferase und dem Metastasierungsverhalten weitestgehend nachgewiesen werden. Die Expression von GALNT 6 im Mammakarzinom MCF 7 hingegen, spiegelt das Metastasierungspotential der Zelllinie nicht deutlich wider. Die gemessene Expression von GALNT 6 in MCF 7 stellt sich im Vergleich zu den in anderen Tumoren gemessenen Werten, als niedrig dar. Besonders im Vergleich zu den hohen Expressionswerten der Melanome sind die Werte in MCF 7 nur schwach ausgeprägt. Auch Brooks et al. (2007) stellten in ihren Untersuchungen fest, dass GALNT 6 in MCF 7 grundsätzlich nur schwach exprimiert wird. Weiterhin zeigt eine histologische Untersuchung am Xenograft-Maus-Modell das Fehlen von Selektinliganden auf MCF 7 (Stübke et al. 2012). Demzufolge kann angenommen werden, dass die Zelllinie aufgrund des Fehlens von Selektinliganden weniger Glykokonjugate auf der Zelloberfläche ausbildet und somit weniger GALNTs für die Biosynthese der Glykokonjugate exprimiert.

Wie bereits in Kapitel 4 erwähnt, lassen die Ergebnisse von GALNT 2 und 3 sowie GALNT 6 (in vitro) keinen konstanten Zusammenhang zwischen Expression und Metastasierung erkennen. Nur vereinzelt korreliert die Expression der untersuchten GALNTs mit dem Metastasierungsgrad.

Schlussfolgernd lassen die Ergebnisse erkennen, dass die Expression der untersuchten GALNTs keine Rückschlüsse auf die Metastasierung der untersuchten Tumorentitäten zulässt. Einschränkend festzuhalten sind hierbei die Ergebnisse von GALNT 6 (in vivo), die außer im Tumor MCF 7 Zusammenhänge zwischen Expression und Metastasierung erkennen lassen. Daraus ist abzuleiten, dass weitere Untersuchungen von GALNT 6 (in vivo) im Rahmen der Tumorforschung erfolgen sollten.

## 6 Zusammenfassung

Neuere Untersuchungen weisen auf eine enge Verknüpfung zwischen veränderten Glykosylierung im Primärtumor und dem Auftreten einer Fernmetastasierung hin. Da das Glykosylierungsmuster von Tumorzellen durch Glykosyltransferasen bedingt wird, war es Zielsetzung dieser Arbeit, die Expression von m-RNA der Glykosyltransferasen GALNT 2, 3 und 6, mittels relativer Quantifizierung (RT-PCR), an metastasierenden und nichtmetastasierenden Primärtumoren aus Xenograftmodellen humaner Tumorzellen zu untersuchen. Es wurden Mamma- und Kolonkarzinome sowie maligne Melanome untersucht. Eine vergleichende Darstellung der Ergebnisse sollte mögliche Zusammenhänge zwischen der Ausprägung der Expression von Glykosyltransferasen im Tumor und der Metastasierung aufzeigen. Obendrein sollte eine Aussage zur Vergleichbarkeit der Expression der Transferasen in vivo und in vitro getroffen werden.

Die Untersuchungen ergaben eine durchgängige Expression der Glykosyltransferasen 2, 3 und 6 in allen untersuchten Primärtumoren, wobei sich das Expressionsmuster der in vivo und in vitro gewachsene Tumorzellen deutlich unterschied. Die Expression der Glykosyltransferasen der in vitro kultivierten Tumorzellen war im Vergleich zu den xenotransplantierten Tumoren im Allgemeinen wesentlich geringer. Die Ergebnisse von GALNT 2 und 3 sowie GALNT 6 (in vitro) weisen keinen Zusammenhang zwischen Expression und Metastasierung auf. Nur in Einzelfällen spiegelt das Expressionsmuster die Metastasierung der untersuchten Glykosyltransferasen wider. Als Ausnahme hebt sich GALNT 6 (in vivo) in den Entitäten Kolon und Melanoma, durch Korrelation zwischen Metastasierung und Expression, von den weiteren analysierten Transferasen ab. Das bedeutet, es besteht eine erhöhte Expression bei erhöhter Metastasierungstendenz und umgekehrt eine niedrige Expression bei niedriger Metastasierungstendenz. Diesem Ergebnis zur Folge sollten weitere Untersuchungen zur Bedeutung von GALNT 6 bei der Metastasierung erfolgen.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

bp	base pairs
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP`s	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EA2	Episodic Ataxia Type 2
EC	Enzym Commission
EMTs	epithelial-mesenchymal transitions
FCS	fetal calf serum
FFPE	formalin-fixed, paraffin-embedded
FGF23	Fibroblast growth factor 23
g	Gramm
GALNT	UDP- $\alpha$ -D-N-Acetylgalaktosamin: Polypeptid <i>N</i> Acetylgalaktosaminyltransferase / ppGalNAcT
gp	glycoprotein
hACT	humanes Actin
LC-Mix	LightCycler-Mix
MET	mesenchymal-epithelial transitions
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumdichlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mRNA	messenger ribonucleic acid
Muc	mucin
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer

o	Oxygenium (Sauerstoff)
OH	Hydroxylgruppe
PBS	phosphate buffered saline
PC	Personal Computer
PCR	Polymerase chain reaction
ph	pondus Hydrogenii
pmol	Picomol
ppGalNAcTs	UDP- $\alpha$ -D-N-Acetylglaktosamin: Polypeptid <i>N</i> Actylgalaktosaminyltransferasen / GALNTs
rev-Primer	reverse-Primer
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
RPMI 1640-Medium	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	realtime-quantitative Polymerase-Chain-Reaction
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
Sek.	Sekunde
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus-Polymerase
TBE-Puffer	Tris/Borate/EDTA-Puffer
TGF- $\beta$	Transforming growth factor-beta
Tm	Melting Temperature
tRNA	transfer ribonucleic acid
U	Unit
UDP	Uridindiphosphat
U/min	Umdrehung pro Minute
V	Volt
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
°C	Grad Celsius

## 8 Literaturverzeichnis

Bennett EP, Hassan H, Clausen H (1996) cDNA cloning and expression of a novel human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine. Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-t3. *J. Biol. Chem.* 271, 17006-17012.

Bennett EP, Hassan H, Mandel U, Hollingsworth MA, Akisawa N, Ikematsu Y, Merx G, van Kessel AG, Olofsson S, Clausen H (1999) Cloning and characterization of a close homologue of human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-T3, designated GalNAc-T6. Evidence for genetic but not functional redundancy. *The Journal of Biological Chemistry.* 3;274(36):25362-70.

Brooks SA, Dwek MV, Schumacher U (2002a) *Functional & Molecular Glycobiology.* BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford UK. 31-37

Brooks SA, Dwek MV, Schumacher U (2002b) *Functional & Molecular Glycobiology.* BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford UK. 33

Brooks SA, Dwek MV, Schumacher U (2002c) *Functional & Molecular Glycobiology.* BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford UK. 94-95

Brooks SA, Dwek MV, Schumacher U (2002d) *Functional & Molecular Glycobiology.* BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford UK. 295-297

Brooks SA, Carter TM, Bennett EP, Clausen H, Mandel U (2007) Immunolocalisation of members of the polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase (ppGalNAc-T) family is consistent with biologically relevant altered cell surface glycosylation in breast cancer. *Acta histochemica.* 109(4), 273-284.

Freire-de-Lima L, Gelfenbeyn K, Ding Y, Mandel U, Clausen H, Handa K, Hakomori SI (2011) Involvement of O-glycosylation defining oncofetal fibronectin in epithelial-mesenchymal transition process. PNAS 108, 17690-17695.

Hakomori S (2002) Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle. Hakomori, S. (2002). Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(16), 10231-10233.

Iwasaki H, Zhang Y, Tachibana K, Gotoh M, Kikuchi N, Kwon Y-D, Togayachi A, Kudo T, Kubota T, Narimatsu H (2003) Initiation of O-glycan synthesis in IgA1 hinge region is determined by a single enzyme, UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2. The Journal of Biological Chemistry. 278:5613-5621.

Kannagi R (1997) Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. Glycoconjugate Journal. 14: 577-584.

Kato K, Jeanneau C, Tarp M A, Benet-Pagès A, Lorenz-Depiereux B, Bennett E P, Mandel U, Strom TM, Clausen H (2006) Polypeptide GalNAc-transferase T3 and Familial Tumoral Calcinosis: Secretion of Fibroblast Growth Factor 23 requires O-glycosylation. Journal of Biological Chemistry. 281(27), 18370-18377.

Lange T, Samatov TR, Tonevitsky AG, Schumacher U (2014) Importance of altered glycoprotein-bound N- and O-glycans for epithelial-to-mesenchymal transition and adhesion of cancer cells. Carbohydrate Research. pii: S0008-6215(14)00025-1.

Matsui T, Kojima H, Suzuki H, Hamajima H, Nakazato H, Ito K, Nakao A, Sakamoto J (2004) Sialyl Lewis x expression as a predictor of the prognosis of

colon carcinoma patients in a prospective randomized clinical trial. *Japanese journal of clinical oncology*. 34(10), 588-593.

Maupin KA, Sinha A, Eugster E, Miller J, Ross J, Paulino V, Keshamouni VG, Tran N, Berens M, Webb C, Haab BB (2010) Glycogene expression alterations associated with pancreatic cancer epithelial-mesenchymal transition in complementary model systems. *PLoS ONE* 5, e13002.

Pang P-C, Chiu PCN, Lee C-L, Chang L-Y, Panico M, Morris HR, Haslam SM, Khoo K-H, Clark GF, Yeung WSB, Dell A (2011) Human Sperm Binding is Mediated by the Sialyl-Lewis x Oligosaccharide on the Zona Pellucida. *Science Magazine*. 333 (6050): 1761-1764.

Park JH, Nishidate T, Kijima K, Ohashi T, Takegawa K, Fujikane T, Hirata K, Nakamura Y, Katagiri T (2010) Critical roles of mucin 1 glycosylation by transactivated polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 in mammary carcinogenesis. *Cancer Res*. 70, 2759-2769.

Park JH, Katagiri T, Chung S, Kijima K, Nakamura Y (2011) Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 disrupts mammary acinar morphogenesis through O-glycosylation of fibronectin. *Neoplasia* 13, 320-326.

Samatov TR, Tonevitsky AG, Schumacher U (2013) Epithelial-mesenchymal transition: focus on metastatic cascade, alternative splicing, non-coding RNAs and modulating compounds. *Molecular cancer*. 23;12(1):107. doi: 10.1186/1476-4598-12-107.

Schumacher U, Mohamed M, Mitchell BS (1996) Differential expression of carbohydrate residues in human breast and colon cancer cell lines grown in vitro and in vivo in SCID mice. *The Cancer journal*. 9(5), 247-254.

Schumacher U, Adam E (1997) Lectin histochemical HPA-binding pattern of human breast and colon cancers is associated with metastases formation in severe combined immunodeficient mice. *The Histochemical journal*. 29(9), 677-684.

Stübke K, Wicklein D, Herich L, Schumacher U, Nehmann N (2012) Selectin-deficiency reduces the number of spontaneous metastases in a xenograft model of human breast cancer. *Cancer Letters*. 321(1), 89-99.

Tam WL, Weinberg RA (2013) The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature medicine*. 19(11):1438-49.

Taniuchi K, Cerny RL, Tanouchi A, Kohno K, Kotani N, Honke K, Saibara T, Hollingsworth MA (2011) Overexpression of GalNAc-transferase GalNAc-T3 promotes pancreatic cancer cell growth. *Oncogene* 30, 4843-4854.

Thies A, Mauer S, Fodstad O, Schumacher U (2007) Clinically proven markers of metastasis predict metastatic spread of human melanoma cells engrafted in scid mice. *British journal of cancer*, 96(4), 609-616.

Wandall HH, Hassan H, Mirgorodskaya E, Kristensen AK, Roepstorff P, Bennett EP, Nielsen PA, Hollingsworth MA, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Clausen H (1997) Substrate specificities of three members of the human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family. *The Journal of Biological Chemistry*. 272, 23503-23514.

White T, Bennett EP, Takio K, Sørensen T, Bonding N, Clausen H (1995) Purification and cDNA cloning of a human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. *J. Biol. Chem*. 270, 24156-24165.

## 9 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die mich bei der Verwirklichung dieser Arbeit unterstützt haben. Ganz besonders möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Udo Schumacher für die Bereitstellung des Themas sowie die stets aufgeschlossene und freundliche Art der Unterstützung danken. Meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Reinhard Müller danke ich für die entgegengebrachte Hilfe bei Organisation und Realisierung der im Labor erfolgten Untersuchungen. Weiter möchte ich mich bei den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Instituts für die Hilfsbereitschaft bedanken.

Meinem Freund Dr. med. dent. Wojciech Bialecki möchte ich für die guten Gespräche, seinen unterstützenden Rat und die mitreißende Motivation danken. Nicht zu vergessen sind an dieser Stelle meine Eltern Marion und Manfred Krüger, die mir in dieser Zeit eine seelische und moralische Stütze waren. Gleiches gilt für meine liebe Freundin Daniela Bernhard, die es in der schwierigen Zeit des Schreibens klaglos mit mir aushielt und es immer wieder fertig brachte mich von Neuem zu motivieren.

## 10 Lebenslauf

Name	Mathias Krüger
Geburtsdatum	27.03.1980
Geburtsort	Bremerhaven

## 11 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....