

**HE5/CD52 und
die α 1-3-Fucosyltransferasen des humanen
Nebenhodens**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs
Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von **Olaf Nagel** aus Hamburg

Hamburg 2003

Diese Arbeit entstand als externe Doktorarbeit am Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg von Mai 1999 bis Dezember 2002.

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. C. Kirchhoff

Datum der Disputation: 11.07.2003

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
1 Einleitung.....	7
1.1 Zuckermotive in Glykoproteinen - struktureller Aspekt.....	7
1.2 Vielfalt der Glykostrukturen in biologischen Systemen – funktioneller Aspekt..	10
1.3 Die Bedeutung von Glykostrukturen für die Fortpflanzung.....	11
1.4 Das Zelloberflächenantigen HE5/CD52.....	13
1.5 α 1-3-Fucosyltransferasen.....	18
2 Problemstellung.....	22
3 Material und Methoden.....	23
3.1 Vervielfältigung von DNA.....	23
3.1.1 Klonierung in Bakterien.....	23
3.1.1.1 Plasmid-Minipräparation.....	25
3.1.1.2 Plasmid-Midipräparation.....	25
3.1.1.3 Plasmid-Maxipräparation.....	26
3.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	26
3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	28
3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten.....	29
3.4 DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung.....	29
3.5 Spaltung von DNA durch Restriktions-Endonukleasen.....	30
3.6 DNA-Sequenzierung.....	31
3.7 Stellenspezifische punktgenaue Mutagenese.....	33
3.8 cDNA-Synthese	35
3.9 Quantitative Echtzeit-RT-PCR.....	35
3.10 Folch-Extraktion aus Seminalplasma.....	40
3.11 Auftrennung und Nachweis von Proteinen.....	41
3.11.1 Gelelektrophoretische Trennung von Proteinen.....	41
3.11.2 Proteintransfer auf eine Membran.....	42
3.11.3 Immundetektion.....	42
3.12 Zellkultur.....	44

3.13	Transiente Transfektion von BHK-Zellen.....	44
3.14	Indirekte Immunfluoreszenz von Zellen.....	45
3.15	PNGase-F-Spaltung.....	46
3.16	Exoglycosidase-Spaltung.....	46
3.17	<i>In-vitro</i> -Fucosylierung.....	47
4	Ergebnisse.....	48
4.1	HE5/CD52.....	48
4.1.1	Charakterisierung von HE5/CD52 durch monoklonale Antikörper.....	48
4.1.2	Rekombinante Expression von HE5/CD52 in BHK-Zellen.....	49
4.1.3	Charakterisierung des rekombinant exprimierten HE5/CD52 mit Hilfe von Antikörpern.....	50
4.1.4	Generierung und rekombinante Expression des HE5/CD52- β -Allels.....	51
4.1.5	Herstellung des Konstrukts zur Transfektion mit HE5/CD52- β	52
4.1.6	Expression des HE5/CD52- β in BHK-Zellen.....	53
4.1.7	Charakterisierung des rekombinanten HE5/CD52- α	54
4.1.8	PNGase F-Spaltung des rekombinanten HE5/CD52.....	54
4.1.9	Untersuchung des rekombinanten HE5/CD52 aus BHK-Zellen mit dem spermienspezifischen Antikörper H6-3C4.....	56
4.1.10	Charakterisierung des Glykotops in nativem HE5/CD52 durch sequenzielle Exoglycosidase-Spaltung.....	57
4.1.11	<i>In-vitro</i> -Fucosylierung eines Folch-Extrakts aus humanem Seminalplasma.....	60
4.2	Die α1-3 Fucosyltransferasen des Nebenhodens.....	63
4.2.1	Nachweis und Quantifizierung der α 1-3 Fucosyltransferasen auf mRNA- Ebene im humanenen Nebenhoden.....	63
4.2.2	Auswahl der Oligonukleotid-Primer und Etablierung eines RT-PCR- Assays.....	63
4.2.2.1	Theoretische Überlegungen zur Oligonukleotid-Primer-Auswahl.....	63
4.2.2.2	Vorversuche und Gewinnung der Template für die Standards.....	70
4.2.3	Standardreihen und Schmelzpunktanalysen der im RT-PCR-Assay verwendeten Sequenzabschnitte.....	71
4.2.3.1	FUT3-Amplifikation.....	72

4.2.3.2 FUT4-Amplifikation.....	74
4.2.3.3 FUT5-Amplifikation.....	75
4.2.3.4 FUT6-Amplifikation.....	76
4.2.3.5 FUT7-Amplifikation.....	77
4.2.3.6 FUT9-Amplifikation.....	79
4.2.3.7 β -Actin-Amplifikation.....	80
4.2.4 Quantifizierung der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs in den ver- schiedenen Organen des humanen männlichen Genitaltrakts.....	82
4.2.4.1 Quantifizierung der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs im Nebenhoden....	82
4.2.4.2 Häufigkeit der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs in den Kontroll- geweben Niere und Leber.....	89
4.2.4.3 Häufigkeit der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs im Hoden.....	90
4.2.4.4 Häufigkeit der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs in der Prostata.....	91
4.2.4.5 Expression der FUT6-mRNA in Organen des männlichen Genital- traktes im direkten Vergleich.....	93
4.2.5 Entwicklung einer alternativer Quantifizierungsmethode zur Unter- suchung der mRNA-Häufigkeitsverteilung.....	95
5 Diskussion.....	101
5.1 Das Zelloberflächenantigen HE5/CD52.....	101
5.1.1 Rekombinante Expression von HE5/CD52.....	101
5.1.2 Das spermien-spezifische Glykotop des nativen HE5/CD52.....	105
5.1.3 <i>In-vitro</i> Fucosylierung des nativen HE5/CD52.....	107
5.2 Die α1-3-Fucosyltransferasen im männlichen Genitaltrakt.....	108
5.2.1 Häufigkeitsverteilung der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs im Nebenhoden und Hoden.....	108
5.2.2 Vergleich der durch Fuc-TIII oder Fuc-TVI fucosylierten Glykostrukturen im Genitaltrakt.....	109
5.2.3 Mögliche Funktionen der Fuc-TVI.....	110
5.3 Methodische Überlegungen zum Echt-Zeit RT-PCR-Assay.....	111
5.3.1 RT-PCR-Assays zur relativen und absoluten Quantifizierung.....	111
5.3.2 Genomische Kontamination.....	112
5.3.3 Verwendung eines externen Standards in RT-PCR-Assays.....	113
5.4 Die alternative Quantifizierungsmethode.....	116

6 Zusammenfassung.....	118
7 Summary.....	120
8 Literatur.....	122
9 Anhang.....	137
9.1 Vektorkarte pCR3.1Uni.....	137
9.2 Tabellen zu den Häufigkeitsverteilungen der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs..	138
9.3 R/S-Sätze der verwendeten Chemikalien.....	143
9.4 Posterpräsentationen.....	144
Danksagung.....	145
Lebenslauf.....	146

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
au	<i>arbitrary units</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CAMPATH	<i>Cambridge Pathology</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Da	Dalton
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>deoxyribonucleosid triphosphate</i>
<i>E. coli</i>	<i>Eschericia coli</i>
EDTA	Etylendiamin-N,N,N',N',-tetraacetat
Fuc	Fucose
Gal	Galaktose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde(n)
IR	Infrarot
KAc	Kaliumacetat
kD	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Man	Mannose
MgAc ₂	Magnesiumacetat
min	Minute(n)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
s	Sekunde(n)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
VIM2	NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc

1. Einleitung

Für eine Wechselwirkung und ein Zusammenspiel von Zellen ist die Zelloberfläche der beteiligten Zellen von entscheidender Bedeutung. Auf der Zelloberfläche werden die an der Kommunikation zwischen Zellen beteiligten Strukturen präsentiert. Sie bilden die Voraussetzung für Erkennungs- und Adhäsionsvorgänge. Immunreaktionen wären anders kaum möglich. Auch die Interaktion von Gameten bei der Fortpflanzung ist eng mit den auf der Zelloberfläche präsentierten Strukturen verknüpft. Diese Oberflächenstrukturen sind überwiegend Proteine, die in den meisten Fällen posttranslational durch Glykosylierung modifiziert sind. Da Glykostrukturen im Unterschied zu Proteinen nicht von einem Templat abhängig und linear sind, sondern zusätzlich auch verzweigt sein können, ist die Möglichkeit für eine Vielzahl unterschiedlichster Strukturen gegeben, die die Funktion eines Glykoproteins in seinem biologischen Kontext beeinflussen oder determinieren können.

1.1 Zuckermotive in Glykoproteinen - struktureller Aspekt

Zu den häufigsten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen gehört die Glykosylierung. Hierbei sind Kohlenhydratstrukturen kovalent an das Protein gebunden. Nahezu alle Sekretproteine tragen diese Art der Modifikation.

Proteine können grundsätzlich drei Arten von Glykosylierung tragen, zum einen N-Glykosylierung oder O-Glykosylierung, die sich in der Bindungsstelle am Peptid und im Aufbau der Zuckerstruktur selber unterscheiden, woraus weitere Untergruppen resultieren. Das in dieser Arbeit untersuchte Glykopeptid HE5/CD52 ist ausschließlich N-glykosyliert; daher wird nur diese Art der Glykosylierung detailliert beschrieben.

Zum anderen gibt es eine Art der Modifizierung eines Peptids oder Proteins durch eine Struktur, die außer der Zuckerkomponente eine Lipidkomponente enthält. Es handelt sich um den GPI-Anker (Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol), der für eine Verankerung von Proteinen in Membranen sorgt. Das Glykopeptid HE5/CD52 trägt ein solches Strukturelement, das für seine Membranverankerung verantwortlich ist.

Die Zuckerstruktur einer Glykankomponente ist von vielen Faktoren abhängig. So spielen beispielsweise der Zelltyp und das Alter des exprimierenden Zelltyps eine Rolle. Bei rekombinanter Expression von Glykopeptiden ist deshalb die Auswahl des Expressionssystems entscheidend (Conradt et al. 1996).

Ein gemeinsames Merkmal all dieser unterschiedlich exprimierenden Systeme ist jedoch der generelle Ablauf der Glykosylierung. Hierfür ist in jedem System ein genau koordinierter räumlicher und zeitlicher Ablauf erforderlich. Die zentrale Rolle spielen Enzyme, die aktivierte Monosaccharidkomponenten übertragen, die Glykosyltransferasen.

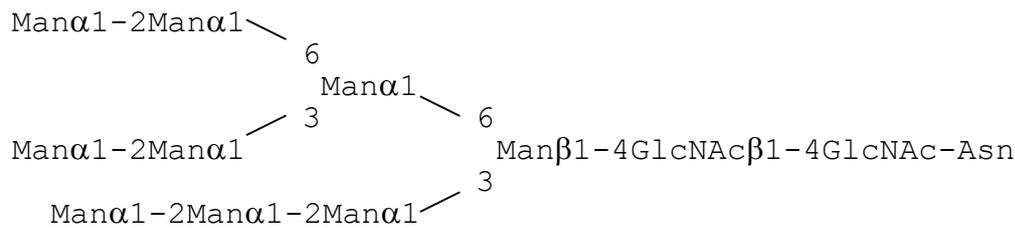
N-Glykane

N-Glykane sind N-glykosidisch über die Amidfunktion eines Asparagins an ein Protein gebundene Kohlenhydratstrukturen. Das Asparagin muss üblicherweise innerhalb eines Sequons, d. h. eines bestimmten Aminosäuretripletts liegen, nämlich Asn-X-Ser/Thr, wobei X jede beliebige Aminosäure außer Prolin sein kann. Das Vorliegen eines solchen Sequons ist meistens notwendig. Allerdings sind nicht alle innerhalb eines Sequons liegenden Asparagine tatsächlich glykosyliert. Es gibt auch Ausnahmen, bei denen ein Protein eine N-Glykosylierung an einem Asparagin trägt, das nicht Bestandteil eines derartigen Sequons ist, beispielsweise innerhalb der Aminosäuresequenz Asn-X-Cys (Miletich et al. 1990).

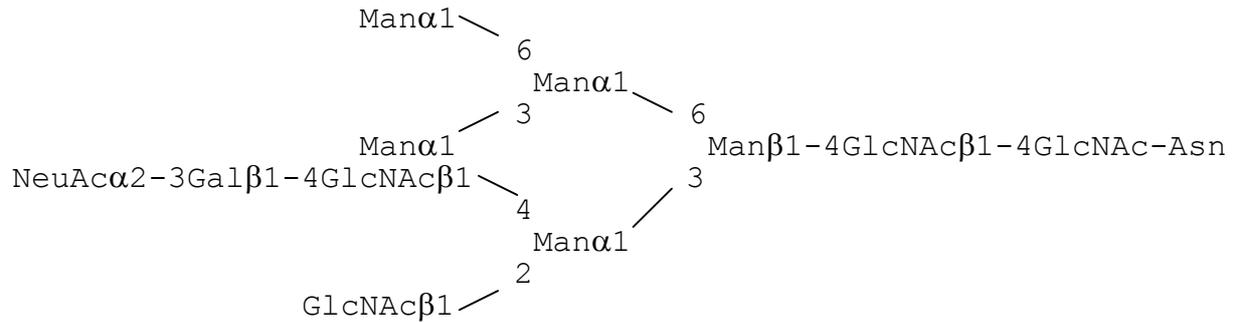
Den unterschiedlichen N-Glykan-Typen - oligomannosidischer Typ (*high-mannose-type*), hybridartiger Typ (*hybrid-type*) und komplexer Typ (*complex-type*) - gemeinsam ist ein Pentasaccharid (*pentacore*) aus zwei N-Acetylglucosamin-Einheiten und drei Mannosebausteinen $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Dieses gemeinsame Grundmotiv resultiert aus einem Vorläuferzuckermotiv, das bereits vorgefertigt als Ganzes (Dolicholvorläufer) auf das Peptid übertragen wird. Es handelt sich hierbei um die Struktur $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Doli}$, die im Endoplasmatischen Reticulum auf die naszierende Peptidkette übertragen wird. Durch Aktivität verschiedener Exoglykosidasen kommt es im Weiteren zu einer Verkürzung dieser Struktur (*truncation, trimming*) auf $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$. In den Kompartimenten des Golgi kommt es zur weiteren Prozessierung der Zuckerstruktur durch Reaktion von Exoglykosidasen und Glykosyltransferasen. Es werden letztendlich Strukturen vom oligomannosidischen, hybridartigen oder komplexen Typ erhalten (Kornfeld und Kornfeld 1985).

Abbildung 1.1 zeigt die drei Untertypen der N-Glykosylierung. Im oligomannosidischen Typ ist Mannose einziger Baustein der Antennen, im hybridartigen Typ kommen neben ausschließlich mannosehaltigen Antennen auch solche mit Lactosamineinheiten und, wie im Beispiel gezeigt, terminaler Sialinsäure vor. Der komplexe Typ schließlich stellt den vielfältigsten Untertyp dar, er kann viele verschiedene terminale Substituenten tragen und trägt zur enormen strukturellen Heterogenität eines Glykoproteins bei (Conradt et al. 1996).

a)



b)



c)

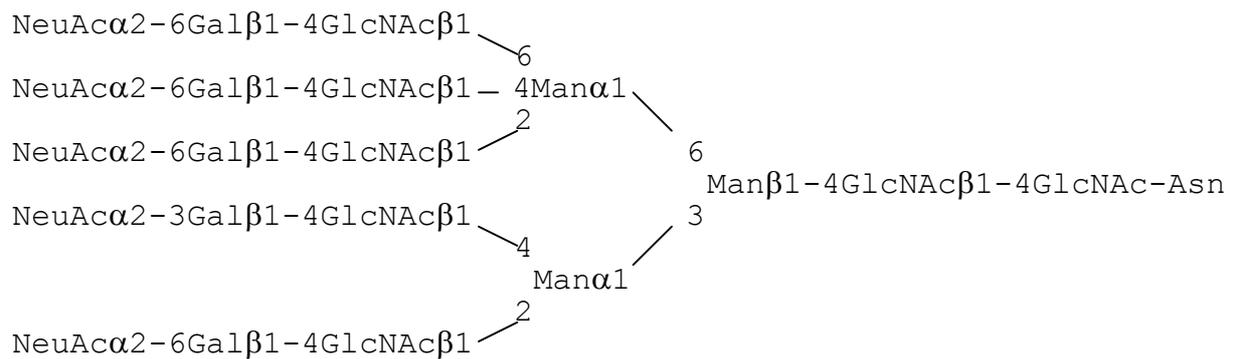


Abb. 1.1 N-Glykane vom oligomannosidischen (a), hybridartigen (b) sowie komplexen (c) Typ. Allen diesen Subtypen der N-Glykane gemeinsam ist das Pentasaccharid $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ am Asparagin des glykosylierten Peptids (nach Kobata 1992).

O-Glykane

O-Glykane sind Zuckerstrukturen, die über die Hydroxyfunktion eines Serins oder Threonins kovalent an ein Peptid gebunden sind. Mucine beispielsweise sind stark O-glykosyliert und vermitteln der darunter liegenden Mucosa über diese Glykosylierung Schutz.

Es gibt hier nicht wie im Falle der N-Glykosylierung ein Vorläufermolekül wie die Dolicholphosphat-Zuckerstruktur, die vorgefertigt als Ganzes auf das Protein übertragen wird. Auch eine Prozessierung (*trimming*, *truncation*) wie im Falle der N-Glykosylierung durch Glykosidasen findet hier nicht statt. Vielmehr ist der erste Schritt der O-Glykosylierung die

kovalente Anknüpfung eines N-Acetylgalactosamins (Deschuyteneer et al. 1988) aus aktiviertem UDP-Galactosamin an ein Serin oder Threonin der Peptidkette in α -Verknüpfung und das sequenzielle Anknüpfen weiterer Zucker. Für diesen und alle weiteren Schritte beim Aufbau der O-Glykan-Struktur werden Nukleotidzucker als Substrate verwendet (Goochee et al. 1991). Es gibt keine gemeinsame Kernstruktur wie das Pentasaccharid $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ bei den N-Glykanen, es gibt vielmehr verschiedene Gruppen mit jeweils gemeinsamer Kernstruktur.

1.2 Vielfalt der Glykostrukturen in biologischen Systemen - funktioneller Aspekt

Die strukturelle Vielfalt der an Proteine gebundenen Kohlenhydratstrukturen wirft die Frage nach ihrer Bedeutung auf (Varki 1993). Die Glyko-Komponente nimmt Einfluss auf allgemeine Eigenschaften des Proteins, an das sie gebunden ist. Hierzu zählen physikochemische sowie biologische Eigenschaften, die durch die Bindung an bestimmten Stellen des Proteins sowie durch die hydrodynamischen Eigenschaften der Glykokomponente beeinflusst werden. Dies kann Schutz vor Proteolyse und thermischer Inaktivierung des Glykoproteins bewirken. Ebenso können auch Löslichkeit und dadurch bedingte Vermeidung von Aggregation, Aktivität, Antigenizität und *In-vivo*-Halbwertszeiten und darüber indirekt die Aktivität beeinflusst werden. Auch auf die Faltung der naszierenden Peptidkette, auf die Ausbildung von Disulfidbrücken sowie auf Sekretion wird über Glykosylierung Einfluss genommen (Liu 1992, Varki 1993).

So wurde für Erythropoietin ein durch terminale Sialylierung der Glykostrukturen vermittelter Schutz vor proteolytischer Degradation nachgewiesen (Goldwasser et al. 1974), ebenso für Gewebe-Plasminogen-Aktivator (Wittwer und Howard 1990) und für Interferone (Cantell et al. 1992). Ein Einfluss auf die Löslichkeit wurde für Fibrinogen beschrieben. Ein Fehlen der N-Glykosylierung bewirkt die Bildung unlöslicher Komplexe (Langer et al. 1988). Eine Beeinflussung der Aktivität durch den Sialylierungsstatus wurde für Erythropoietin beschrieben. Während desialyliertes humanes Erythropoietin im *In-vitro*-Experiment kaum Aktivitätsveränderung zeigt, ist die Aktivität in der *In-vivo*-Situation im Vergleich zum nativen Produkt deutlich reduziert (Imai et al. 1990, Yamaguchi et al. 1991).

Der Kohlenhydratanteil kann aber nicht nur allgemeine Eigenschaften des Glykoproteins beeinflussen. Die Glykokomponente kann auch spezifisch wirken, z. B. als spezifischer

Rezeptor bei Infektionen oder als Ligand bei Adhäsionsvorgängen (Ronin 1998). Hierbei ist nicht ausreichend, dass überhaupt eine Glykosylierung vorliegt, vielmehr ist, wenn die Glykokomponente als Bindungspartner auftritt, deren genaue Struktur von entscheidender Bedeutung.

Vor dem Einwandern von Leukozyten in entzündetes Gewebe (*homing*) findet ein Abbremsen der Leukozyten (*rolling*) statt. Dies wird ermöglicht durch spezifische Wechselwirkung von Selektinen mit Zuckermotiven auf Zelloberflächen zwischen Endothelzellen und Leukozyten (McEver et al. 1995).

Die genauere Kenntnis der Struktur und Funktion einer Glykokomponente in einem Glykopeptid ist erforderlich bei Anwendung eines rekombinant exprimierten Glykopeptids als Therapeutikum oder Impfstoff im Menschen. Im rekombinanten Produkt dürfen keine als Antigen wirkenden Glykostrukturen vorhanden sein. So ist 1% des humanen Serum-IgG gegen die Glykostruktur Gal(α 1-3)-Gal β 1-4GlcNAc gerichtet (Hamadeh et al. 1992), für deren Synthese eine α 1-3-Galactosyltransferase benötigt wird. Die meisten Säuger besitzen ein derartiges Enzym, im Menschen allerdings ist das dieses Enzym kodierende Gen inaktiviert (Joziase et al. 1991). Dies muss bei der Entwicklung von Therapeutika für den Menschen berücksichtigt werden (Jenkins und Curling 1994). Weiter ist von entscheidender Bedeutung, dass das Glykopeptid nicht sofort wieder vom Körper entsorgt wird. Hierbei ist der Status der Sialylierung von essenzieller Bedeutung. Beispielsweise werden in Säugern mit Hilfe des in der Leber befindlichen Asialoglykoproteinrezeptors diejenigen Glykoproteine, die keine terminale Sialylierung aufweisen, aus dem Blut entfernt (Monroe und Huber 1994).

1.3 Die Bedeutung von Glykostrukturen für die Fortpflanzung

In vielen biologischen Prozessen wird Beteiligung von kovalent an Proteine oder Lipide gebundenen Kohlenhydratstrukturen diskutiert, in einigen Fällen, besonders bei Zelladhäsionsprozessen (Varki 1993), ist dies bereits nachgewiesen.

Auch im Bereich der Fortpflanzung gibt es zahlreiche Glykoproteine, bei denen dem Zuckeranteil funktionelle Bedeutung zukommt oder vermutet wird (Benoff 1997).

Gut untersucht ist beispielsweise die Glykokalix des Eis, die Zona pellucida, die der Plasmamembran der Eizelle überlagert ist. Die Zona pellucida besteht im Wesentlichen aus drei Glykoproteinen, die O-Glykane sowie N-Glykane des komplexen Typs enthalten (Bleil und Wassarman 1980, Wassarman 1988) und die mit ihrer Glykokomponente an der Bindung

der Spermien beteiligt sind. Während die Speziespezifität der Befruchtung bei Fehlen der Zona pellucida aufgehoben ist (im *In-vitro*-Experiment), ist bei Vorhandensein der Zona pellucida meistens Speziespezifität gewährleistet.

Fucose kommt in vielen Kohlenhydratstrukturen vor, die an Fortpflanzungsvorgängen beteiligt sind. Dabei ist Fucose Bestandteil von N- und O-Glykanen und kommt sowohl in Typ-I- und Typ-II-Strukturen in exponierter Stellung als terminale Komponente vor.

Ebenso wie beim Rollen von Leukozyten an Gefäßwänden unter Beteiligung von sLe^x (McEver et al. 1995) ist hier ein entscheidender Beitrag von Fucose als Teil eines Bindungspartners möglich. Sie ist als terminale Komponente gut sichtbar für Bindungs- oder Adhäsionspartner. Fucose ist außerdem als 6-Desoxy-Zucker prädestiniert für die Bildung hydrophober Bereiche, die es auch innerhalb von Kohlenhydratstrukturen gibt, obwohl Zucker eigentlich polare, gut wasserlösliche Stoffe sind.

Ein interessantes fucosyliertes Glykoprotein ist Glycodelin. Es wird sowohl im weiblichen als auch im männlichen Genitaltrakt gefunden, die Glykosylierung ist hierbei unterschiedlich. Während Glycodelin A aus dem weiblichen Genitaltrakt die Spermien-Ei-Bindung unterbindet, beobachtet man dies beim Glycodelin S aus dem männlichen Genitaltrakt, dessen in Seminalvesikeln gefundene Glykoform außergewöhnlich fucosereich ist, nicht (Seppälä et al. 2002). Dies lässt die Frage nach der Funktion der Fucosylierung im männlichen Genitaltrakt in diesem und in anderen Fällen interessant erscheinen.

Humanes Seminalplasma ist zudem eine reichhaltige Quelle freier Oligosaccharide, die ausschließlich dem Typ II zugehörig sind (Galβ1-4GlcNAc) und zu einem grossen Teil mono- oder difucosyliert sind (Chalabi et al. 2002). Ein derart häufiges Auftreten peripherer Fucosylierung legt die Frage nach ihrer Funktion nahe.

Für die Bindung von Spermien an das Zona-pellucida-Glycoprotein 3 in der Maus ist im *In-vitro*-Experiment für eine Bindung mit hoher Affinität ein Fucoserest in α1-3-Bindung an N-Acetylglucosamin erforderlich (Johnston et al. 1998).

Die Bindung eines Fucose bindenden Proteins aus Bullensperma an das Oviductepithel als Start zur Bildung eines Spermreservoirs im Rind wird diskutiert (Ignotz et al. 2001).

Somit kommt Fucose als Bestandteil von Glykoproteinen, die im Bereich Fortpflanzung funktionell relevant sind, in vielen Fällen wichtige Bedeutung zu.

1.4 Das Zelloberflächenantigen HE5/CD52

Das humane Zelloberflächenantigen CD52 wird sowohl auf Lymphozyten als auch im Nebenhoden des männlichen Genitaltrakts im Seminalplasma, auf der Oberfläche distaler epididymaler Spermien, im Nebenhodenepithel und auf ejakulierten Spermien gefunden. Es gibt einen gegen das Lymphozyten-CD52 gerichteten monoklonalen Antikörper, den CAMPATH-1, der klinische Anwendung findet bei Leukämie, Knochenmarkstransplantationen, Organtransplantationen, rheumatoider Arthritis sowie multipler Sklerose (Hale 2001). Das Vorkommen großer Mengen der mRNA im Nebenhoden des Mannes wurde durch Screening einer humanen Nebenhoden-cDNA-Bibliothek (Kirchhoff et al. 1993) gefunden. Die mRNA wurde zunächst als HE5 bezeichnet. Später stellte sich heraus, dass das Lymphozyten-CD52 und das Nebenhoden-HE5 Produkte desselben Gens auf Chromosom 1 sind. Ihre Protein- oder besser Peptid-Primärstruktur mit einer Länge von 12 Aminosäuren des reifen Peptids ist identisch. Unterschiede sind in den gewebspezifischen posttranslationalen Modifikationen GPI-Anker sowie N-Glykosylierung zu finden. Es gibt zwei Allele des HE5/CD52-Gens (Kirchhoff et al. 1993, Hale et al. 1996).

```

HE5- $\alpha$   GGA CAA AAC GAC ACC AGC CAA ACC AGC AGC CCC TCA
HE5- $\beta$    GGA CAA AAC GAC ACC AGC CAA ACC AGC AGC CCC TCA
           g  q  n  d  t  s  q  t  s  s  p  s

GCA TCC AGC AAC ATA AGC GGA GGC ...
GCA TCC AGC AGC ATG AGC GGA GGC ...
  a  s  s  n  i  s  g  g
           s  m
            $\omega$ +4  $\omega$ +5

```

Abb. 1.2 Vergleich der kodierenden Sequenzen für die beiden Allele des HE5/CD52-Gens. Dargestellt ist der Bereich, der das Peptid nach Spaltung durch die Signalpeptidase kodiert. Die obere Sequenz kodiert für HE5- α , die untere für HE5- β . Die Allele unterscheiden sich an den die Aminosäuren ω +4 sowie ω +5 kodierenden Basen (die als Großbuchstaben aufgeführten Nukleotide sind fett hervorgehoben). Die in der oberen Reihe aufgeführte Sequenz kodiert für die 12 Aminosäuren des reifen Peptids, die in der unteren Reihe aufgeführte Sequenz ist Teil der Anker-Signal-Sequenz, die abgespalten wird, so dass C-terminal eine vorgefertigte GPI-Anker-Struktur mit Hilfe einer putativen Transamidase an das Peptid gebunden werden kann. Beide Allele weisen außerdem eine kodierende Sequenz für ein N-terminales, 24 Aminosäuren langes Signalpeptid auf (nicht gezeigt). Die resultierende Peptidsequenz des reifen Peptids ist durch fett hervorgehobene Kleinbuchstaben angezeigt.

Die beiden Allele unterscheiden sich in ihrer resultierenden Aminosäuresequenz innerhalb der Anker-Signalsequenz. Es handelt sich um die Positionen $\omega+4$ und $\omega+5$ (Abb. 1.2), die einen Einfluss auf die Ankeranheftung haben könnten. Diese Positionsbezeichnung (Eisenhaber et al. 1998) bezeichnet den Carboxyterminus des reifen Peptids als ω -Stelle. Das GPI-Anker-Signalpeptid, das im Vorläuferpeptid noch vorhanden ist, beginnt an der Position $\omega+1$. Nach proteolytischer Spaltung dieses C-terminalen Signalpeptids und Anknüpfen einer vorgefertigten GPI-Struktureinheit durch eine putative Transamidase liegt ein Peptid vor, das anstelle einer hydrophoben Peptidsequenz durch den GPI-Anker in der Membran verankert werden kann.

Im HE5 α entsprechen die Positionen $\omega+4$ und $\omega+5$ den Aminosäuren Asparagin und Isoleucin, im HE5 β sind dies die Aminosäuren Serin und Methionin. Beide Allele sind rekombinant exprimiert worden, das β -Allel wird als schwächer exprimiert beschrieben (Hale et al. 1996).

Wie aus Abbildung 1.3 ersichtlich, bedeckt HE5/CD52 die gesamte Oberfläche humaner ejakulierter Spermien.

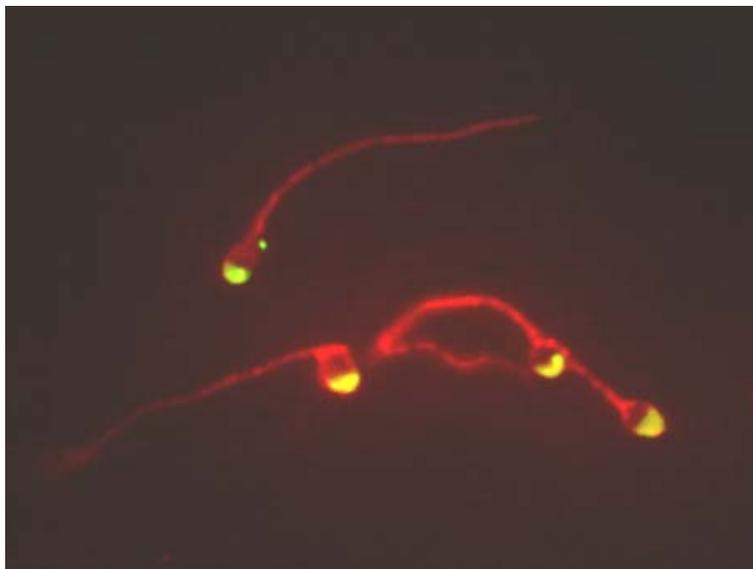


Abb.1.3 Detektion des HE5/CD52 Antigens (rot) durch indirekte Cy3-Immunfluoreszenz auf der gesamten Oberfläche humaner ejakulierter Spermien. Als Kontrolle diente das inneracrosomale Membranantigen CD46 (gelb). Die Abbildung wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr. C. Kirchhoff.

CD52 ist sowohl auf Lymphozyten als auch auf der Spermienoberfläche über einen C-terminal gelegenen GPI-Anker in der Membran verankert. Dieses Strukturelement

ermöglicht theoretisch eine deutlich höhere laterale Mobilität innerhalb der Membran, als dies bei einer Membranverankerung durch Transmembrandomänen der Fall ist.

In Abbildung 1.4 ist die Struktur des reifen Genitaltrakt-HE5/CD52 gezeigt, aus der einige der im Folgenden beschriebenen Unterschiede des Lymphozyten- und des Genitaltraktprodukts ersichtlich sind (Schröter et al. 1999).

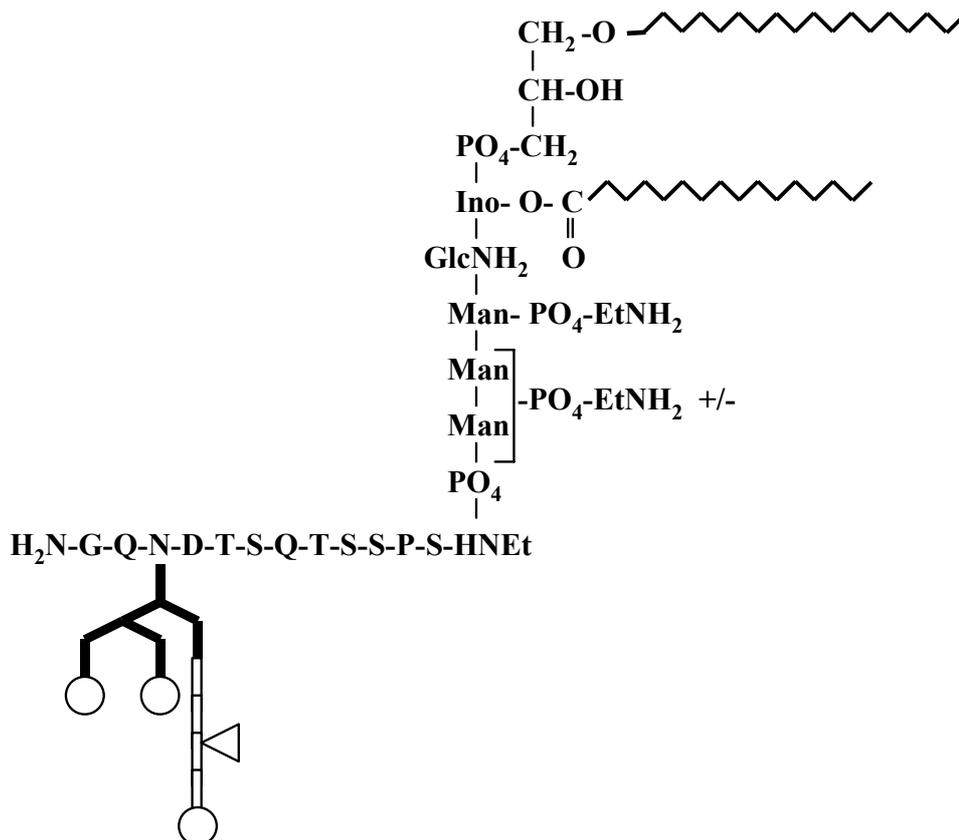


Abb.1.4 Schematische Darstellung des HE5/CD52-Peptids. Gezeigt ist das reife HE5/CD52, das mit Hilfe einer C-terminalen GPI-Struktur membranverankert ist. HE5/CD52 weist am Asparagin an Position 3 seiner Aminosäuresequenz eine Glykosylierungsstelle auf. Hier ist ein N-Glykan vom komplexen Typ gebunden, welches im HE5/CD52 aus dem männlichen Genitaltrakt durch ausgeprägte Mikroheterogenität gekennzeichnet ist. Als Beispiel gezeigt ist hier ein triantennäres N-Glykan. Die ausgefüllten Balken zeigen die Struktur Man₃GlcNAc₂, die weißen Balken zeigen Lactosamin-Einheiten, der Kreis zeigt Sialinsäure an, das Dreieck steht für periphere Fucose. Proximale Fucosylierung ist in dieser Darstellung nicht gezeigt (Schröter et al. 1999).

Für das Lymphozyten-CD52 wurde eine Analyse sowohl der GPI- als auch der N-Glykan-Strukturen durchgeführt (Treumann et al. 1995). Eine später durchgeführte detaillierte Strukturanalyse des Genitaltrakt-HE5/CD52 (Schröter et al. 1999) zeigte, dass sich die posttranslationalen gewebspezifischen Modifikationen GPI-Anker sowie N-Glykanstruktur in Lymphozyten- und Genitaltraktprodukt unterscheiden. Der GPI-Anker des Lymphozyten-

Produkts ist durch Di-Stearoyl-PI oder durch inositol-palmitoyliertes Stearyl-Arachidony-PI (Acyl-Gruppen am Glycerol) charakterisiert (Treumann et al. 1995). Im Gegensatz hierzu weist der GPI-Anker des aus Seminalplasma isolierten HE5/CD52 eine ausschließlich monoalkylierte Glycerolkomponente auf (sn1-Alkyl-2-lyso-Glycerol) (Schröter et al. 1999). Inwieweit diesen strukturellen Unterschieden funktionelle Bedeutung zukommt, ist nicht geklärt. Für DAF (*decay accelerating factor*, CD55) ist beschrieben, dass nach einer *In-vitro*-Modifizierung zu einem Lyso-Glycerol-Anker eine Änderung der Fähigkeit beobachtet wurde, in Membranen zu integrieren (Walter et al. 1992).

Beide Produkte weisen in ihrer Aminosäuresequenz an Position 3 ein innerhalb eines Sequons gelegenes Asparagin auf und sind tatsächlich N-glykosyliert. Die Mikroheterogenität des Genitaltrakt-CD52 ist mit etwa 100 unterschiedlichen N-Glykanstrukturen deutlich ausgeprägter als die des Lymphozyten-CD52, das etwa 10 bis 20 unterschiedliche Formen aufweist (Treumann et al. 1995). Des Weiteren unterscheiden sich die Zuckerstrukturen bezüglich ihrer Antennarität, ihres Sialylierungsstatus und in ihrer peripheren Fucosylierung. Während im Lymphozyten-Produkt nur tetraantennäre Oligosaccharide gefunden werden, können diese im Genitaltrakt-Produkt bi- bis hexaantennär sowie verzweigt sein. Während die überwiegende Anzahl der Glykoformen des Lymphozyten-CD52 terminal α 2-6-sialyliert ist, liegt beim HE5/CD52 aus dem Genitaltrakt in über 80 % der Zuckerketten terminale α 2-3-Sialylierung vor. Das Lymphozytenprodukt ist zwei- bis vierfach negativ geladen, die Glykoformen des Genitaltrakt-HE5/CD52 können Ladungen von einfach bis siebenfach negativ bewirken. Während beide Produkte proximale α 1-6-Fucosylierung aufweisen, kommt terminale α 1-3-Fucosylierung nur beim Genitaltrakt-HE5/CD52 vor, das Ausmaß der peripheren Fucosylierung beträgt 10 bis 15 % (Schröter et al. 1999, Kirchhoff und Schröter 2001).

Das reiche Vorkommen von HE5/CD52 auf der Spermienoberfläche während der Passage durch den Nebenhoden (Abb. 1.5) korreliert mit dem Erwerb der Befruchtungsfähigkeit (daher auch die Bezeichnung „Hauptreifungsantigen“ bei Nagern, Kirchhoff 1996) der Spermien. Während testikuläre Spermien, die noch kein HE5/CD52 tragen, nicht befruchtungsfähig und nicht zu gerichteter Beweglichkeit befähigt sind, ist dies bei Spermien mit HE5/CD52 auf ihrer Zelloberfläche der Fall. Die Übertragung des HE5/CD52 einschließlich des GPI-Ankers, also Insertion in die Spermienmembran, erfolgt in großem Umfang während der Spermienreifung im Nebenhoden. HE5/CD52 wird posttestikulär durch das Genitaltraktepithel synthetisiert und nach Ausschüttung in die Seminalflüssigkeit in die Spermienmembran integriert (Kirchhoff und Hale 1996).

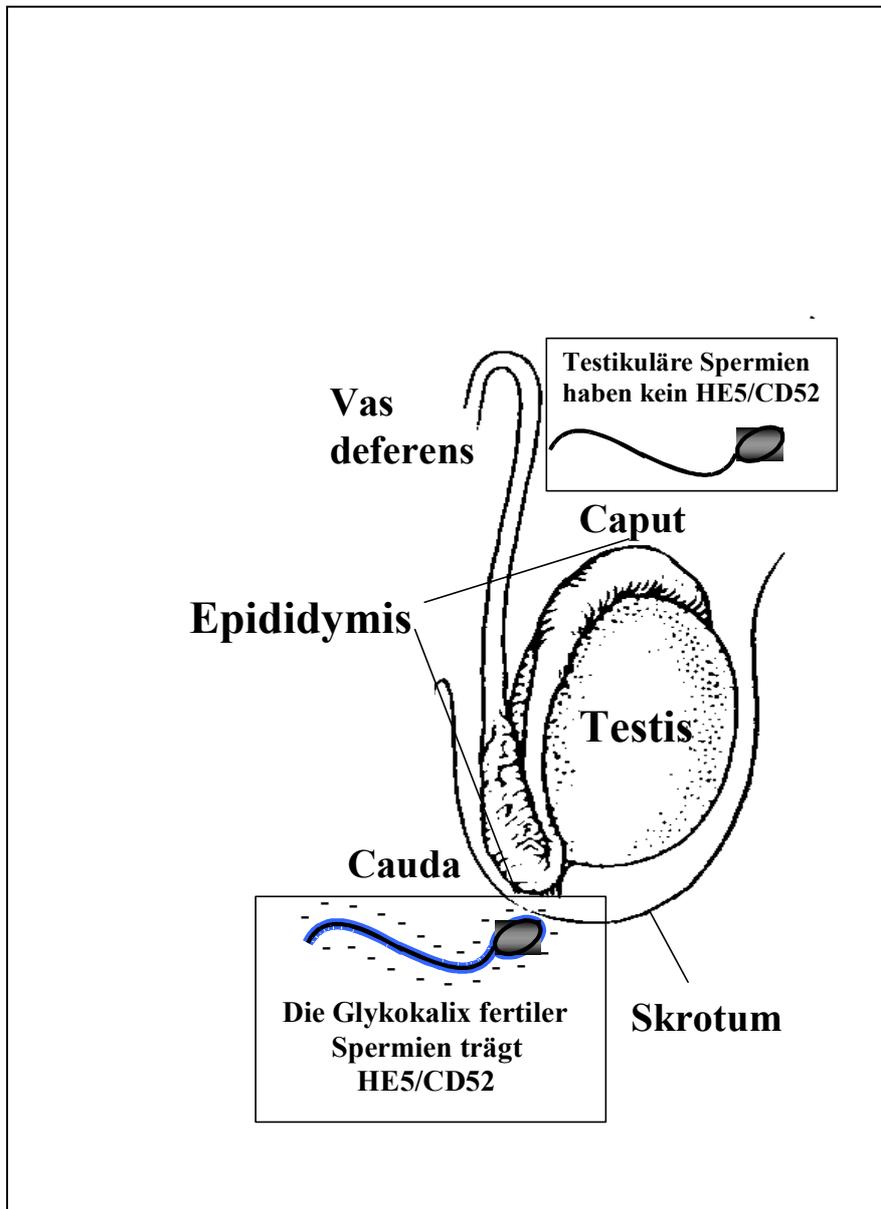


Abb. 1.5 Schematische Darstellung von Testis (Hoden) und Epididymis (Nebenhoden) des männlichen Genitaltrakts. Spermien, die den Hoden verlassen, sind nicht fertil, sie präsentieren auf ihrer Oberfläche kein HE5/CD52. Während ihrer Passage durch den Nebenhoden (ein Gang mit einer Längsgliederung in die Bereiche Caput, Corpus, Cauda) erlangen Spermien ihre Befruchtungsfähigkeit. Dies korreliert räumlich und zeitlich mit der Einlagerung von HE5/CD52 in die Spermienmembran. Aufgrund der durch terminale Sialylierung bedingten negativen Ladung des HE5/CD52 ist die Glykokalix dieser reifen Spermien stark negativ geladen. Die Abbildung wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr. C. Kirchhoff.

Hiermit einher gehen dramatische Veränderungen der Spermienoberfläche. Die Glykokalix im Nebenhoden gereifter Spermien ist stark negativ geladen, vermutlich größtenteils bedingt durch HE5/CD52, das auch als Hauptreifungsantigen (in der Ratte) bezeichnet wird (Kirchhoff 1996, Moore et al. 1989). Durch die Bezeichnung Hauptreifungsantigen wird hervorgehoben, dass dieses Peptid erst im Anschluss an die Nebenhodenpassage in großen Mengen auf der Spermienoberfläche vorkommt. Die stark negative Ladung der reifen

Spermien-Glykokalix ist durch dieses terminale Sialinsäuren tragende Haupttreifungsantigen bestimmt. Durch diese negative Ladung stoßen die Spermien sich untereinander ab, was ein „Verkleben“ der Spermien verhindert.

Es gibt Antikörper gegen HE5/CD52, die zur Agglutination von Spermien sowie zur Unterbindung der Gameteninteraktion führen, wie den monoklonalen S19-Antikörper (Mahoney et al. 1991, Diekman et al. 1997). Ein weiterer monoklonaler, für das Genitaltrakt-HE5/CD52 spezifischer Antikörper, der sich vermutlich gegen eine Glykokomponente des HE5/CD52 richtet, ist der Antikörper H6-3C4 (Isojima et al. 1987, Tsuji et al. 1988).

Das Auftreten peripherer α 1-3-Fucosylierung scheint für das HE5/CD52 aus dem männlichen Genitaltrakt spezifisch zu sein. Dies stellt HE5/CD52 in einen interessanten und wichtigen Kontext mit den Enzymen, die für diese Art der Glykosylierung in Frage kommen, mit den α 1-3/4-Fucosyltransferasen. Das Auftreten genitaltraktspezifischer α 1-3-Fucosylierung des HE5/CD52 wirft außerdem die Frage auf, ob zwischen natürlich vorkommenden Antisperm-Antikörpern wie z. B. dem Antikörper H6-3C4 (Isojima et al. 1987) und peripherer α 1-3-Fucosylierung von Fertilitätsmarkern wie HE5/CD52 ein funktioneller Zusammenhang bestehen könnte.

1.5 α 1-3-Fucosyltransferasen

Fucosyltransferasen sind Typ-II-Membranproteine (Abb. 1.5).

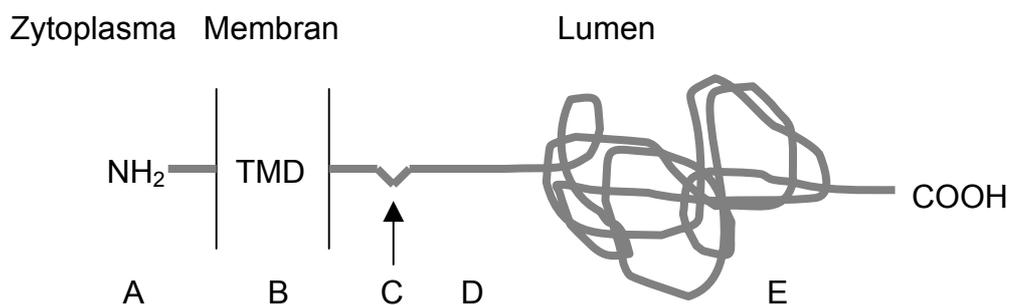


Abb. 1.5 Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Glykosyltransferasen. Es sind dies Typ-II-Transmembranproteine. Der N-Terminus ist im Zytoplasma lokalisiert, der C-Terminus ragt ins Lumen. Sie bestehen aus einem kurzen zytoplasmatischen, aminoterminalen Bereich (A), einer Transmembrandomäne (B), einer *stem*-Region (D) und der im Lumen befindlichen katalytischen Domäne am C-Terminus (E). An der proteolytischen Spaltstelle (C) können nicht Golgi-assoziierte, lösliche Formen gebildet werden (nach Kleene und Berger 1993).

Ihr relativ kurzer N-Terminus (ca. 15 Aminosäuren lang) liegt im Zytosol, eine Transmembranregion (ca. 20 Aminosäuren lang, im Falle der Fuc-TIV 34 Aminosäuren lang) sorgt für eine Membranverankerung im Golgi. Nach einer Stem-Region (ca. 100 Aminosäuren lang), die eine proteolytische Spaltstelle beinhaltet, folgt die im Lumen des Golgi liegende, C-terminale katalytische Domäne (um 230 Aminosäuren lang).

Diese Domänenstruktur ist allen eukaryotischen Glykosyltransferasen gemeinsam (Field und Wainwright 1995). Die Funktion Golgi-assoziiierter Glykosyltransferasen ist die Übertragung aktivierter Zucker auf geeignete Akzeptoren. Die Bedeutung sezernierter Glykosyltransferasen, wie sie durch Spaltung an der proteolytischen Schnittstelle entstehen, ist umstritten. Die enzymatische Aktivität dieser nicht Golgi-assoziierten Glykosyltransferasen ist deutlich verringert, dies ist für die α 1-3-Fucosyltransferase Fuc-TVI beschrieben (Grabenhorst et al. 1998).

Beim Menschen sind bisher sechs α 1-3/4-Fucosyltransferasen bekannt, Fuc-TIII bis Fuc-TVII sowie Fuc-TIX (Das Enzym wird als Fuc-T bezeichnet, die DNA bzw. die mRNA wird als FUT bezeichnet.). Die Spezifität dieser beim Menschen bisher gefundenen α 1-3-Fucosyltransferasen ist gut untersucht. Sie übertragen Fucose vom Substrat GDP-Fucose in α 1-3- oder α 1-4-Verknüpfung auf Akzeptoren. Für ihre Akzeptor-Spezifität ist entscheidend, ob es sich bei dem Akzeptor um Typ I oder Typ II handelt und ob der Akzeptor terminal sialyliert ist, d. h. eine oder mehrere negative Ladungen trägt (bei physiologischem pH). In *In-vitro*-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Fuc-TIII, das so genannte Lewis-Enzym (Kukowska-Latallo et al. 1990), hauptsächlich GlcNAc in Typ-I-Ketten fucosyliert (de Vries et al. 1995), allerdings in α 1,4-Verknüpfung. Fuc-TIV, die sogenannte ELAM-1-Ligand-Fucosyltransferase (ELFT, Goelz et al. 1990) fucosyliert größtenteils neutrale Typ-II-Ketten (Kumar et al. 1991, de Vries et al. 1995). Fuc-TV (Weston et al. 1992) und das „Plasmaenzym“ Fuc-TVI (Koszdin und Bowen 1992) fucosylieren sowohl neutrale als auch α 2,3-sialylierte Typ-II-Akzeptoren (Scudder et al. 1994, de Vries et al. 1995, de Vries et al. 1997), während Fuc-TVII (Sasaki et al. 1994), die bei der Sialyl-Lewis-x-Synthese aktive Fucosyltransferase, α 2,3-sialylierte Akzeptoren vom Typ II fucosyliert, bei neutralen Akzeptoren hingegen inaktiv oder wenig aktiv ist (Britten et al. 1998). Fuc-TV ist, wie auch Fuc-TIII, bei Typ- I-Akzeptoren aktiv. Fuc-TIX (Kaneko et al. 1999) überträgt Fucose auf neutrale Typ-II-Ketten, nicht aber auf sialyliertes Lactosamin, wobei bei Vorliegen von Polylactosamin im Gegensatz zu den anderen α 1-3-Fucosyltransferasen durch Fuc-TIX die distalen GlcNAc-Reste fucosyliert werden (Nishihara et al. 1999).

In der folgenden Abbildung 1.6 sind die wichtigsten der in Glykoproteinen unter Beteiligung der α 1-3-Fucosyltransferasen generierten Zuckermotive aufgeführt.

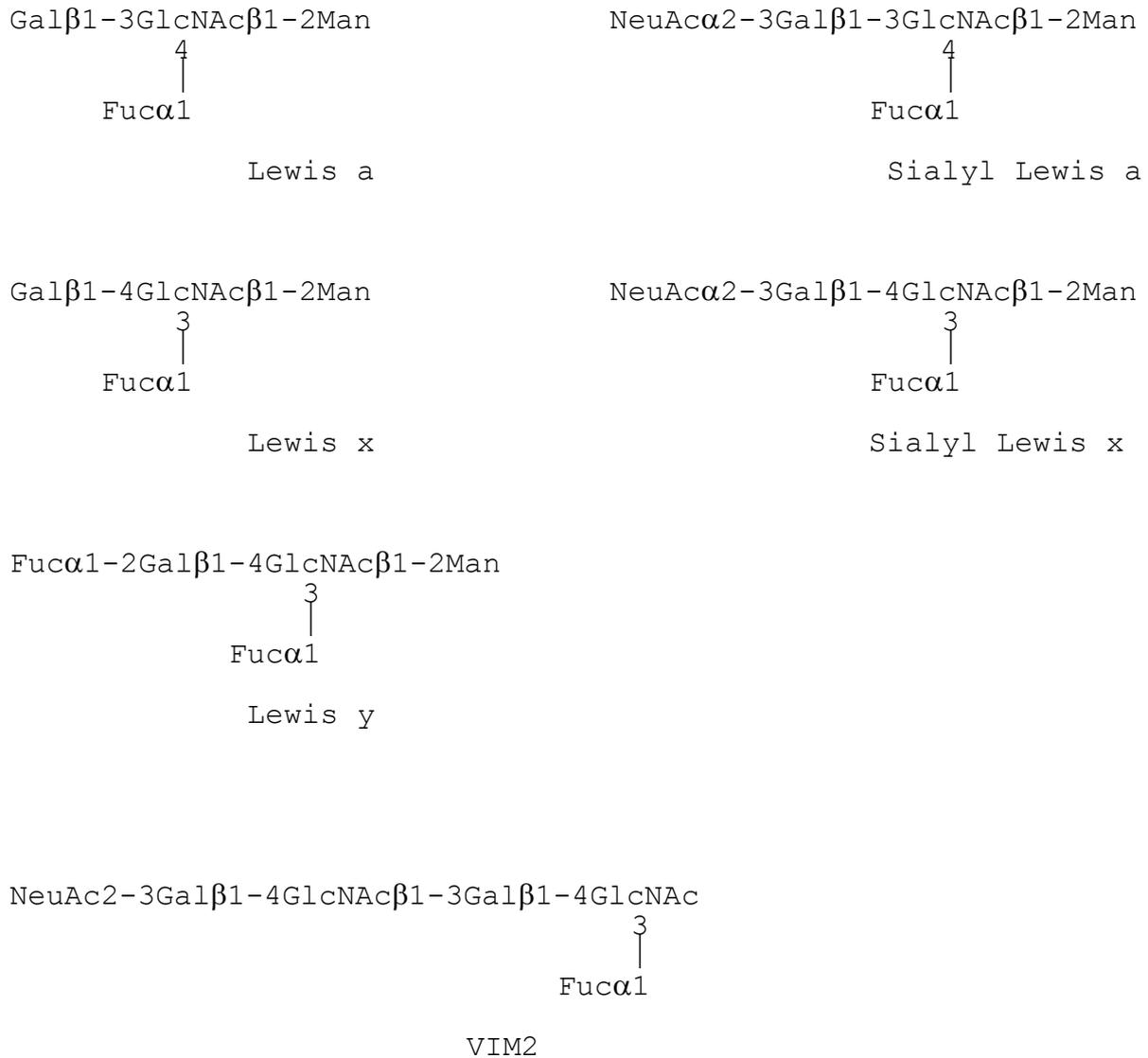


Abb.1.6 Zuckermotive mit peripheren Fucosylierungen, wie sie durch α 1-3/4-Fucosyltransferasen bewerkstelligt werden. Gezeigt sind periphere Fucosylierungen in α 1-3- und α 1-4-Verknüpfung an Typ-I- und Typ-II-Motiven.

Die α 1-3-Fucosyltransferasen weisen ein zeitlich differenziertes und gewebsspezifisches Expressionsmuster auf. Sie stehen in Zusammenhang mit maligner Transformation, das ABO-Blutgruppensystem ist u. a. über Fucosylierungen definiert, bei Adhäsionsvorgängen kommt peripheren Fucosylierungen eine wichtige Bedeutung zu. Über die Expression der α 1-3-Fucosyltransferasen im humanen männlichen Genitaltrakt ist dagegen kaum etwas bekannt.

Es gibt aber Studien über fucosylierte Glykane sowie über Fucosyltransferaseaktivitäten im Genitaltrakt von Nagern. Hier findet man ein räumlich differenziertes Expressionsmuster.

Beispielsweise scheinen in der Maus Lactosaminoglykane testikulärer Spermatozoen nicht fucosyliert, während Lactosaminoglykane epididymaler Spermatozoen fucosyliert sind (Cossu und Boitani 1984).

In der Maus wurde ein Gradient der Fucosyltransferaseaktivität auf murinen epididymalen Spermatozoen festgestellt mit der höchsten Aktivität bei Spermatozoen aus dem Caputbereich (Ram et al. 1989). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch für epididymale Spermatozoen aus der Ratte gemacht (Tulsiani et al. 1993). Untersuchungen auf Transkriptebene wurden in der Maus durchgeführt (Gersten et al. 1995). Eine der humanen FUT4 homologe Fucosyltransferase zeigte ein häufiges Vorkommen der mRNA im Nebenhodenepithel.

Die für Nager erhaltenen Ergebnisse direkt auf den Menschen zu übertragen ist allerdings problematisch. Die Funktion bestimmter Zuckerstrukturen ist nicht in allen Spezies gleich, man spricht z. B. vom speziesspezifischen Oligosaccharidcode der Gametenerkennung (Wassarman 1992). Außerdem gibt es große Artunterschiede bei den Fucosyltransferase-Genen. FUT3, FUT5 und FUT6 bilden einen Gencluster auf Chromosom 19p13.3 des Menschen (Reguine-Arnould et al. 1995). Dieser ist so nicht in der Maus zu finden, er ist vielmehr in der Säugerevolution aus einem einzigen Vorläufergen entstanden (Oulmouden et al. 1997, Wierinckx et al. 1999) und findet sich außer beim Menschen nur bei hominoiden Primaten (Dupuy et al 2002).

Die Beobachtung, dass das für die Reifung der Spermien erforderliche Spermienoberflächenantigen HE5/CD52 periphere α 1-3-Fucosylierung aufweist und sich damit von dem auf Lymphozyten gefundenen CD52 unterscheidet, wirft unmittelbar die Frage nach den α 1-3-Fucosyltransferasen des humanen Nebenhodens auf. In diesem Organ findet die posttestikuläre Reifung der Spermien statt. Es wäre durchaus denkbar, dass den α 1-3-Fucosyltransferasen hierbei eine Bedeutung zukommt und ihr Expressionsmuster gewebs- und regionenspezifisch sein könnte.

2. Problemstellung

Das Oberflächenantigen HE5/CD52 auf Lymphozyten und aus dem männlichen Genitaltrakt unterscheidet sich hinsichtlich seiner posttranslationalen Modifikationen. Die Struktur des Moleküls aus dem männlichen Genitaltrakt ist bekannt und weist eine extrem hohe Mikroheterogenität auf, die auf die Vielzahl verschiedener N-gebundener Zucker zurückgeht. Die funktionellen Eigenschaften des Moleküls werden vermutlich stark durch dieses Strukturelement bestimmt. Es sollte versucht werden, HE5/CD52 unter Erhalt einer N-Glykosylierung rekombinant zu exprimieren und zu charakterisieren. Das rekombinante Produkt sowie das native Produkt sollten hinsichtlich ihrer Immunreaktivität mit einem infertilitätsassoziierten, für das HE5/CD52 aus dem männlichen Genitaltrakt spezifischen Antikörper H6-3C4 charakterisiert werden, der gegen ein Glykotoptop auf HE5/CD52 gerichtet ist.

Ein wesentlicher Unterschied des Lymphozyten- und des Genitaltrakt-CD52 ist das Auftreten peripherer α 1-3-Fucosylierungen bei einem Teil der Glykoformen des HE5/CD52 aus dem Genitaltrakt (Schröter et al. 1999). Dieses Strukturelement konnte für das Lymphozyten-CD52 nicht detektiert werden (Treumann et al. 1995). Untersucht wurde die Frage, ob die Immunreaktivität des HE5/CD52 mit dem Antikörper H6-3C4 in Zusammenhang mit diesem Strukturelement stehen könnte.

In Zusammenhang damit sollte die Häufigkeitsverteilung der α 1-3-Fucosyltransferasen auf mRNA-Ebene im humanen Nebenhoden untersucht werden. Interessant war hierbei auch die Frage, ob die Häufigkeitsverteilung gewebsspezifisch ist und sich von der im Testis und in der Prostata unterscheidet.

Es sollte untersucht werden, wie sich eine Modifizierung des HE5/CD52 durch die auf mRNA-Ebene häufigste α 1-3-Fucosyltransferase auf die Immunreaktivität mit dem Antikörper H6-3C4 auswirkt.

Die Arbeiten hierzu werden im Ergebnisteil in zwei Teilen vorgestellt. Der erste Teil beschreibt die Experimente mit HE5/CD52 inklusive der Modifizierung durch die auf mRNA-Ebene häufigste α 1-3-Fucosyltransferase des humanen Nebenhodens.

Im zweiten Teil werden die Experimente zur Untersuchung der Häufigkeit der mRNAs der α 1-3-Fucosyltransferasen im humanen männlichen Genitaltrakt beschrieben.

3. Material und Methoden

3.1 Vervielfältigung von DNA

3.1.1 Klonierung in Bakterien

Zur Vervielfältigung eines DNA-Fragmentes kann man sich zweier Methoden bedienen, der PCR als *In-vitro*-Methode sowie der Klonierung in Bakterien. Bei der zweiten Methode wird das gewünschte DNA-Fragment zunächst mit einem Plasmid kovalent verknüpft (ligiert). Dieses ist eine zirkuläre DNA-Struktur, die als extrachromosomal vorliegendes Teilchen in Bakterienzellen vermehrt werden kann. Dieses Ligat wird in Bakterien transformiert, d. h. nach vorhergehender Schädigung der Membran ins Bakterium aufgenommen. Die DNA-Sequenz, die man vervielfältigen möchte, wird in die *multiple cloning site* eines Plasmids eingefügt, das zur Replikation in Bakterienzellen befähigt ist. Durch Transformation kann sich das Plasmid mit Hilfe der Replikationsmaschinerie des Bakteriums vermehren. Um zu gewährleisten, dass sich nur diejenigen Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, vermehren können, setzt man dem Nährmedium ein Antibiotikum wie z. B. Ampicillin zu und verwendet ein Plasmid, das über ein Resistenzgen für das jeweilige Antibiotikum verfügt. So können in einem ampicillinhaltigen Nährmedium nur die Bakterien überleben, die ein Plasmid mit einem Ampicillin-Resistenzgen aufgenommen haben. Die Anzahl der Plasmid-DNA-Teilchen nimmt mit der Vermehrung der Bakterien schnell zu, hauptsächlich determiniert wird dies über den Replikationsursprung (*origin of replication*) des Plasmids. Sogenannte *High-copy*-Plasmide kommen in mehreren Hundert Kopien pro Wirtszelle vor. Dieses Wachstum erreicht bei großer Bakteriendichte im Nährmedium die Sättigung. Über die Menge des Nährmediums, in die man transformierte Bakterien einbringt („Animpfen“), kann man die Ausbeute an Plasmid-DNA, die das relevante DNA-Fragment enthält, steuern. Je nach Ausgangsvolumen unterscheidet man Mini-, Midi- oder Maxi-Ansätze. Nach einer Über-Nacht-Kultur, bei der eine das Plasmid beinhaltende Bakterien-Kolonie bei 37°C über Nacht in Nährmedium (LB-Amp-Medium) inkubiert wurde, werden zunächst die Bakterienzellen abzentrifugiert. Für die Aufarbeitung, d.h. Isolierung der Plasmid-DNA, werden die Bakterienzellen zunächst resuspendiert und sodann alkalisch lysiert (Birnboim und Doly 1979). Nach Neutralisation wird die gelöste Plasmid-DNA in Hochsalz-Puffer auf eine Silicagelsäule gegeben, die unter den gegebenen Pufferbedingungen selektiv DNA absorbiert,

während andere Bestandteile des Lysats im Zentrifugat/Filtrat verbleiben. Durch einen Niedrigsalz-Puffer oder steriles destilliertes Wasser wird die DNA schließlich von der Säule eluiert.

Ligation

Der Ligationsansatz wurde in einem Volumen von 10 µl angesetzt. 1 µl 10x Ligationspuffer, 2 µl Vektor pCR3.1Uni (30 ng/µl) oder 1 µl Vektor pGEMTeasy (50 ng), das zu ligierende Insert in doppelter Teilchenzahl wie der Vektor und 1 µl T4 DNA-Ligase (4 U/µl) wurden mit sterilem destilliertem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Es folgte Inkubation bei 16 °C für vier Stunden. Der Vektor pCR3.1Uni war von Invitrogen (Groningen, Niederlande), der Vektor pGEMTeasy war von Promega (Madison, USA).

Transformation

50 µl kompetente „One Shot™ TOP10 F“ *E. coli* (Invitrogen, Groningen, Niederlande) wurden mit 2 µl 0.5 M β-Mercaptoethanol versetzt. Nach Zugabe von 2 µl des Ligationsansatzes unter vorsichtigem Mischen mit der Pipettenspitze wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30 Sekunden in einem Wasserbad mit 42°C wurde sofort für weitere zwei Minuten auf Eis inkubiert. Auf Zugabe von 250 µl SOC-Medium folgte eine Stunde Inkubation bei 37 °C. 50 µl bzw. 200 µl eines Ansatzes wurden mit einem sterilen Drigalski-Spatel auf zwei verschiedenen ampicillinhaltigen Agar-Platten verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

LB-Medium mit Ampicillin (LB-Amp): 20 g LB-Broth auf 1 Liter wässrige Lösung wurden autoklaviert. Ampicillin-haltiges LB-Medium wurde erhalten durch Zugabe von 1 ml Ampicillin (100 mg/ml wässrige Lösung) nach Abkühlen des Mediums auf etwa 50 °C.

SOC-Medium (Invitrogen, Groningen, Niederlande): 2 % Trypton, 0.5 % Hefe-Extrakt, 0.05 % NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glucose.

Agar-Platten: 20 g LB-Broth und 15 g Agar wurden unter Rühren mit Wasser auf einen Liter aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf etwa 50 °C wurden je etwa 10 ml in Kulturschalen gegossen, die nach Erstarren des Agar bei 4 °C gelagert wurden. Ampicillinhaltige Platten wurden durch Zugabe von 1 ml Ampicillin (100 mg/ml wässrige Lösung) zum Medium unmittelbar vor dem Gießen der Platten hergestellt.

3.1.1.1 Plasmid-Minipräparation

3 ml LB-Amp-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Hierzu wurde mit einer sterilen Pipettenspitze ein Teil einer Bakterienkolonie von einer Agar-Platte abgeschabt und ins Medium gegeben. Es folgte Inkubation über Nacht bei 37 °C. 2 ml der Über-Nacht-Kultur wurden in ein steriles 2-ml-Eppendorf-Gefäß überführt, 1 ml wurde zurückbehalten. Die Aufarbeitung erfolgte mit dem „QIAprep 8 Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden). Die Bakterien wurden bei 11.000 rpm für 3 min abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge 5415 C, Eppendorf, Hamburg), der Überstand wurde verworfen. Der Bakterienrückstand wurde in 250 µl RNase A enthaltendem Puffer P1 durch Vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer P2 und vorsichtigem Mischen durch sechsmaliges Invertieren des Eppendorf-Gefäßes wurden 500 µl Puffer N3 zugegeben und durch Invertieren gemischt. Nach 10 min Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der Überstand auf die QIAprep-8-Säulchen gegeben. Nach Anlegen eines Vakuums (Wasserstrahlpumpe) und zweimaligem Waschen mit je 1 ml Puffer PE (Entfernen des Puffers durch Anlegen eines Vakuums) wurde nach dem zweiten Waschschrift für 5 min Vakuum angelegt, um den Puffer vollständig zu entfernen. Nach Abtupfen der Säulchen-Unterseite wurde 100 µl steriles destilliertes Wasser auf die Säulchen gegeben. Nach einer Minute wurde Vakuum angelegt und somit die DNA von den Säulchen eluiert. Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei –20 °C.

3.1.1.2 Plasmid-Midipräparation

40 ml LB-Amp-Medium wurden angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Aufarbeitung wurde mit dem Jetstar Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) durchgeführt. Zunächst wurde die Säule durch Zugabe und Durchfluss von 10 ml Lösung E4 equilibriert. Die Bakterien im Kulturmedium wurden in ein steriles 50 ml Sarstedt-Gefäß (Sarstedt, Nümbrecht) transferriert und durch 20 Minuten Zentrifugation bei 4000 rpm pelletiert; der Bakterien-Rückstand wurde in 4 ml Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Lösung 2 und vorsichtigem Mischen durch Auf- und Abpipettieren und fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 4 ml Lösung E3 zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach Zentrifugation bei 20°C für 20 Minuten bei 4.000 rpm wurde der Überstand auf die equilibrierte Säule gegeben. Nach Durchfluss der Lösung wurde zweimal mit je 10 ml Lösung E5 gewaschen. Die Elution erfolgte mit 5 ml Lösung E6. Zur Präzipitation der Plasmid-DNA

wurden 0.7 Volumen Isopropanol zum Eluat gegeben und für 60 Minuten bei 4°C mit 4.000 rpm zentrifugiert. Der Rückstand wurde mit 1 Volumen 70% Ethanol gewaschen. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 4°C und 4.000 rpm (Megafuge 2.0R, Heraeus, Hanau) und Abnahme des Ethanols wurde der Rückstand für 10 Minuten an der Luft getrocknet und in sterilem destilliertem Wasser aufgenommen. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -20°C.

3.1.1.3 Plasmid-Maxipräparation

100 ml LB-Amp-Medium wurden angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte analog der Midi-Präparation, die Volumina der verwendeten Lösungen waren jedoch größer. Es wurden 30 ml Lösung E4, je 10 ml Lösung E1, E2 und E3, 60 ml Lösung E5 sowie 15 ml Lösung E6 verwendet.

3.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Diese *In-vitro*-Methode dient der Vervielfältigung eines DNA-Fragments. Es handelt sich um einen Prozess, der in drei Temperatur-Zeit-Intervalle unterteilt werden kann (Saiki et al. 1985, Mullis und Faloona 1987). Im ersten Schritt (Denaturierung) werden bei 95 °C die DNA-Doppelstränge zu Einzelsträngen aufgeschmolzen. Im zweiten Schritt binden kurze einzelsträngige DNA-Fragmente, Oligonukleotid-Primer, an die nun einzelsträngig vorliegende DNA (Annealing). Dies erfolgt an Sequenzabschnitten des DNA-Stranges, die revers-komplementär zur Sequenz des entsprechenden Oligonukleotid-Primers sind. Auf Grund eines hohen molaren Überschusses der Oligonukleotid-Primer gegenüber der Zielsequenz wird eine Rehybridisierung der DNA an den Oligonukleotid-Primer-Bindungsstellen fast vollständig unterbunden. Die Anlagerungstemperatur richtet sich nach dem Schmelzpunkt der jeweils verwendeten Oligonukleotid-Primer, liegt aber deutlich unterhalb der Denaturierungstemperatur von 95 °C, üblicherweise zwischen 50 °C und 60 °C. Es gibt verschiedene Versuche, die Schmelztemperatur der Oligonukleotid-Primer mathematisch zu beschreiben (Mülhardt 1999). Die einfachste Formel zur überschlagsmäßigen Abschätzung der Schmelztemperatur ist

$$T_m = 4x\Sigma(G+C) + 2x\Sigma(A+T)$$

Hierbei ist T_m die Schmelztemperatur in Grad Celsius, $\Sigma(G+C)$ ist die Anzahl der Basen Guanin und Cytosin, die miteinander im Doppelstrang über drei Wasserstoffbrücken verknüpft sind, $\Sigma(A+T)$ ist die Anzahl der Basen Adenin und Thymin, die im Doppelstrang über zwei Wasserstoffbrücken verknüpft sind. Die Annealing-Temperatur im PCR-Programm soll allerdings 5-10 K niedriger gewählt werden, um eine zuverlässige Hybridisierung mit dem Templat-Strang zu gewährleisten.

Eine genauere Formel zur Errechnung der Annealing-Temperatur ist folgende (Rychlik et al. 1990):

$$T_a = 0.3x T_m(\text{Oligonukleotid-Primer}) + 0.7x T_m(\text{PCR-Produkt}) - 14.9 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Die Schmelztemperatur des Produkts $T_m(\text{PCR-Produkt})$ ist wie folgt zu berechnen (Baldino et al. 1989):

$$T_m = 81.5 \text{ } ^\circ\text{C} + 16.6 \times [\log_{10}(K^+)] + 41 \times \left\{ \frac{\Sigma(G+C)}{[\Sigma(G+C) + \Sigma(A+T)]} \right\} - (675/n)$$

(K^+) ist hierbei die Konzentration monovalenter Kationen, n die Länge des Amplikons. $\Sigma(G+C)$ sowie $\Sigma(A+T)$ ist die Anzahl der einzelnen Nukleobasen im Amplikon.

In der Praxis wird die optimale Annealing-Temperatur aber meist empirisch ermittelt, die Berechnungen dienen nur einer ungefähren Abschätzung.

Im dritten Temperaturschritt bei 72 °C erfolgt die Kettenverlängerung (Elongation). Durch eine hitzestabile DNA-Polymerase (z. B. Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) wird der Oligonukleotid-Primer am 3'-Ende verlängert. Der DNA-Templatstrang, an den der Oligonukleotid-Primer gebunden hat, gibt dabei die an das 3'-Ende zu knüpfenden Basen komplementär vor.

Dann beginnt das dreistufige Temperaturprogramm von Neuem. Rein theoretisch erhält man so mit jedem PCR-Zyklus eine Verdoppelung der amplifizierten DNA-Sequenz des vorherigen Zyklus, insgesamt einen exponentiellen Anstieg der Menge der gewünschten DNA-Sequenz. Üblicherweise werden 20 bis 30 solcher Zyklen durchlaufen.

Die am konventionellen Thermocycler (PTC-200, MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA) durchgeführten PCR-Experimente hatten Reaktionsansätze, die sich wie folgt zusammensetzten:

- 1 μ l Sense-Oligonukleotid-Primer (10 pmol/ μ l)
- 1 μ l Antisense-Oligonukleotid-Primer (10 pmol/ μ l)
- 0.4 μ l dNTPs (je 10mM, Gibco oder Genecraft)
- 2 μ l Templat
- 0.5 units Polymerase (Genecraft)
- ddH₂O ad 20 μ l

3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Länge wurden diese zusammen mit DNA-Beladungspuffer in die Taschen eines je nach Länge der zu erwartenden Fragmente ein- bis zweiprozentigen horizontalen Agarosegels in einer mit 1xTAE-Puffer gefluteten Gelelektrophorese-Kammer gegeben. Durch Anlegen einer Spannung von 120V für 30 bis 45 min wurden unterschiedlich lange DNA-Fragmente gelelektrophoretisch getrennt. Auf Grund der negativen elektrischen Ladung der DNA, die durch die dritte freie Säurefunktion in der Phosphatgruppe in den Phosphodiesterbrücken des DNA-Rückgrats bedingt ist, wandert DNA in Richtung der Anode. Die Anfärbung der DNA erfolgte durch den Interkalationsfarbstoff Ethidiumbromid, der dem Gel in einer finalen Konzentration von 750 ng/ml beigemischt wurde. Durch Anregung des interkalierten Ethidiumbromids im UV-Bereich kann dieser Fluoreszenzfarbstoff im orange-roten Bereich bei 590 nm Licht emittieren. Die Größenordnung der einzelnen Banden erfolgte unter Zuhilfenahme eines Größen-Markers (100 bp ladder, Gibco). Dies sind Mischungen aus DNA-Fragmenten bekannter Länge, die auf einer gesonderten Spur auf dem Gel mit aufgetragen und gelelektrophoretisch getrennt werden.

TAE-Puffer 50x: 242 g Trisbase, 57.1 ml Eisessig und 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) wurden unter Rühren mit Wasser auf einen Liter aufgefüllt, gerührt, bis alle Komponenten gelöst waren, und autoklaviert.

DNA Beladungs-Puffer 10x: wässrige Lösung mit 0.25 % Bromphenolblau, 0.25 % Xylen Cyanol FF und 15% Ficoll.

3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten nach vorheriger gelelektrophoretischer Trennung wurden die Banden, die durch Interkalation von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar sind, mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten.

Das ausgeschnittene Gelstück wurde gewogen und mit dem dreifachen Volumen Puffer QX1 versetzt (1 mg ausgeschnittener Agarose entspricht hierbei 3 ml Puffer QX1) und durch Inkubation bei 50 °C für 10 min gelöst. Die Lösung wurde auf eine *QIAquick spin column* aufgegeben. Diese wurde auf ein 2 ml Eppendorf-Gefäß aufgesetzt. Nach Zentrifugation für eine Minute bei 13.000 rpm wurde das Zentrifugat verworfen. Nach Zugabe von 0.75 ml Puffer PE auf die Mini-Säule wurde fünf Minuten inkubiert, für eine Minute mit 13.000 rpm zentrifugiert und nochmals zur Beseitigung von Restpuffer zentrifugiert. Die Mini-Säule wurde auf ein 1.5 ml Eppendorf-Gefäß aufgesetzt. Zum Eluieren der DNA von der Mini-Säule wurden 50 µl steriles destilliertes Wasser aufgegeben und nach einer Minute Inkubation für eine Minute mit 14.000 rpm zentrifugiert. Die eluierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert.

3.4 DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration der Nukleinsäuren DNA und RNA sowie der Oligonukleotid-Primer in wässriger Lösung erfolgte photometrisch bei 260 nm. Grundlage hierfür ist die maximale Absorption durch die aromatischen Ringe der Nukleobasen bei dieser Wellenlänge. Die Massen DNA, RNA oder Oligonukleotid, die dabei einem Absorptionswert von eins (Optische Dichte, OD-Wert) entsprechen, sind unterschiedlich. Es sind dies für doppelsträngige DNA 50 µg/ml, für einzelsträngige DNA 40 µg/ml sowie für RNA 33 µg/ml (Jurk 1998). Gemessen wurde in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke im Photometer Ultrospec[®] 3000 (Pharmacia Biotech, Cambridge, England).

Gemessen wurden je nach abgeschätzter Ausgangskonzentration 1:10- bis 1:100-Verdünnungen der DNA, RNA oder Oligonukleotid-Primer in einem Probevolumen von 100 µl.

3.5 Spaltung von DNA durch Restriktions-Endonukleasen

Nukleasen sind Enzyme, die Nukleinsäuren hydrolytisch spalten können. Häufig verwendet werden Restriktionsendonukleasen des Typs II. Sie erkennen innerhalb einer DNA-Sequenz gelegene Motive aus einer Folge von mehreren Basen in Anordnung eines Palindroms und spalten diese Sequenz an definierter Stelle, zumeist innerhalb der Erkennungssequenz. Nachfolgend aufgeführt sind in dieser Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen mit dem jeweils benutzten Puffer (Tab. 3.1). Diagnostische Verdauungen wurden für 30 min bei 37 °C durchgeführt, präparative Verdauungen für mindestens 180 min bei 37 °C. Das Reaktionsvolumen war üblicherweise 20 µl mit einer finalen Enzymkonzentration von 1 U/µl und einer zu spaltenden DNA-Masse im unteren µg-Bereich.

Tab. 3.1 In dieser Arbeit verwendete Restriktions-Endonukleasen des Typs II mit ihrer jeweiligen Erkennungssequenz und dem zugehörigen Puffersystem¹

Restriktions- endonuklease	Erkennungssequenz	Puffer	Firma
Kpn I	5'-GGTAC↓C-3'	10 mM Tris (pH 7.5), 10 mM MgCl ₂ , 0.1 mg/ml BSA	AGS
EcoR I	5'-G↓AATTC-3'	33 mM Tris-Acetat (pH 7.9), 10 mM MgAc ₂ , 66 mM KAc, 0.1 mg/ml BSA	AGS
Dpn I	5'-G ^{m6} ↓ATC-3'	200 mM Tris (pH 8.8), 100 mM KCl, 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20 mM MgSO ₄ , 1 % Triton-X-100, 1 mg/ml BSA	Promega

¹ Die Spaltstelle ist durch einen Pfeil ↓ gekennzeichnet. Für DpnI wurde Pfu-PCR-Puffer verwendet. Dieser wurde bei der punktspezifischen Mutagenese im dem dem Restriktionsdauer vorangehenden Arbeitsschritt verwendet, das Enzym arbeitet auch unter diesen Pufferbedingungen.

3.6 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung, ob DNA-Fragmente, die in einer PCR erhalten wurden oder über punktgenaue Mutagenese verändert wurden, die gewünschte oder vermutete Sequenz aufwiesen, wurden diese Fragmente nach Subklonierung in einen geeigneten Vektor (pCR3.1Uni oder pGEMTeasy) sequenziert, d. h. die Basenfolge bestimmt.

Die zu sequenzierende DNA wird zunächst mittels *Cycle Sequencing* amplifiziert. Bei dieser Methode erhält man durch Verwendung nur eines Oligonukleotid-Primers einen linearen anstelle eines exponentiellen Anstiegs der Amplifikatmenge. Nur ein Strang wird hierbei vervielfältigt. Ein weiterer entscheidender Unterschied zur standardmäßig durchgeführten PCR ist hierbei allerdings die Beimengung von 2',3'-Didesoxynukleotiden als Kettenterminatoren zur Nukleotidmischung. Diese tragen an der 3'-Position der Desoxyribose keine Hydroxylfunktion, folglich kann bei Einbau eines solchen Didesoxynukleotids der DNA-Strang an dieser Stelle nicht weiter synthetisiert werden, die Synthese bricht an dieser Position ab. Dieser Mechanismus der Kettentermination liegt auch der DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode nach Sanger zu Grunde (Sanger et al. 1977). Durch genau definierte Zusammensetzung der Desoxy-/Didesoxy-Nukleotidmischungen kann die Synthese so gesteuert werden, dass man neu synthetisierte DNA-Stränge erhält, die sich um jeweils eine Base unterscheiden. Diese Mischung kann gelelektrophoretisch getrennt werden. Hierzu verwendet man wegen ihrer besseren Auflösung (engmaschigeres quervernetztes Polymer) Polyacrylamidgele statt der für DNA sonst gebräuchlichen Agarosegele. Hiermit können selbst Fragmente getrennt werden, die sich in ihrer Länge um nur eine Base unterscheiden. Durch Verwendung markierter Oligonukleotid-Primer, die radioaktiv oder über eine Infrarot-Markierung gekennzeichnet sein können, können diese Fragmente in einem Autoradiogramm unterschieden werden. Im Falle von mit einer Infrarot-aktiven Komponente markierten Oligonukleotid-Primern wird diese Markierung kurz vor dem Auslaufen der Fragmente aus dem Sequenziergel mit einem Laser angeregt; die Detektion der resultierenden Fluoreszenz erfolgt über eine Fotozelle. Bei Verwendung von vier Sequenzieransätzen mit jeweils einem 2'-3'-Didesoxynukleotid, also ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP, in der herkömmlichen Nukleotidmischung kann man nach gelelektrophoretischer Trennung der entstehenden unterschiedlich langen Fragmente Rückschlüsse auf die DNA-Sequenz ziehen. Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm BioEdit durchgeführt.

Sequenzreaktion (*Cycle Sequencing*)

Die Sequenzreaktion wurde mit dem „SequiTherm EXCEL™II DNA Sequencing Kit-LC“ (BIOzym, Hessisch Oldendorf) durchgeführt. Der Prämix bestand aus 7.2 µl 3.5x SequiTherm EXCEL II Sequencing Buffer, 2 µl IRD-800-markiertem T7-Oligonukleotid-Primer oder IRD 800 markiertem sp6- oder revlic-Oligonukleotid-Primer (je 2 pmol/µl), 250 fmol Templat und 1 µl SequiTherm EXCEL II DNA Polymerase und wurde mit ddH₂O auf 17 µl aufgefüllt. Auf Eis wurden je 4 µl dieses Prämix mit 2 µl des SequiTherm EXCEL II-LC Termination Mix A, C, G oder T vermischt. Nach 5 min Denaturierung bei 95 °C folgten 30 Zyklen mit 30 s bei 95° C, 15 s bei 50 °C und 1 min bei 70 °C. Zu jeder Reaktion wurden 3 µl Stop/Loading-Buffer gegeben. Nach Anzentrifugieren und Erhitzen auf 70°C für 3 min erfolgte der Probenauftrag.

Die Sequenzierungen wurden an einem Sequenzierautomaten der Firma LI-COR durchgeführt (dna sequencer model 4000L, LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA). Es wurden 41 cm lange Gele mit einer Dicke von 0.25 mm benutzt.

Herstellen des Sequenziergels

Die Glasplatten wurden zur Reinigung mit Leitungswasser vorgespült, mit 10% Deconex mit einer Bürste gereinigt und mit ddH₂O und Ethanol nachgespült. Nach Trocknen wurden zwei durch an die vertikalen Ränder angelegte Abstandhalter getrennte Glasplatten aufeinander gelegt und durch eine Schraubvorrichtung fixiert. Das Gel wurde zwischen die leicht geneigt positionierten Glasplatten gegossen, an der Oberseite wurde der Haifischkamm umgekehrt ins Gel eingesetzt, nach Einsetzen und Anschrauben der Andruckplatte wurde für mindestens 1 Stunde polymerisiert. Die Gellösung bestand aus 24 ml SEQUAGEL XR, 6 ml SEQUAGEL COMPLETE (jeweils national diagnostics, zu beziehen über BIOzym, Hessisch Oldendorf), 3 ml Formamid (Gibco) sowie 300 µl APS 10%.

Nach Polymerisation wurde die Andruckplatte entfernt, der Haifischkamm nach Spülen der Gelfront mit Laufpuffer eingesetzt sowie der obere Puffertank angeschraubt. Unterer Puffertank und Glasplatten wurden in den Sequenzierautomaten eingesetzt. Nach Befüllen der Puffertanks mit Laufpuffer wurden die Proben aufgetragen, das Auftragsvolumen betrug 1.3 µl. Als Laufpuffer wurde 0.8x HTBE-Puffer verwendet (10x HTBE: 162 g Tris, 27.5 g Borsäure, 9.3 g EDTA wurden in ddH₂O gelöst und auf 1 Liter aufgefüllt, pH 8.3 - 8.7).

Die über die LI-COR-Software einzugebenden Laufbedingungen waren 1600 V, 35 mA, 40 W sowie eine Temperatur von 50°C. Nach 30 Minuten Vorlauf wurde eine automatische

Justierung der Optik vorgenommen. Die Auswertung erfolgte softwareunterstützt (LI-COR Image Analysis 4.0).

Die verwendeten Oligonukleotid-Primer waren an ihrem 5'-Ende mit infrarotaktivem IRD 800 markiert (MWG, Ebersberg). Für Sequenzierungen der in den Vektor pCR3.1Uni subklonierten PCR-Fragmente wurden die IRD-800-markierten Oligonukleotid-Primer T7 sowie revlic verwendet. Bei den in den Vektor pGEMTeasy subklonierten PCR-Fragmenten wurden die IRD-800-markierten Oligonukleotid-Primer T7 und sp6 benutzt.

Oligonukleotid-Primer (IR D 800 markiert):

T7 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

sp6 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'

revlic 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

HTBE 10X-Puffer: 162 g Trisbase, 27.5 g Borsäure und 9.3 g EDTA wurden unter Rühren in einem finalen Volumen von einem Liter in Wasser gelöst; ein pH von 8.3 - 8.7 wurde eingestellt; der Puffer wurde autoklaviert.

3.7 Stellenspezifische punktgenaue Mutagenese

In bestimmten Fällen kann es erwünscht sein, eine DNA-Sequenz an einer bestimmten Stelle gezielt zu ändern. Hierfür scheidet der Einsatz von mutagenen Agentien, UV-Licht oder Radioaktivität aus, da hierdurch zwar Mutationen induziert werden, diese aber nicht gerichtet sind, man also die genaue Position in der DNA, an der die Mutation erfolgt, nicht im Vorwege bestimmen kann. Dies ist aber durch die Methode der *In-vitro*-Mutagenese möglich. Hier gibt es mehrere Verfahren, im Folgenden wird die in dieser Arbeit eingesetzte Methode beschrieben.

Zur Einführung einer stellenspezifischen Mutation in die Wildtyp-Sequenz von HE5/CD52 wurden Oligonukleotid-Primer synthetisiert. Diese trugen intern (also weder am 3'- noch am 5'-Ende) die Basensequenz, die für die Aminosäuren des zweiten Allels kodiert. Durch eine PCR mit der Wildtyp-HE5/CD52 kodierenden DNA-Sequenz im Vektor pCR3.1Uni (Invitrogen, Groningen, Niederlande) und den die Mutation tragenden Oligonukleotid-

zugänglich, sodass hier durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Pfu keine „Fehlerbeseitigung“ möglich ist.

Oligonukleotid-Primer-Sequenzen:

SDMBETAS CCTCAGCATCCAGCAGCATGAGCGGAGGCATTTTC

SDMBETAAS GAAAATGCCTCCGCTCATGCTGCTGGATGCTGAGG

3.8 cDNA-Synthese

Um die α 1-3-Fucosyltransferasen auf mRNA-Ebene mit einem Echtzeit-RT-PCR-Assay quantifizieren zu können, wurde die aus verschiedenen humanen Geweben extrahierte RNA zunächst mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) in komplementäre DNA, cDNA (*complementary*) umgeschrieben (modifiziert nach Spiess und Ivell 2002). Diese wurde im Echtzeit RT-PCR-Assay als Templat eingesetzt.

Die cDNAs wurden folgendermaßen hergestellt: 5 μ g Gesamt-RNA in 1.5 μ l sterilem destillierten Wasser, 1 μ l oligo-dT und 12 μ l Betain (5M) wurden für 5 min bei 70 °C inkubiert. Es folgte Inkubation bei 37 °C für 5 min. Es wurden 3 μ l *first strand buffer* (10fach), 1.5 μ l DTT (0.1 M), 1.5 μ l dNTPs (jeweils 10 mM), 9 μ l Trehalose (2 M) und 1 μ l MMLV-RT (200 U/ μ l) zugefügt und bei 40 °C für 30 min und bei 60 °C für 60 min inkubiert; die Reaktion wurde durch Inkubation bei 75 °C für 15 min gestoppt. Es wurde mit sterilem destilliertem Wasser auf 100 μ l Endvolumen aufgefüllt.

Oligo-dTs, *first strand buffer*, DTT und MMLV-RT waren von Gibco, Betain und Trehalose waren von Sigma, dNTPs von Genecraft.

Die RNA war aus von Hamburger Krankenhäusern zur Verfügung gestellten Geweben mit RNAClean (peqlab, Erlangen) isoliert worden.

3.9 Quantitative Echtzeit-RT-PCR

Zum Nachweis gering exprimierter Transkripte reicht die mit der Methode Northern-Blot zu erreichende Sensitivität nicht aus; diese liegt im Nanogramm-Bereich. In einem RT-PCR-Experiment (*reverse transcription polymerase chain reaction*) kann man die Nachweisempfindlichkeit um mehrere Größenordnungen erhöhen. Die gesamte mRNA, also nicht nur

das Transkript, welches nachgewiesen werden soll, wird zunächst durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. In dieser cDNA kann nun durch PCR-Methodik versucht werden, das dem gesuchten Transkript entsprechende cDNA-Fragment nachzuweisen. Durch ein RT-PCR-Experiment kann diese Sensitivitätsgrenze, die durch Northern-Blot vorgegeben ist, zum einen erheblich unterschritten werden, es ist theoretisch der Nachweis eines einzelnen Transkripts in der Probe möglich. Zum anderen ist sogar die Quantifizierung des Transkripts möglich.

Zunächst wird in diesen Experimenten die vorliegende RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Im folgenden Experiment wird folglich nicht direkt die Menge an Transkript gemessen, sondern ein dem Transkript entsprechendes (revers-komplementäres) Fragment DNA.

Die in dieser Arbeit zur Quantifizierung verwendete Methode beruht auf der Wechselwirkung des Fluoreszenzfarbstoffes SybrGreenI mit doppelsträngiger DNA. Dieser Farbstoff ergibt mit doppelsträngiger DNA, nicht aber mit einzelsträngiger DNA oder RNA, ein charakteristisches Fluoreszenzsignal. Die Stärke oder Intensität des Fluoreszenzsignals korreliert mit der Menge an in der Probe enthaltener doppelsträngiger DNA. Durch die Methode wird folglich unspezifisch die Gesamtmenge an doppelsträngiger DNA erfasst, ohne dass man hierbei unterscheiden könnte, ob das gemessene Signal nur dem zu quantifizierenden Transkript entspricht, oder ob man andere, weniger spezifische Transkripte oder Oligonukleotid-Primer-Addukte, die auch doppelsträngig vorliegen, mit erfasst.

Um festzustellen, wie viele unterschiedliche Amplifikate man quantifiziert, bedient man sich einer Schmelzpunktsanalyse. Diese wird direkt im Anschluss an die PCR durchgeführt. Hierbei wird die Probe langsam erwärmt bei (quasi-)kontinuierlicher Messung der Fluoreszenz. Man erhält so einen Fluoreszenz/Temperatur-Verlauf. Bildet man die erste negative Ableitung der Fluoreszenz nach der Temperatur, $-dF/dT$, erhält man eine Darstellung, deren Maxima die Schmelzpunkte der während der PCR gebildeten Amplifikate darstellen. Diese Schmelzpunkte hängen von Länge und GC-Gehalt der Template bzw. Amplifikate ab. Erhält man mehrere Schmelzpunkte, so heißt das, dass nicht nur das gewünschte Amplifikat gebildet wurde, sondern dass man auch unerwünschte Nebenprodukte während der PCR erhalten hat, die das Ergebnis verfälschen.

Für eine Zuordnung der Schmelzpunkte zu einer DNA-Sequenz können die entsprechenden Banden nach einer gelelektrophoretischen Trennung der Produkte aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA isoliert und nach Subklonierung sequenziert werden. Eine PCR mit

anschließender Schmelzpunktsbestimmung für nur dieses Templat liefert den gewünschten Schmelzpunkt.

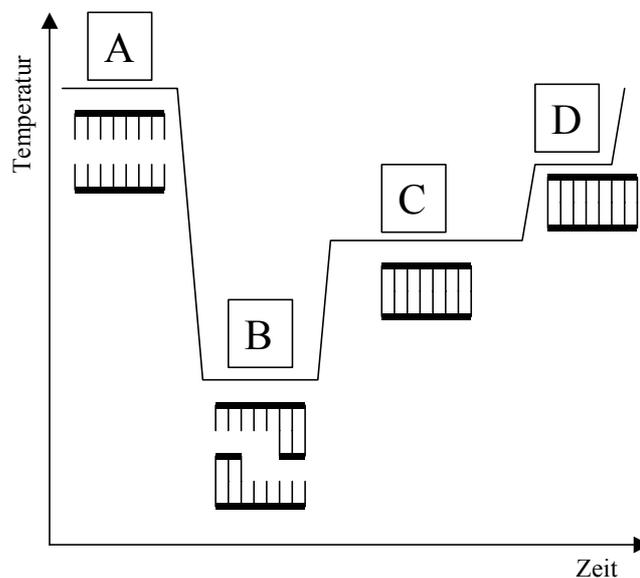


Abb. 3.1 Schematischer Temperatur/Zeit-Verlauf einer PCR in vier Temperatur/Zeit-Intervallen. Die ersten drei Schritte entsprechen den in 3.1.2 beschriebenen Schritten Denaturierung (A), Annealing oder Hybridisierung (B) sowie Elongation (C) eines PCR-Zyklus. Bei der Denaturierung (A) liegen nur Einzelstränge vor, beim Annealing (C) lagern die Oligonukleotid-Primer sich an ihre Zielsequenz an. In der Elongationsphase (C) erfolgt die Verlängerung der Oligonukleotid-Primer in 5'-3'-Richtung gemäß der Sequenz des Parentalstranges. Bei der fluoreszenzbasierten Echtzeit-PCR kann man in einem vierten Schritt (D) die Fluoreszenz bei einer Temperatur messen, bei der unerwünschte Nebenprodukte einzelsträngig vorliegen, weil sie bei dieser Temperatur bereits aufgeschmolzen sind und somit kein Fluoreszenzsignal mit SYBRGreen geben können (nach Haberhausen 1998).

Hat man nun beispielsweise zwei Schmelzpunkte erhalten, bei denen der Schmelzpunkt des unerwünschten Amplifikats niedriger ist als der des Templats, das quantifiziert werden soll (dies ist beispielsweise bei Oligonukleotid-Primer-Addukten der Fall), wählt man die Temperatur für die Messung der Fluoreszenz am Ende eines jeden PCR-Zyklus so, dass diese über der Schmelztemperatur des unerwünschten Amplifikates liegt. Dieses liegt bei dieser Temperatur einzelsträngig vor, sodass hier kein SybrGreen interkalieren kann. Somit wird bei der Fluoreszenzmessung nur das zu quantifizierende Amplifikat erfasst. Die Messung der Fluoreszenz bei einer anderen als der Elongationstemperatur macht ein viertes Temperatur/Zeit-Intervall innerhalb eines Zyklus im PCR-Programm erforderlich (Abb. 3.1, D). Nach Ende der Elongationsphase wird die Probe auf die Temperatur, bei der die Fluoreszenzmessung erfolgen soll, gebracht. Hier wird nun die Fluoreszenz gemessen, bevor der nächste PCR-Zyklus startet. So wird nur ein Fluoreszenzsignal für das gewünschte

Amplifikat erhalten; die Temperatur der Fluoreszenzmessung wird so gewählt, dass hier die Nebenprodukte bereits aufgeschmolzen sind. Sie liegen also einzelsträngig vor und geben folglich mit SYBR Green kein Signal, werden also in der Quantifizierung nicht erfasst.

Entspricht das bei niedrigerer Temperatur schmelzende Produkt dem gewünschten, ist ein subtraktiver Ansatz zu wählen. Man misst zunächst die Fluoreszenz bei einer Temperatur, die höher ist als die des höher schmelzenden Produkts, erfasst somit also beide Amplifikate. Im nächsten Schritt misst man den Schmelzpunkt bei einer Temperatur, die nur das höher schmelzende Produkt erfasst. Aus der Differenz dieser beiden Messwerte erhält man den Wert für das bei geringerer Temperatur schmelzende Produkt.

Zur Quantifizierung unbekannter Proben werden diese in einem Experiment mit Standards bekannter Amplikonkonzentration gemessen. Man erhält hierbei für jeden Standard und für die Proben Cp-Werte (*crossing point*). Diese sind die fraktalen Zyklen-Nummern, bei denen das Fluoreszenzsignal erstmals einen durch die LightCycler-Software festgesetzten Schwellenwert überschreitet (bei Auswertung nach der Software-Option *second derivative maximum*). Durch Auftragung der Cp-Werte gegen die logarithmischen Werte der Amplikonkonzentration der entsprechenden Standards erhält man eine Eichkurve. Mit Hilfe dieser Eichgeraden kann unter Berücksichtigung der Cp-Werte der zu messenden Proben die Amplikonkonzentration in diesen Proben vor Beginn der PCR ermittelt werden. Die Effizienz E der PCR kann errechnet werden als

$$E = 10 \exp[1/(\Delta Cp/\Delta \log(\text{Amplikonkonzentration}))]$$

Die Fluoreszenzwerte im Ergebnisteil werden als willkürliche Einheiten in *arbitrary units* angegeben. Dies sind relative Fluoreszenz-Einheiten, die Software-intern unter Einbeziehung des minimalen und maximalen Messwerts ermittelt werden.

Die der Sequenz der Oligonukleotid-Primer zu Grunde liegenden mRNA- bzw. cDNA-Sequenzen der α 1-3-Fucosyltransferasen und des β -Actin sind die durch folgende gi-Nummern (*gene identification*) beschriebenen. Zum Design der Primer wurden die Sequenzen aus öffentlich zugänglichen Datenbanken (NCBI-Server) verwendet: Actin, gi:5016088 (Vandekerckhove und Weber 1978), FUT3, gi:000149 (Cameron et al. 1995), FUT4, gi:4503810 (Lowe et al. 1991), FUT5, gi:4503812 (Cameron et al. 1995), FUT6, gi:4503814 (Cameron et al. 1995), FUT7, gi:4758405 (Sasaki et al. 1994), FUT9, gi:5729831 (Kaneko et al. 1999).

In Tabelle 3.2 sind die Bezeichnungen und Sequenzen der verwendeten Oligonukleotid-Primer aufgeführt.

Tab. 3.2 Sequenzen der im Echt-Zeit RT-PCR-Assay verwendeten Oligonukleotid-Primer

mRNA	Oligonukleotid-Primer	Basenfolge
β-Actin	BAS	5'-CAAGGCCAACCGCGAGAAGATG-3',
	BAAS	5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3',
FUT3	FUT3S	5'-TCCCCTCCAGAAGACTTGCCTGC-3',
	FUT3AS	5'-CTGAGCTCTTAACCCCTGAGGTGA-3',
FUT4	FUT4S	5'-CGGCCCAAGAGCATAACGGAAC-3',
	FUT4AS	5'-GGAAGCTGCACGGGCCACAAATA-3',
FUT5	FUT5S	5'-GGGCTGCCAGGGACCTCACTTTC-3',
	FUT5AS	5'-ACACATACCCTTCGCCCTCCTCCTTAG-3',
FUT6	FUT6S	5'-CACCTGCCTGGGGATTACCTACCT-3',
	FUT6AS	5'-CGCACCCGGCCTCATCATTG-3',
FUT7	FUT7S	5'-CACCGTGGCCCAGTACCGCTTCTA-3',
	FUT7AS	5'-CCCCACCCCTGCTTCCTGAC-3',
FUT9	FUT9S	5'-ATTGTCTGCATTATCCTGGGCTGTT-3',
	FUT9AS	5'-ATATCTGAATCACGGCGGTAAGTC-3'.

Tabelle 3.3 enthält die Fragmentlängen der gebildeten Amplifikate sowie die Molmassen der jeweils gebildeten, doppelsträngigen Amplifikate.

Tab. 3.3 Fragmentlängen und Molmassen des die jeweilige Fucosyltransferase oder β-Actin repräsentierenden Sequenzabschnitts

repräsentierte Sequenz	Fragmentlänge in bp	Molmasse (Doppelstrang) in Dalton
FUT 3	450	274339
FUT 4	422	256671
FUT 5	477	291117
FUT 6	445	271240
FUT 7	515	314184
FUT 9	452	274381
β-Actin	465	283517

Die Oligonukleotid-Primer (Tabelle 3.2) waren von GibcoBRL, bis auf die Actin-Primer; diese waren von Invitrogen. Beim Primer-Design wurde das Programm DNA-Star benutzt.

Das Reaktionsvolumen in jeder LightCycler-Kapillare betrug 20 µl. Der Reaktionsansatz bestand aus 2 µl BioThermAB Polymerasereaktionspuffer (10fach), 0.4 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM), 1 µl 10mM sense- und 1 µl antisense-Oligonukleotid-Primer (jeweils 10 µM), 0.2 µl SYBR GreenI (1:1000-Verdünnung), 1.2 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl BSA (10 µg/µl), 0.1 µl BioThermAB Polymerase (5 U/µl), 10.1 µl sterilem destilliertem Wasser und 2 µl cDNA oder 2 µl Standard. BioThermAB Polymerase und der Reaktionspuffer waren von Genecraft, SYBR GreenI und BSA waren von Sigma, MgCl₂ war von Roche. Bei Verwendung des „LightCycler – FastStart DNA Master SYBR Green I“-Kits (Roche, Mannheim) war der Ansatz folgendermaßen zusammengesetzt: 1 µl 10mM sense- und 1 µl antisense-Oligonukleotid-Primer (jeweils 10 µM), 1.6 µl 1.2 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl cDNA oder 2 µl Standard, 2 µl LightCycler – FastStart DNA Master SYBR Green I sowie 12.4 µl Wasser (PCR-Qualität).

Folgende PCR-Programme wurden für die Echtzeit-RT-PCR am LightCycler verwendet:

Für Actin ein Zyklus bei 95 °C für 5 min, 50 Zyklen bei 95 °C für 10 s, 65 °C für 10 s, 72 °C für 20 s und 88 °C mit Detektion der Fluoreszenz für 5 s. Das PCR-Programm für FUT3 bis FUT7 bestand aus einem Zyklus bei 95 °C für 5 min, 50 Zyklen bei 95 °C für 10 s, 65 °C für 10 s, 72 °C für 25 s und 87 °C mit Messung der Fluoreszenz für 5 s. Das PCR-Programm für FUT9 bestand aus einem Zyklus bei 95 °C für 5 min, 50 Zyklen bei 95 °C für 10 s, 65 °C für 10 s, 72 °C für 25 s und 83 °C mit Messung der Fluoreszenz für 5 s. Die Experimente wurden durchgeführt am LightCycler (Roche, Mannheim), zur Auswertung wurde die LightCycler-Software (Version 3.5.3, second derivative maximum) verwendet.

3.10 Folch-Extraktion aus Seminalplasma

HE5/CD52 macht einen relativ großen Anteil der in humanem Seminalplasma enthaltenen Nebenhodenproteine aus. Unter Ausnutzung seiner durch den GPI-Anker bedingten lipidartigen Eigenschaften wurde es durch Folch-Extraktion, eine klassische Methode der Lipidextraktion, aus Seminalplasma angereichert. Vier Teile (bezogen auf das Volumen) Seminalplasma oder Zellsuspension aus mit HE5/CD52 transfizierten Zellen wurden mit 11 Teilen Methanol und 5.4 Teilen Chloroform versetzt und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 3500g (Megafuge 2.0R, Heraeus, Hanau) wurde

der Überstand mit 3.5 Teilen Wasser versetzt und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Phasentrennung bei 4°C wurde die obere wässrige Phase abgenommen und nach Abziehen des Methanols am Rotationsverdampfer gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in sterilem destilliertem Wasser aufgenommen und als Folch-Extrakt bei -20°C gelagert.

3.11 Auftrennung und Nachweis von Proteinen

3.11.1 Gelelektrophoretische Trennung von Proteinen

Proteine können ähnlich wie Nukleinsäuren gelelektrophoretisch nach ihrer Größe getrennt werden. Sie verfügen jedoch nicht wie Nukleinsäuren über eine einheitliche negative Ladung, die proportional zur Molekülgröße ist. Proteine können je nach Aminosäurezusammensetzung und pH-Wert positiv, negativ oder elektrisch neutral geladen sein. Um ein einheitliches Laufverhalten im elektrischen Feld zu gewährleisten, werden die Proteine mit Natriumdodecylsulfat versetzt. Der hydrophobe Teil dieses Moleküls lagert sich an hydrophobe Seitenketten der Aminosäuren an, durch Beladung des Proteins mit dem Anion wird das Protein proportional zu seiner Größe, vollständige Entfaltung, also Denaturierung globulärer Bereiche vorausgesetzt, negativ geladen. Somit können Proteine gelelektrophoretisch durch Wanderung zur Anode im elektrischen Feld nach Größe getrennt werden. Glykoproteine zeigen ein anderes Laufverhalten, die überwiegend hydrophilen Glykostrukturen werden kaum mit SDS beladen. Außerdem sind Glykoproteine durch die hydrophilen Glykostrukturen von einer sehr voluminösen Hydrathülle umgeben, wodurch durch das Laufverhalten im SDS-PAGE ein höheres als das tatsächliche Molekulargewicht angezeigt wird.

Proteintrennungen wurden nach Laemmli (1970) in diskontinuierlichen vertikalen denaturierenden 15%igen Polyacrylamidgelen mit einem Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem in einer Minigel-Laufkammer (Phase, Lübeck) durchgeführt. Das Auftragsvolumen pro Tasche betrug 15 µl, davon waren 10.5 µl in Wasser aufgenommenes Protein, 3 µl 1.5 M DTT sowie 1.5 µl 10x Laufpuffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM Dithiothreitol, 2 % SDS, 10 % Glycerol, 0.1 % Bromphenolblau). Die Elektrophorese wurde bei 150 V für 75 min durchgeführt.

Trenngel: 3.0 ml 30 % Acrylamid, 1.5 ml 1.5 M Tris pH 8.8, 1.4 ml ddH₂O, 60 µl 10 % SDS, 60 µl 10 % APS und 3 µl TEMED.

Sammelgel: 0.33 ml 30 % Acrylamid, 0.25 ml Tris pH 6.8, 1.4 ml ddH₂O, 20 µl 10 % SDS, 20 µl 10 % APS und 2 µl TEMED.

3.11.2 Proteintransfer auf eine Membran

Der Transfer wurde nach dem *Semidry-Blotting*-Verfahren durchgeführt. Auf die Kathode der Blotting-Kammer wurden vier in TBST-Puffer getränkte Stücke Whatman-Papier aufgelegt. Hierauf wurde vorsichtig das Protein-Gel transferiert, mit einer PVDF-Membran (Millipore, Molsheim, Frankreich) luftblasenfrei bedeckt und mit weiteren vier in TBST-Puffer getränkten Stücken Whatman-Papier bedeckt, auf die die Anodenplatte aufgelegt wurde. Diese wurde mit etwa 0.5 kg beschwert. Das Blotting erfolgte bei 0.1mA/cm² für 60 min.

Transfer-Puffer: 23.25 g Tris-base, 1.5 ml Ethanolamin, 200 ml Methanol, 0.375 g SDS und 2.93 g Glycin wurden mit destilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt.

3.11.3 Immundetektion

Nach dem Transfer wurde die Membran für 60 min zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen mit Blockierungspuffer inkubiert und 3 x 5 min mit 1x TBST-Puffer gewaschen.

Immun-Detektion mit dem CAMPATH-Antikörper (monoklonal aus Ratte)

Es wurde für eine Stunde mit dem Antikörper CAMPATH-1M (G. Hale, Oxford, England) in 1:3000-Verdünnung in 1x-Antikörper-Verdünnungspuffer inkubiert. Nach 3 x 5 min Waschen mit 1x TBST-Puffer wurde für 60 min mit Ziege-anti-Ratte-Antikörper (Sigma, Deisenhofen) in 1:2000-Verdünnung in Antikörper-Verdünnungspuffer inkubiert.

Immun-Detektion mit dem m097-Antikörper (monoklonal aus Maus)

Es wurde für 50 min mit m097-Antikörper in 1:2000-Verdünnung (A. Bernard, Marseille, Frankreich) in 1x-Antikörper-Verdünnungspuffer inkubiert. Nach 3 x 5 min Waschen mit 1x-

TBST-Puffer wurde für 30 min mit Schaf-anti-Maus-Antikörper in 1:2000-Verdünnung in Antikörper-Verdünnungspuffer inkubiert.

Immun-Detektion mit dem Antikörper H6-3C4 (monoklonal, human)

Es wurde für 50 min mit dem Antikörper H6-3C4 (S. Isojima, Nishinomija, Japan) unverdünnt im Kulturüberstand inkubiert. Nach 2 x 6 min Waschen mit 1x-TBST-Puffer wurde für 30 min mit Ziege-anti-Mensch-IgM-Antikörper (DAKO, Hamburg) in 1:500-Verdünnung in Antikörper-Verdünnungspuffer inkubiert.

Detektion mit dem Lektin *Lectin Tetragonolobus purpureas*

Lektine sind gegen Kohlenhydrate oder Glykomotive gerichtete Proteine pflanzlichen oder tierischen Ursprungs. Zur Detektion nach Western-Blotting wurde in dieser Arbeit das α 1-3-Fucose-spezifische Lektin *Lectin Tetragonolobus purpureas* (Sigma, Deisenhofen) als Erst-Antikörper verwendet.

100 μ l des in 1 ml Wasser (PCR-Qualität) rekonstituierten Lektins wurden in 5 ml Antikörper-Verdünnungspuffer auf den Blot gegeben. Der Antikörper-Verdünnungspuffer enthielt zusätzlich Calciumchlorid sowie Magnesiumchlorid (je 10 mM). Nach 50 min Inkubation wurde 3 x 5 min mit TBST gewaschen. Es folgte 30 min Inkubation des StreptAB-Komplexes (Vorinkubation für 30 min der vereinigten Lösungen A und B in 0.5 ml TBS, die Streptavidin und biotinylierte Peroxidase enthalten, DAKO, Hamburg), in 5 ml Antikörper-Verdünnungspuffer. Das weitere Vorgehen entsprach den allgemeinen Wasch- und Detektionsbedingungen für Chemilumineszenz-Detektion.

Chemilumineszenz-Detektion

Nach 3 x 5 min Waschen mit 1x-TBST-Puffer und Waschen für 5 min mit sterilem destilliertem Wasser wurde für 5 min mit dem Super Signal Substrat (Pierce, Rockford, USA) in 1:10- bis 1:40-Verdünnung in sterilem destilliertem Wasser inkubiert. Das Substrat wird durch das an den Zweit-Antikörper konjugierte Enzym Peroxidase unter Aussendung von Lumineszenz umgesetzt. Dies kann durch Schwärzung eines auf den Blot aufgelegten Röntgenfilms an den entsprechenden Stellen nachgewiesen werden.

10xTBS: 24.23 g Tris·Cl und 79.46 g NaCl wurden mit destilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt.

1xTBST: 100 ml 10x TBS und 2 ml 25 %iges Tween 20 wurden mit destilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt.

Antikörper-Verdünnungspuffer: 49.5 ml 1x TBST und 0.5 ml 10x Blockierungslösung.

Blockierungspuffer: 1x TBS inkl. 1 % Blockierungsreagenz (Boehringer Mannheim).

3.12 Zellkultur

Säuger-Zellen/Zellkultur-Bedingungen

Es wurden BHK-21B Zellen (*baby hamster kidney*) verwendet, die freundlicherweise von Dr. H. Conradt, GBF Braunschweig, zur Verfügung gestellt wurden. Die Zellen wurden in unten aufgeführtem Medium bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Sobald die Zellen konfluent wuchsen, wurde ein Wechsel des Kulturmediums vorgenommen. Die adhärent wachsenden Zellen mussten dafür zunächst von der Oberfläche der Kulturschalen gelöst werden. Die in 75cm²-Zellkulturflaschen (T75-flasks, Nunc, Wiesbaden) wachsenden Zellen wurden nach Abnahme des Kulturmediums mit 5 ml PBS (PAA Laboratories, Linz, Österreich) gespült, für 1 min mit 2.5 ml Trypsin (0.5 g/l, PAA Laboratories, Linz, Österreich) bei 37 °C inkubiert und im Anschluss sofort mit 7.5 ml frischem Medium verdünnt. Die Suspension wurde in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min mit 1.000 rpm zentrifugiert. Der Rückstand wurde in 7.5 ml frischem Medium resuspendiert und 1:5 bis zu 1:15 verdünnt in ein neues Kulturgefäß gegeben.

Für eine Transfektion mit der HE5/CD52-kodierenden cDNA-Sequenz im Expressionsvektor pCR3.1Uni wurden 8 x 10⁵ Zellen pro Kulturschale mit 10 cm Durchmesser ausgesät, bevor am nächsten Tag die Transfektion erfolgte.

Das Kulturmedium für die BHK-21B-Zellen setzte sich wie folgt zusammen: 500 ml DMEM (Sigma, Deisenhofen), 50 ml FCS (PAA Laboratories, Linz, Österreich), 5.5 ml Glutamin 200 mM (Sigma, Deisenhofen) und 5.5 ml Penicillin und Streptomycin (Sigma, Deisenhofen).

3.13 Transiente Transfektion von BHK-Zellen

Transfektion der Zellen mit der HE5/CD52 kodierenden DNA-Sequenz

Die Transfektion wurde in Kulturschalen (24-well-Platten, Nunc, Wiesbaden) mit dem Transfektionsreagenz Superfect (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Es wurde 1 µl HE5/CD52-

Plasmid in einer Konzentration von 1 µg/µl mit 59 µl DMEM (Sigma, Deisenhofen) ohne Zusatz von Serum, Antibiotikum und Proteinen gemischt. Dann folgte Zugabe von 5 µl Superfect und Mischen. Während Inkubation für 10 min (Bildung des Transfektionskomplexes) wurde das Medium von den zu transfizierenden Zellen abgenommen und diese mit 500 µl PBS pro well gewaschen. Der Transfektionsansatz wurde mit 350 µl Medium inklusive Serum und Antibiotikum versetzt und nach Mischen sofort auf die Zellen gegeben. Nach Inkubation für drei Stunden wurde die Medium/Komplex-Mischung von den Zellen abgenommen und 1 ml frisches Medium für 18 h auf die Zellen gegeben. Nach Abnahme des Mediums erfolgte Zugabe von 1 ml Medium mit 10 mM Natriumbutyrat (Sigma, Deisenhofen). Nach Abnahme dieser Lösung und Zugabe von 1 ml frischem Medium erfolgte nach weiteren 12 h die Fixierung der Zellen mit para-Formaldehyd (beschrieben unter 3.14). Zur Expression grösserer Mengen des rekombinanten HE5/CD52 für nachfolgende Westernblotanalysen wurde das gleiche Protokoll verwendet, die Transfektion fand allerdings in größeren Kulturschalen statt (Durchmesser 10 cm). Die Volumina der verwendete Lösungen waren wie folgt: 10 µl HE5/CD52-Plasmid (1 µg/µl), 290 µl Medium ohne Zusätze, 60 µl Superfect sowie 3.46 µl Medium mit Zusätzen. Zum Waschen wurden 5 ml PBS verwendet.

3.14 Indirekte Immunfluoreszenz von Zellen

Ob eine Expression nach erfolgter Transfektion stattgefunden hat, kann immunzytochemisch nachgewiesen werden. Hierfür werden die adhären gewachsenen Zellen zunächst fixiert. Sodann wird über indirekte Immunfluoreszenz versucht, das rekombinante Protein nachzuweisen. Als Erst-Antikörper wird ein direkt gegen das Protein gerichteter Antikörper verwendet. Der Zweit-Antikörper trägt eine Fluoreszenzmarkierung (Cy3), mit Hilfe derer das Protein auf den Zellen detektiert werden kann. Nach positivem Befund kann eine Transfektion mit größeren Volumina vorgenommen werden, um eine größere Menge an rekombinant exprimiertem Protein für nachfolgende Experimente wie z. B. Westernblot-Analysen zur Verfügung zu haben.

Fixierung der Zellen

Nach Abnahme des Kulturmediums wurde mit 500 µl PBS gewaschen, sodann zum Fixieren der Zellen für 10 min mit 500µl 4 % para-Formaldehyd inkubiert, zweimal mit je 500 µl PBS (PAA Laboratories, Linz, Österreich) gewaschen, 5 min mit 500 µl 0.2 % Triton-x-100 (Sigma, Deisenhofen) inkubiert sowie zweimal mit je 500 µl PBS gewaschen.

Es folgte 1 h Inkubation mit Blockierungslösung (5 % *normal goat serum* in PBS).

Immunzytochemie/indirekte Immunfluoreszenz

Der Nachweis von HE5/CD52 erfolgte durch Inkubation mit 300 µl Erst-Antikörper in 1:200-Verdünnung für CAMPATH-1M in 2 % NGS in PBS für 1 h. Nach 3 x 5 min Waschen für 5 min mit je 500 µl PBS wurde 30 min mit dem Cy3-gekoppelten Anti-Maus-Zweit-Antikörper in 2 % NGS inkubiert.

3.15 PNGase-F-Spaltung

Zur enzymatischen Hydrolyse von N-Glykanen wurde das Enzym PNGase F aus *Flavobacterium meningosepticum* verwendet. Es spaltet komplexe N-Glykane am reduzierenden Ende vom Proteinrückgrat unter Desaminierung des Asparagins zum Aspartat.

10.1 µl Folch-Extrakt in 0.7 % β-Mercaptoethanol und 0.5 % SDS wurden für 3 min bei 95 °C denaturiert. Nach Zugabe von 1.8 µl PNGaseF (rekombinant in *E. coli*, Boehringer, Mannheim) und dem Protease-Inhibitor-Mix wurde der Ansatz (270 mM NaH₂PO₄, pH 8.3, 338 mM EDTA, 68 mM PMSF, 0.6 % NP40, Pepstatin, Phenantrolin) bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 3 min bei 95 °C inaktiviert.

3.16 Exoglycosidase-Spaltung

Exoglycosidasen spalten terminale Monosaccharideinheiten vom nicht reduzierenden Ende einer Glykostruktur. Zur sequenziellen Spaltung des putativen spermienpezifischen Glykotops von HE5/CD52 wurden Sialidase (Boehringer, Mannheim), β-Galaktosidase aus *Streptococcus pneumoniae* (Glyko, Basel, Schweiz), β-N-Acetylhexosaminidase aus *Jack bean* (Glyko, Basel, Schweiz) und α-Fucosidase aus Rinderniere (Glyko, Basel, Schweiz) in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration verwendet. Die Reaktionsansätze enthielten 5 µl Folch-Extrakt aus humanem Seminalplasma, 2 µl Puffer (final 100 mM Natrium-Citrat/Phosphat pH 6.0), die entsprechende Enzymkombination sowie Wasser (PCR-Qualität) ad 11 µl. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 18 h. Die Reaktionen wurden durch Inkubation bei 95 °C für 5 min gestoppt.

3.17 *In-vitro*-Fucosylierung

Das im Folch-Extrakt angereicherte HE5/CD52 aus Seminalplasma wurde *in vitro* fucosyliert nach Murray et al. (1997). Hierfür wurde als Donor GDP-Fucose benutzt (Calbiochem, Schwalbach), als Enzym wurde rekombinant in *E. coli* exprimierte α 1-3-Fucosyltransferase VI (Calbiochem, Schwalbach) aus *Spodoptera-frugiperda*-Insektenzellen verwendet. 5 μ l Folch-Extrakt aus humanem Seminalplasma, 0.1 μ l GDP-Fucose (final 0.1 mM), 1 μ l MnCl₂ (final 10 mM) sowie 0.5 μ l Fuc-TVI (final 250 μ U/ μ l) wurden mit Wasser (PCR-Qualität) auf 10 μ l aufgefüllt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nach 5 min Denaturierung bei 95 °C folgten SDS-PAGE und Western-Blotting.

4. Ergebnisse

4.1 Das Zelloberflächenantigen HE5/CD52

4.1.1 Charakterisierung von HE5/CD52 durch monoklonale Antikörper

CD52 kommt in unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen vor, die die Glykostruktur des N-Glykans sowie die Struktur des GPI-Ankers betreffen. Die für den männlichen Genitaltrakt charakteristischen Formen werden im Weiteren als HE5/CD52 bezeichnet (Kirchhoff et al. 1993). Ein Teil der Experimente beinhaltete die rekombinante Expression des CD52. Zur Charakterisierung sowohl des nativen, im männlichen Genitaltrakt vorkommenden HE5/CD52 als auch des rekombinant exprimierten Produkts wurden drei unterschiedliche Antikörper verwendet, deren Epitope sich deutlich voneinander unterscheiden und die somit also besonders geeignet waren, eventuelle strukturelle Unterschiede zwischen nativem und rekombinant exprimiertem Produkt zu detektieren. Der 097-Antikörper ist gegen ein Peptid-Epitop gerichtet, der CAMPATH-1-Antikörper (Hale et al. 1988) erkennt die 3 C-terminalen Aminosäuren und Teile der GPI-Ankerstruktur (Hale et al. 1995, James et al. 1999), der Antikörper H6-3C4 (Isojima et al. 1987) ist gegen eine Zuckerstruktur gerichtet bzw. sein Epitop beinhaltet zumindest eine Glykokomponente (Tsuji et al. 1988). Der Antikörper H6-3C4 zeigt mit dem Lymphozytenprodukt keine Kreuzreaktivität, stellt somit also ein ideales Werkzeug dar, um spermien-spezifische HE5/CD52-Glykoformen nachweisen zu können.

4.1.2 Rekombinante Expression von HE5/CD52 in BHK-Zellen

Für die Auswahl des Expressionssystems für HE5/CD52 war entscheidend, dass das Hauptaugenmerk auf der Simulierung des spermien-spezifischen Glykosylierungsmusters liegen sollte. Eine Expression in Bakterien schied hiermit von vornherein aus, da diese keine N-Glykane bilden können, was ja das Charakteristikum der HE5/CD52-Glykosylierung darstellt, sowohl für das Lymphozyten- als auch für das Genitaltraktprodukt. Um ein Gewebe zu benutzen, das dem Nebenhodengewebe relativ ähnlich sein sollte, wurden Zelllinien gewählt, die aus Säugern stammen und ebenfalls epithelialen Ursprungs sind. Eine

rekombinante Expression wurde in BHK-21-Zellen (*baby hamster kidney*, eine Zelllinie aus Nierenzellen von Baby-Hamstern) versucht. Diese sind zur Synthese von N-Glykanen des komplexen Typs, die das Charakteristikum der HE5/CD52-Glykosylierung darstellen, in der Lage (Conradt et al. 1996).

Die HE5/CD52-kodierende DNA-Sequenz wurde in den eukaryotischen Expressionsvektor pCR3.1Uni kloniert. Die adhären in einer Schicht (*Monolayer*) wachsenden BHK-21-Zellen wurden mit diesem Konstrukt transfiziert. Erst durch Zugabe von Natriumbutyrat zum Nährmedium nach bereits erfolgter Transfektion war es möglich, eine mit indirekter Immunfluoreszenz nachweisbare Expression zu erzielen. Natriumbutyrat verstärkt die Expression (Gorman und Howard 1983).

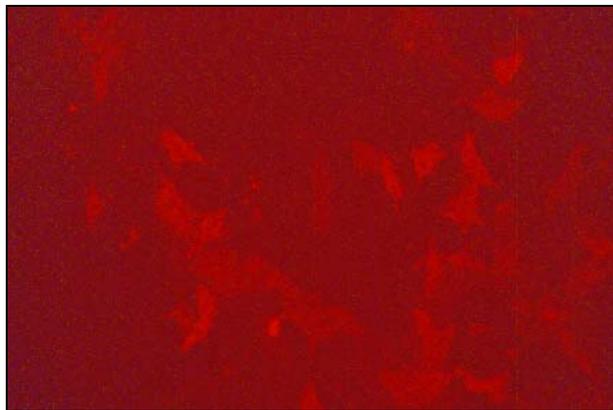


Abb. 4.1 Indirekte Cy3-Immunfluoreszenz auf BHK-Zellen zum Nachweis rekombinanter Expression von HE5/CD52, 145fach vergrößert. Erst-Antikörper CAMPATH-1M (250 µg/ml), Zweit-Antikörper POD-gekoppelter Ziege-anti-Maus-IgG (0.3 µl/ml). Die Expression wurde durch Zugabe von 10 mM Natriumbutyrat zum Kulturmedium 18 Stunden nach erfolgter Transfektion verstärkt.

Abbildung 4.1 zeigt durch indirekte Immunfluoreszenz (der Zweit-Antikörper ist mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert) die transfizierten Zellen, die HE5/CD52 exprimieren. Die Negativkontrolle, d. h. Transfektion von BHK-21-Zellen mit dem Expressionsvektor pCR3.1Uni ohne Insert unter ansonsten identischen Bedingungen zeigte, dass HE5/CD52 in BHK-21-Zellen nicht endogen exprimiert ist (Abbildung nicht gezeigt).

4.1.3 Charakterisierung des rekombinant exprimierten HE5/CD52 mit Hilfe von Antikörpern

Durch die indirekte Immunfluoreszenz (Abb. 4.1) war nachgewiesen, dass HE5/CD52 sich in BHK-21-Zellen rekombinant exprimieren lässt. Für die weitere Charakterisierung (Reaktivität mit unterschiedlichen Antikörpern, Inkubation mit verschiedenen Glykosidasen und anschließende Detektion mit Antikörpern) wurde das rekombinante Produkt durch SDS-PAGE und Western-Blotting untersucht. Hierfür wurde rekombinantes HE5/CD52 in größerer Menge und in extrahierter Form benötigt. Es wurden für die weiteren Versuche größere Kulturschalen benutzt, die Zellen wurden nach Transfektion und Produktion des rekombinanten HE5/CD52 von den Kulturschalen abgeschabt. Durch Folch-Extraktion wurde hieraus rekombinantes HE5/CD52 angereichert (Xia et al. 1991, Hale et al. 1993) und stand somit für nachfolgend beschriebene Experimente in solubilisierter Form zur Verfügung.

Rekombinant in BHK-Zellen exprimiertes HE5/CD52 wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung der im Folch-Extrakt enthaltenen Proteine und nachfolgendem Western-Blotting zunächst mit dem CAMPATH-1-Antikörper nachgewiesen (Abb. 4.2). Dieser Antikörper ermöglicht keinerlei Aussage über die jeweils vorhandene Art der Glykosylierung, wohl aber darüber, ob das Peptid überhaupt exprimiert wurde. Über die Laufweite im SDS-PAGE kann aber bereits ausgesagt werden, ob das Asparagin innerhalb des Sequons für eine Glykosylierung in Anspruch genommen wurde. Über die Anzahl der Banden im SDS-PAGE lassen sich vorsichtige Rückschlüsse auf das Ausmaß an Mikroheterogenität ziehen. Eine Bande kann durchaus mehrere oder sogar viele Glykoformen repräsentieren. Da die CAMPATH-1-Immunreaktivität außer den drei C-terminalen Aminosäuren auch Elemente der GPI-Anker-Struktur benötigt, kann über dieses Experiment bei positivem Befund auch eine Aussage über das Vorhandensein eines GPI-Ankers im rekombinant exprimierten Peptid gemacht werden. Über eine PNGase-F-Spaltung und eine daraus resultierende größere Laufweite im SDS-PAGE ließ sich das Vorliegen einer N-Glykosylierung im rekombinanten Produkt zeigen.

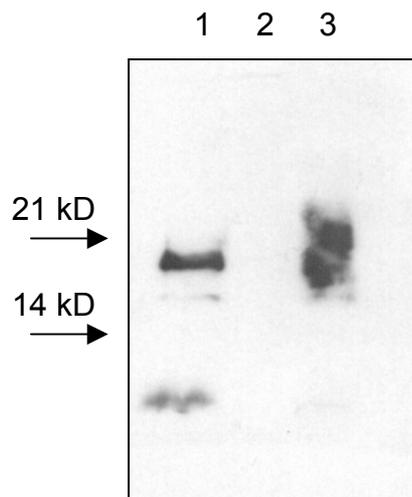


Abb. 4.2 Western-Blot-Analyse der Proteine nach transienter Transfektion von BHK-Zellen mit HE5/CD52 im eukaryotischen Expressionsvektor pCR3.1Uni. HE5/CD52 wurde in einem Folch-Extrakt, der aus den von den Kulturschalen abgeschabten Zellen angefertigt wurde, angereichert. Erst-Antikörper war CAMPATH-1M, Zweit-Antikörper Ziege-anti-Ratte, Chemilumineszenzdetektion. Spur 1: 5 μ l Folch-Extrakt der transient mit HE5/CD52 transfizierten BHK-Zellen; Spur 2: 5 μ l Folch-Extrakt der als Negativkontrolle mit Leervektor transfizierten BHK-Zellen; Spur 3: 0.5 μ l Folch-Extrakt aus humanem Seminalplasma als Positivkontrolle.

Das Bandenmuster des rekombinanten HE5/CD52 ist nicht so komplex wie das des nativen Produkts (Spur 1 in Abb 4.2). Es werden nur zwei Banden detektiert, die mit Laufweiten zwischen 14 kD und 21 kD in dem Laufweitenbereich liegen wie die des natürlich vorkommenden Seminalplasma-HE5/CD52. Dieses zeigt allerdings auch Banden, die Mikroformen mit kleinerem und auch größerem Molekulargewicht anzeigen bzw. mit größeren und kleineren Laufweiten (Spur 3). Die Mikroheterogenität des rekombinant in BHK-21-Zellen exprimierten HE5/CD52 scheint weniger ausgeprägt als die des nativen Glykopeptids aus dem männlichen Genitaltrakt, wenn man die Anzahl der Banden nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine als qualitatives Maß für die Vielfalt der vorkommenden Glykoformen eines Glykoproteins nimmt.

4.1.4 Generierung und rekombinante Expression des HE5/CD52- β -Allels

Das HE5/CD52-Gen kommt in der europäischen Bevölkerung in zwei Allelen vor (Hale et al. 1996, Kirchhoff et al. 1993). Nur eines dieser beiden Allele, das HE5- α -Allel, lag als Plasmid vor. Es wurde zunächst die dem β -Allel entsprechende cDNA-Sequenz generiert und im Expressionsvektor pCR3.1Uni zur Transfektion von BHK-21-Zellen verwendet.

4.1.5 Herstellung des Konstrukts zur Transfektion mit HE5/CD52- β

Ausgehend von der HE5/CD52- α -Sequenz, die mit der Sequenz CDw52 identisch ist, wurde durch Verwendung spezieller Oligonukleotid-Primer durch stellenspezifische punktgenaue Mutagenese das β -Allel des HE5/CD52 im Expressionsvektor pCR3.1-Uni erhalten. Die korrekte Sequenz wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft.

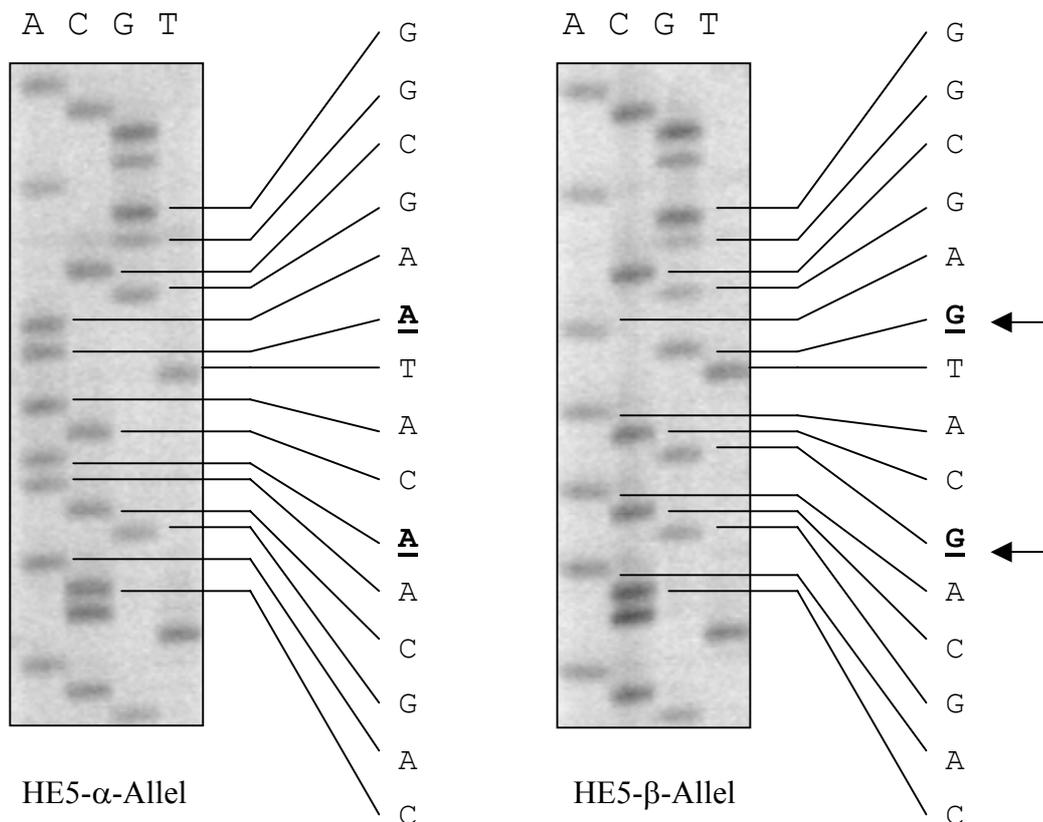


Abb. 4.3 Ausschnitt aus der Sequenzierung der beiden Allele HE5/CD52- α (links) und HE5/CD52- β (rechts) in einer einem Autoradiogramm nachempfundenen Darstellung. Die Abbildung zeigt von unten nach oben ansteigend die 5'-3'-Richtung der cDNA-Sequenz des kodierenden Stranges für den Bereich der das reife Peptid kodierenden Sequenz, wie er in Abb.1.2 gezeigt ist. Die mit Pfeilen markierten Positionen zeigen die durch stellenspezifische Mutation veränderten Nukleotide an. Ausgehend von der cDNA-Sequenz, die für HE5- α kodiert, führt dies auf Aminosäure-Ebene zum Austausch von Asparagin gegen Serin an Position $\omega+4$ sowie von Isoleucin gegen Methionin an Position $\omega+5$ im Bereich der GPI-Anker-Sequenz.

Die Sequenzierung (Abb. 4.3) zeigt das Vorliegen der erwünschten Mutationen durch einen Austausch von G gegen A in Position 2 des Codons für $\omega+4$ sowie G gegen A an Position 3 des Codons $\omega+5$. Dies führt zum Austausch von Asparagin gegen Serin an Position $\omega+4$

sowie von Isoleucin gegen Methionin an Position $\omega+5$. Diese Positionen sind Teil der GPI-Anker-Sequenz. Diese liegt im reifen, prozessierten Peptid nicht mehr vor, hat aber vor der proteolytischen Spaltung eine Funktion beim Transport innerhalb der Zelle. Den Aminosäurepositionen $\omega+4$ und $\omega+5$ kommt in GPI-Anker-Signalsequenzen eventuell besondere funktionelle Bedeutung zu (Eisenhaber et al. 1998).

Die stellenspezifische Mutagenese lieferte somit das erwünschte Resultat. Beide Allele des HE5/CD52-Gens lagen nun als Plasmide in dem für eine Transfektion eukaryotischer Zellen geeigneten Expressionsvektor pCR3.1-Uni vor.

4.1.6 Expression des HE5/CD52- β in BHK-Zellen

Im folgenden Experiment wurden BHK-Zellen mit dem für HE5/CD52- β kodierenden Sequenzausschnitt im eukaryotischen Expressionsvektor pCR3.1Uni transient transfiziert. Ebenso wie bei der oben beschriebenen Transfektion von BHK-21-Zellen mit dem Konstrukt für HE5/CD52- α wurde dem Kulturmedium nach der Transfektion das expressionsverstärkende Agens Natriumbutyrat zugesetzt (Gorman und Howard 1983).

Es wurde ein Folch-Extrakt der Proteine angefertigt, mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Western-Blotting mit dem CAMPATH-1-Antikörper analysiert (Abb. 4.4).

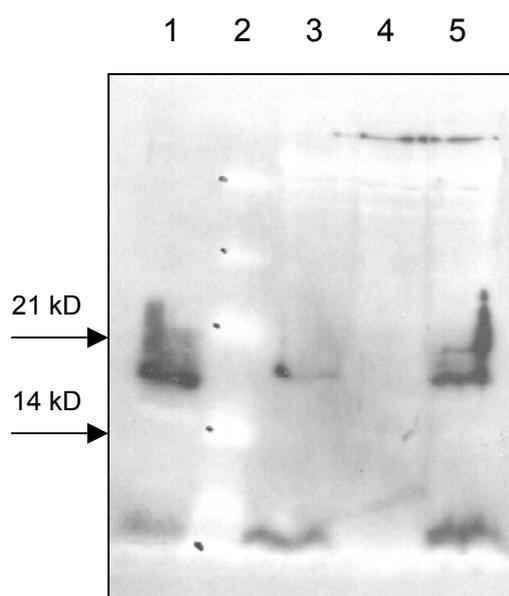


Abb. 4.4 Western-Blot-Analyse der Proteine nach transienter Transfektion von BHK-Zellen mit beiden Allelen des HE5/CD52 im eukaryotischen Expressionsvektor pCR3.1Uni, Erst-Antikörper CAMPATH-1M.

Spur 1: 1.0 μ l Folch-Extrakt aus humanem Seminalplasma als Positivkontrolle; Spur 2: Größenmarker; Spur 3: 10.5 μ l Folch-Extrakt der transient mit HE5/CD52- α -Allel transfizierten BHK-Zellen; Spur 4: 10.5 μ l Folch-Extrakt der als Negativkontrolle mit Leervektor transfizierten BHK-Zellen; Spur 5: 10.5 μ l Folch-Extrakt der transient mit dem β -Allel von HE5/CD52 transfizierten BHK-Zellen.

Beide Allele des HE5/CD52 wurden nach transienter Transfektion der BHK-Zellen rekombinant exprimiert (Abb 4.4). Bei gleichen Transfektions-, Kultur- und Aufarbeitungsbedingungen der Ansätze für die beiden unterschiedlichen Allele sowie die Transfektion mit dem Leervektor scheint das HE5/CD52- β -Allel (Spur 5) stärker exprimiert als das α -Allel (Spur 3).

Bei der rekombinanten Expression von CD52 in CHO-Zellen wird ein gegenteiliges Ergebnis beschrieben (Hale et al. 1996). In JURKAT-Zellen beobachten die Autoren eine vergleichbar gute Expression beider Allele. So könnte die Prozessierung der beiden Allele in unterschiedlichen Zelllinien unterschiedlich effektiv verlaufen. Ein sehr wichtiger Unterschied zur heterologen rekombinanten Expression des HE5/CD52 in BHK-21-Zellen ist, dass dieses eine transiente Transfektion war; im Falle der CHO- und auch der JURKAT-Zellen wurden die beiden CD52-Allele über eine stabile Transfektion in die Zelllinie eingebracht (Hale et al. 1996).

4.1.7 Charakterisierung des rekombinant exprimierten HE5/CD52- α

Zur Charakterisierung des rekombinant exprimierten HE5/CD52 wurde eine PNGase-F-Spaltung durchgeführt. Es wurde die Immunreaktivität des spermien-spezifischen Antikörpers H6-3C4 mit rekombinant exprimiertem HE5/CD52 untersucht.

4.1.8 PNGase F-Spaltung des rekombinanten HE5/CD52

Durch die Endoglycosidase PNGase F (Peptidyl-N-Acetyl-Glucosaminidase aus *Flavobacterium meningosepticum*) lassen sich N-Glykane direkt an der Bindungsstelle zwischen dem Asparagin des Peptidrückgrats und dem proximalen N-Acetylglucosamin der Chitobiose-Einheit des N-Glykans abspalten (Abb. 4.5). Durch Inkubation des mit rekombinantem HE5/CD52 angereicherten Folch-Extrakts mit PNGase F und anschließendem Western-Blotting mit dem CAMPATH-1-Antikörper, der für seine Immunreaktivität keine Zuckerkomponente in seinem Epitop auf HE5/CD52 benötigt, sollte das Vorliegen einer N-Glykosylierung im rekombinanten Peptid überprüft werden.

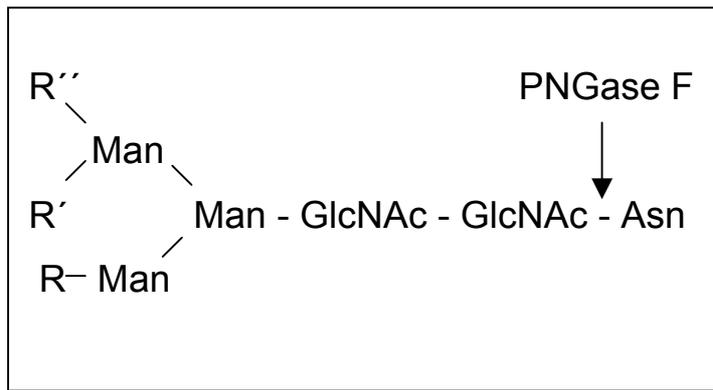


Abb. 4.5 Schematisch dargestellte Spaltstelle der Endo-Glykosidase PNGase F. Es wird direkt die Bindung des proximalen N-Acetyl-Glucosamin der Chitobiose-Einheit zum Asparagin im Sequon Asn-X-Ser/Thr der Peptidkette hydrolytisch gespalten.

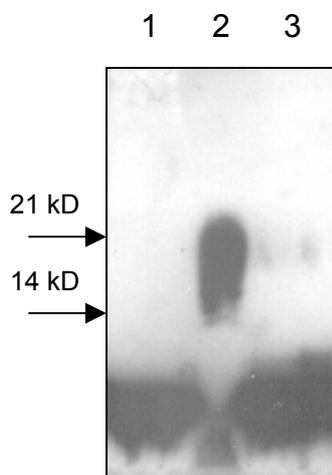


Abb. 4.6 Western-Blot-Analyse des rekombinant in BHK-Zellen exprimierten HE5/CD52 nach Behandlung des Folch-Extrakts aus von den Kulturschalen abgeschabten Zellen, in dem HE5/CD52 angereichert ist, mit PNGase F und SDS-PAGE. Erst-Antikörper war CAMPATH-1M, Zweit-Antikörper Ziege-anti-Ratte, Detektion mit Chemilumineszenz. Spur 1: 10.5 μ l Folch-Extrakt aus transient mit HE5/CD52 transfizierten BHK-Zellen; Spur 2: 0.5 μ l Folch-Extrakt aus humanem Seminalplasma ohne Dau mit PNGase F (als Negativkontrolle); Spur 3: 0.5 μ l Folch-Extrakt aus humanem Seminalplasma nach Behandlung mit PNGase F (als Positivkontrolle).

Der als Positivkontrolle mit nativem, aus humanem Seminalplasma im Folch-Extrakt angereichertem HE5/CD52 durchgeführte Versuch zeigt nach PNGase-F-Inkubation im Western-Blot eine Reduktion der Laufweite auf weit unter 14 kD (Abb. 4.6, Spur 1). Das theoretische Molekulargewicht ist 2.6 bis 3.3 kD für deglykosyliertes HE5/CD52 (Schröter et al. 1999). Für den Ansatz ohne Zugabe von Enzym wird die scheinbare Masse von 14 bis 21 kD erhalten (Spur 2). Bei der Inkubation des rekombinanten Peptids mit PNGase F erhält man in der Western-Blot-Analyse mit dem CAMPATH-1-Antikörper ein Signal, das in seiner Laufweite mit weit unter 14 kD etwa der Laufweite des deglykosylierten nativen HE5/CD52 aus Seminalplasma entspricht (Spur 3). Rekombinant in BHK-21-Zellen exprimiertes HE5/CD52 ist folglich N-glykosyliert.

4.1.9 Untersuchung des rekombinanten HE5/CD52 aus BHK-Zellen mit dem spermien-spezifischen Antikörper H6-3C4

Das rekombinante HE5/CD52 aus BHK-21-Zellen ist N-glykosyliert und zeigt Mikroheterogenität (Abb. 4.6). Ob ein Teil der Glykostrukturen des rekombinanten HE5/CD52 spermien-spezifischen Zuckermotiven entspricht, wie sie auf Seminalplasma-HE5/CD52, nicht aber auf CD52 aus Lymphozyten vorkommen, sollte im folgenden Experiment untersucht werden. Hierfür stellt der Antikörper H6-3C4 ein ideales Werkzeug dar. Er zeigt Immunreaktivität mit dem Genitaltrakt-, nicht aber mit dem Lymphozyten-CD52. Zunächst sollte überprüft werden, wie sich Behandlung eines Folch-Extrakts aus Seminalplasma mit PNGase F auf die Immunreaktivität des Antikörpers H6-3C4 mit dem nativen HE5/CD52 auswirkt.

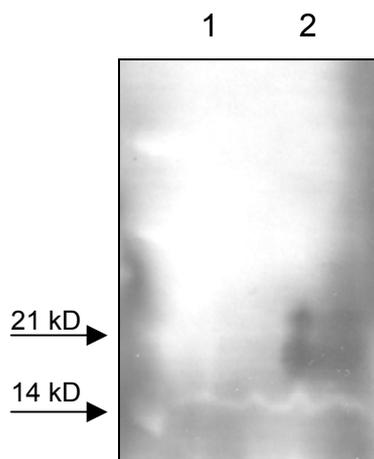


Abb. 4.7 Western-Blot der Proteine in einem Folch-Extrakt aus humanem Seminalplasma nach Behandlung mit PNGase F, SDS-PAGE und Western-Blotting. Der verwendete Erst-Antikörper war H6-3C4. Spur 1: Folch-Extrakt nach Behandlung mit PNGaseF; Spur 2: Folch-Extrakt ohne Zugabe von Enzym (Negativkontrolle).

Wie aus obigem Befund für die Reaktion von Seminalplasma-HE5/CD52 mit dem Antikörper H6-3C4 nach PNGase F-Behandlung ersichtlich (Abb. 4.7), ist zumindest ein essenzieller Bestandteil der antigenen Determinante des HE5/CD52 eine Glykostruktur.

Nach Abspaltung des N-Glykans durch die Endo-Glykosidase PNGase F (Tarentino et al. 1985) vom Peptidrückgrat des nativen Produktes verschwindet die Immunreaktivität des H6-3C4 (Abb. 4.7, Spur 1). Dieser Antikörper richtet sich also gegen eine Kohlenhydratstruktur, entweder als gesamtes Epitop (Glykotop), oder aber das Epitop des HE5/CD52, gegen das der Antikörper H6-3C4 gerichtet ist, besteht zumindest zu einem Teil aus einem Zuckermotiv.

Der spermien-spezifische Antikörper H6-3C4 zeigt keine Immunreaktivität mit dem rekombinanten Produkt. Trotz Vorliegens einer N-Glykosylierung sind demnach keine

spermienspezifischen Glykoformen des HE5/CD52 vorhanden, jedenfalls nicht solche Zuckermotive, gegen die der Antikörper H6-3C4 gerichtet ist.

4.1.10 Charakterisierung des Glykotopts in nativem HE5/CD52 durch sequenzielle Exoglykosidase-Spaltung

Nach diesem grundsätzlichen Nachweis der Beteiligung einer Glykokomponente an der Immunreaktivität von Genitaltrakt-HE5/CD52 mit dem Antikörper H6-3C4 ist nun von Interesse, welche Strukturelemente innerhalb dieser Zuckerkomponente für diese Immunreaktivität in Frage kommen. In einem ersten Versuch wurde Folch-Extrakt aus humanem Seminalplasma mit Sialidase inkubiert, einer Exo-Glykosidase, die terminale Sialinsäuren hydrolytisch spaltet. Im nativen HE5/CD52 aus Seminalplasma sind mehr als 90 % der Lactosaminketten terminal sialyliert (Schröter et al. 1999). Es wurde untersucht, ob die terminalen Sialinsäuren einen Einfluss auf die Reaktivität mit dem Antikörper H6-3C4 ausüben. Denkbar wäre, dass sie unmittelbar zum Glykotopt gehören; möglich wäre auch ein maskierender (*capping*) Effekt für ein darunter liegendes Epitop.

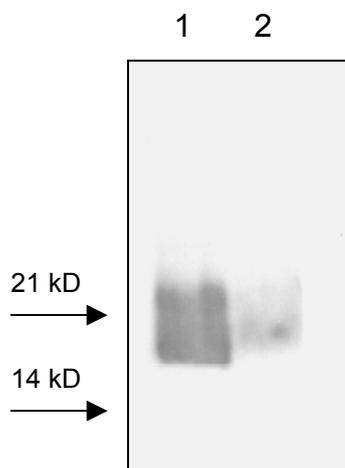


Abb. 4.8 Western-Blot der Proteine eines Folch-Extrakts aus humanem Seminalplasma nach Spaltung mit der Exoglykosidase Sialidase und gelelektrophoretischer Auftrennung mit SDS-PAGE. Erstantikörper war H6-3C4. Spur 1: Folch-Extrakt nach Behandlung mit Sialidase; Spur 2: Folch-Extrakt ohne Zusatz von Sialidase.

Der Antikörper H6-3C4 erkennt sein Epitop auf HE5/CD52 aus Seminalplasma nach Entfernung der terminalen Sialinsäuren deutlich besser (Abb. 4.8, Spur 1). Zudem werden auch im Vergleich zum nicht desialylierten HE5/CD52 (Spur 2) niedriger laufende Banden durch den Antikörper erkannt. Dies könnte durch die Verkleinerung des Molekulargewichts des HE5/CD52 nach Entfernen der Sialinsäure verursacht sein. Aus der detaillierten Analyse

der Struktur der HE5/CD52-N-Glykane (Schröter et al. 1999) folgt, dass ein Charakteristikum der N-Glykan-Struktur terminal sialylierte Lactosamin-Repeats sind, die im Gegensatz zum Lymphozyten-CD52 teilweise α 1,3-fucosyliert sind. Dies legt die Vermutung nahe, dass ein Teil der genitaltraktspezifischen Glykoformen des HE5/CD52 VIM2-artige Motive sein könnten (Abb. 4.8). Durch sequenzielle Spaltungen mit verschiedenen Exoglykosidasen definierter Spezifität wurde versucht, dieses Zuckermotiv vom nicht reduzierenden Ende her sequenziell abzubauen (Abb. 4.8). Für die Auswahl der Enzyme war die Tatsache entscheidend, dass es sich um ein N-Glykan des komplexen Typs handelt; nur so ist eine sinnvolle Kombination der zur Verfügung stehenden Exoglykosidasen möglich. Die verwendeten Exoglykosidasen waren Sialidase, β -Galaktosidase (Kobata 1979), β -N-Acetylhexosaminidase (Chavira et al. 1984) sowie α -Fucosidase (Edge et al. 1992). Es wurde so gespalten, dass in jeden Ansatz zusätzlich ein weiteres Enzym gegeben wurde. So wurden Ansätze erhalten, die keine, eine, zwei, drei oder vier Exoglykosidasen enthielten. So wurde versucht, in jedem weiteren Ansatz die putative Glykostruktur vom nicht reduzierenden Ende her um jeweils eine weitere Monosaccharideinheit zu verkürzen. Es sollte festgestellt werden, bei welcher Enzymkombination mit dem spermien-spezifischen Antikörper H6-3C4 keine Reaktivität mehr zu beobachten ist.

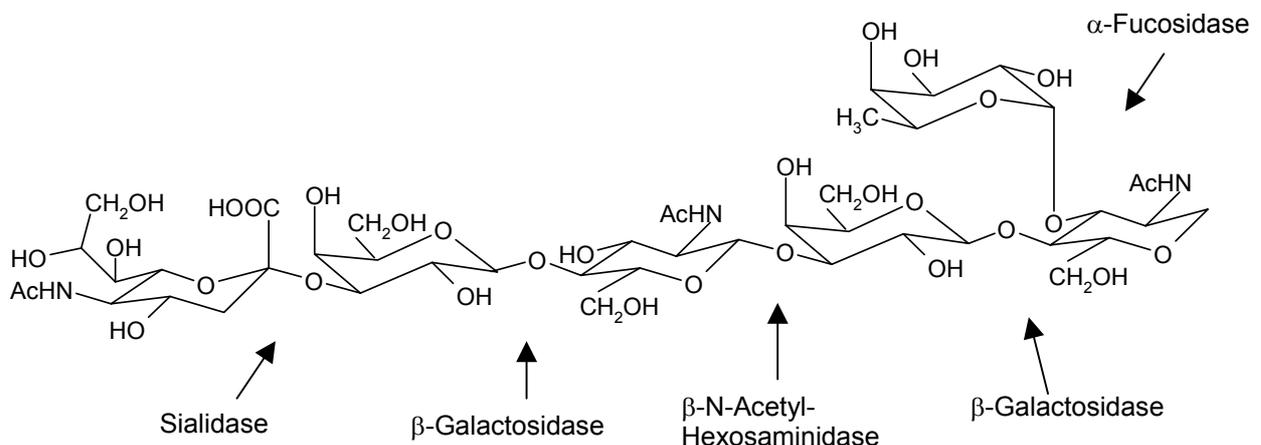


Abb. 4.9 Putatives VIM2-artiges „Glykotop“ (NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc für natives HE5/CD52. Die Spaltstellen der im Experiment verwendeten Exoglykosidasen sind mit Pfeilen markiert.

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Western-Blotting wurde mit dem spermien-spezifischen Antikörper H6-3C4 detektiert (Abb. 4.10). Durch Ermittlung der

Enzymkombination, bei der Immunreaktivität des HE5/CD52 mit dem Antikörper H6-3C4 nicht mehr auftritt, wurde versucht, eine nähere Eingrenzung des Glykotyps vorzunehmen. In einem Parallelversuch wurde bei gleicher Probenbehandlung und Versuchsdurchführung statt mit dem Antikörper H6-3C4 mit dem Lektin aus *Aspergillus purpureas* inkubiert, das spezifisch Glykostrukturen mit α 1-3-gebundener Fucose detektiert (Abb. 4.11).

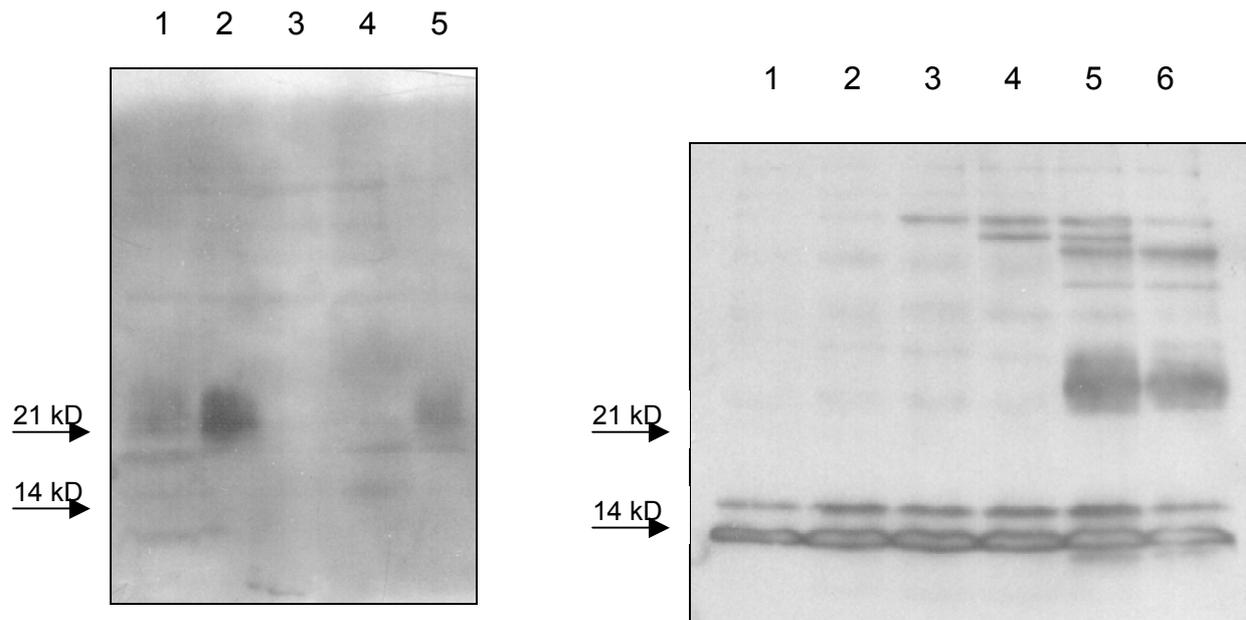


Abb. 4.10 (links) Western-Blot-Analyse mit dem Antikörper H6-3C4 eines Folch-Extraktes aus humanem Seminalplasma nach sequenzieller Exoglykosidasen-Spaltung und SDS-PAGE. Spur 1: Folch-Extrakt aus humanem Seminalplasma; Spur 2: Folch-Extrakt aus humanem Seminalplasma nach Dau mit Sialidase; Spur 3: Folch-Extrakt aus humanem Seminalplasma nach Dau mit Sialidase und Galaktosidase; Spur 4: Folch-Extrakt aus humanem Seminalplasma nach Dau mit Sialidase, Galaktosidase und N-Acetylhexosaminidase.

Abb. 4.11 (rechts) Western-Blot-Analyse eines Folch-Extraktes aus humanem Seminalplasma nach sequenzieller Exoglykosidasen-Spaltung und SDS-PAGE, Entwicklung mit dem α 1-3-Fucose-spezifischen Lektin *Lectin Aspergillus purpureas* als Positivkontrolle. Spur 1: Folch-Extrakt aus humanem Seminalplasma ohne Behandlung mit Glykosidase; Spur 2: Folch-Extrakt nach Inkubation mit Sialidase; Spur 3: Folch-Extrakt nach Inkubation mit Sialidase und Galaktosidase; Spur 4: Folch-Extrakt nach Inkubation mit Sialidase, Galaktosidase und N-Acetylhexosaminidase; Spur 5: Folch-Extrakt nach Inkubation mit Sialidase, Galaktosidase, N-Acetylhexosaminidase und Fucosidase; Spur 6: Folch-Extrakt nach Inkubation mit Sialidase und Fucosidase.

Die Spaltung mit Sialidase zeigt (Abb. 4.8, Spur 1 und Abb. 4.10, Spur 2), dass desialyliertes HE5/CD52 vom Antikörper H6-3C4 deutlich besser erkannt wird als natives HE5/CD52, bei

dem etwa 90 % der Zuckerketten terminal sialyliert sind. Es kann also eine maskierende Funktion der Sialinsäuren angenommen werden. Nach Galaktosidasespaltung ist keine Reaktivität mit dem Antikörper H6-3C4 mehr detektierbar (Spur 3). Nach Sialidase-, Galaktosidase- und N-Acetyl-Hexosaminidase-Spaltung ist dagegen wieder Reaktivität mit dem Antikörper H6-3C4 erkennbar (Abb. 3.9, Spur 4). In einem Vorversuch wurde gezeigt, dass Inkubation mit Fucosidase keinen Einfluss auf die Immunreaktivität des H6-3C4 hat. Unter der Annahme, dass in den Lactosamin-Repeats nach Spaltung der ersten Galaktoseeinheit durch Galaktosidase und hydrolytischer Spaltung der darunter liegenden N-Acetylglucosamin-Einheit wieder eine terminale Galaktose freigelegt wird, die nicht sofort durch die Galaktosidase abgespalten wird, kann vermutet werden, dass das spermispezifische Glykotop aus Lactosamin-Repeats besteht, die in terminaler Galaktose enden. Das Glykotop wird außerdem durch terminale Sialylierung maskiert.

Der maskierende Effekt der Sialylierung könnte auch ein Grund dafür sein, dass im Falle des rekombinant in BHK-Zellen exprimierten HE5/CD52 keine Immunreaktivität mit dem Antikörper H6-3C4 beobachtet werden konnte. Für eine erfolgreiche rekombinante Expression war nach der Transfektion ein Zusatz von Natriumbutyrate zum Kulturmedium erforderlich. Dieses Reagenz stimuliert die Expression von Sialyltransferasen. Sollten also im rekombinant exprimierten HE5/CD52 nahezu 100 % der Zuckerketten terminal sialyliert sein, während der Anteil terminaler Sialylierung im nativen HE5/CD52 um 90 % liegt, wäre keinerlei terminale Galaktose vorhanden, es lägen nur maskierte Glykotope vor. Dies hätte ein Grund dafür sein können, dass mit dem Antikörper H6-3C4 keine Immunreaktivität zu beobachten war. Zur Prüfung dieser Hypothese wurde für das rekombinant exprimierte HE5/CD52 eine Sialidasespaltung mit anschließender gelelektrophoretischer Trennung und Western-Blotting durchgeführt. Mit dem Antikörper H6-3C4 konnte jedoch keine Reaktivität beobachtet werden (nicht gezeigt).

4.1.11 *In-vitro*-Fucosylierung eines Folch-Extrakts aus humanem Seminalplasma

Die Untersuchung des Expressionsmusters der α 1-3-Fucosyltransferasen im humanen Nebenhoden auf mRNA-Ebene ergab, dass die FUT6-mRNA den weit größten Teil der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs ausmacht (siehe Ergebnisse 4.2). Es wurde eine *In-vitro*-Fucosylierung eines Folch-Extraktes aus humanem Seminalplasma durchgeführt mit den in

diesem Extrakt enthaltenen Glykostrukturen als Akzeptoren, mit GDP-Fucose als Donor und mit rekombinant exprimierter FucTVI als Glykosyltransferase.

In diesem Versuch ist HE5/CD52 im Folch-Extrakt angereichert; diese Durchführung erscheint zunächst einfacher als relativ aufwendige Coexpressionsstudien von FUT6 und HE5/CD52. Als Kontrolle, ob in dieser Versuchsanordnung (Abb. 4.11) überhaupt eine Übertragung von Fucose stattfindet, wurde ein identischer Blot angefertigt und als Erst-Antikörper das Lektin *Lectin Aspergillus purpureas* verwendet, mit dem periphere α 1-3-Fucosylierungen detektiert werden können (Abb. 4.12).

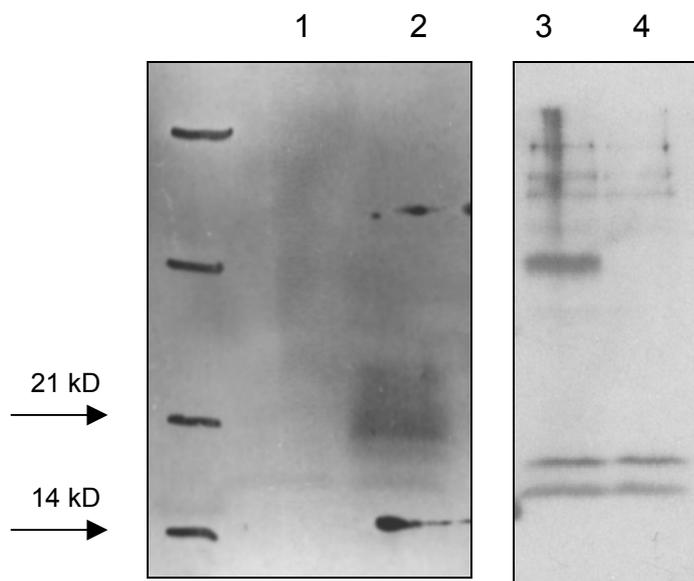


Abb. 4.12 (links) Western-Blot-Analyse der Proteine mit dem Antikörper H6-3C4 nach *In-vitro*-Fucosylierung eines Folch-Extraktes aus humanem Seminalplasma mit rekombinant exprimierter Fuc-TVI und GDP-Fucose. Spur 1: Folch-Extrakt nach Inkubation mit Fuc-TVI und GDP-Fucose; Spur 2: Marker; Spur 3: Folch-Extrakt ohne Inkubation mit Fuc-TVI als Negativkontrolle.

Abb. 4.13 (rechts) Western-Blot-Analyse der Proteine mit einem fucosespezifischen Lektin als Positivkontrolle nach *In-vitro*-Fucosylierung eines Folch-Extrakts aus humanem Seminalplasma mit rekombinant exprimierter FucTVI und GDP-Fucose. Spur 3: Folch-Extrakt nach Inkubation mit Fut6 und GDP-Fucose; Spur 4: Folch-Extrakt ohne Inkubation mit FucTVI als Negativkontrolle.

Die Lektin-Kontrolle (Abb. 4.13) der *In-vitro*-Fucosylierung zeigt in dem Fuc-TVI enthaltenden Ansatz das Auftreten einer starken Bande mit einer Laufweite zwischen 30 und 46 kD (Spur 3), die in dem Kontrollansatz, der ohne Enzymzugabe durchgeführt wurde, nicht zu beobachten ist (Spur 4); das Enzym „funktioniert“ also.

Der Blot, der mit H6-3C4 als Erstantikörper inkubiert wurde (Abb. 4.12), zeigt ein Verschwinden der Immunreaktivität des Antikörpers H6-3C4 nach Fucosylierung des Folch-

Extrakts (Spur 1), während der Kontrollansatz ohne Zugabe der Fucosyltransferase das erwartete Signal bei einer breiten Laufweite um 21 kDa ergibt (Spur 2). Hieraus scheint zunächst zu folgen, dass der Antikörper H6-3C4 sich nicht gegen α 1-3-fucosylierte Strukturen richtet, oder sogar, dass seine Immunreaktivität durch α 1-3-Fucosylierung unterbunden wird. Es wäre auch denkbar gewesen, dass das eigentliche, das native Glykotopt nicht fucosyliert ist, durch Fucosylierung aber keine Beeinflussung der Immunreaktivität erreicht wird, oder sogar nach α 1-3 Fucosylierung eine stärkere Immunreaktivität resultiert.

4.2 Die α 1-3-Fucosyltransferasen des Nebenhodens

4.2.1 Nachweis und Quantifizierung der α 1-3-Fucosyltransferasen auf mRNA-Ebene im humanen Nebenhoden

Aus der genauen Analyse der Zuckerstrukturen des Genitaltrakt-HE5/CD52 war der auffälligste Unterschied zu den beim Lymphozyten-CD52 gefundenen Glykostrukturen das Auftreten peripherer α 1-3-Fucosylierungen (Schröter et al. 1999). In der Annahme, dass dieses Motiv an der Ausbildung eines Spermien-spezifischen Epitops beteiligt sein könnte, wurde untersucht, welche α 1-3-Fucosyltransferasen in welchen Mengen im Nebenhoden vorkommen.

Es wurde deshalb das Expressionsmuster der bisher bekannten humanen sechs α 1-3-Fucosyltransferasen auf mRNA-Ebene in unterschiedlichen Geweben des humanen männlichen Genitaltraktes untersucht. Für einen Nachweis im Northern-Blot-Verfahren waren die mRNA-Mengen nicht häufig genug.

Als alternative Methode und für einen quantitativen Vergleich wurde ein geeigneter Echtzeit-RT-PCR-Assay etabliert. Es wird zunächst dieser Assay beschrieben, im Weiteren werden die mit diesem Assay erhaltenen Expressionsmuster der FUT-mRNAs dargestellt, sowie die Entwicklung einer alternativen, kostengünstigeren und weniger zeitaufwendigen Möglichkeit der relativen Quantifizierung beschrieben.

4.2.2 Auswahl der Oligonukleotid-Primer und Etablierung eines RT-PCR-Assays

4.2.2.1 Theoretische Überlegungen zur Oligonukleotid-Primer-Auswahl

Sowohl der qualitative Nachweis als auch die Quantifizierung der α 1-3-Fucosyltransferasen macht die Verwendung sequenzspezifischer Oligonukleotid-Primer erforderlich. Die α 1-3-Fucosyltransferasen FUT3, FUT5 und FUT6 zeigen in ihren cDNA-Sequenzen eine auffallend hohe Homologie (Abb. 4.14), besonders in den das offene Leseraster der jeweiligen Fucosyltransferase kodierenden Bereichen.

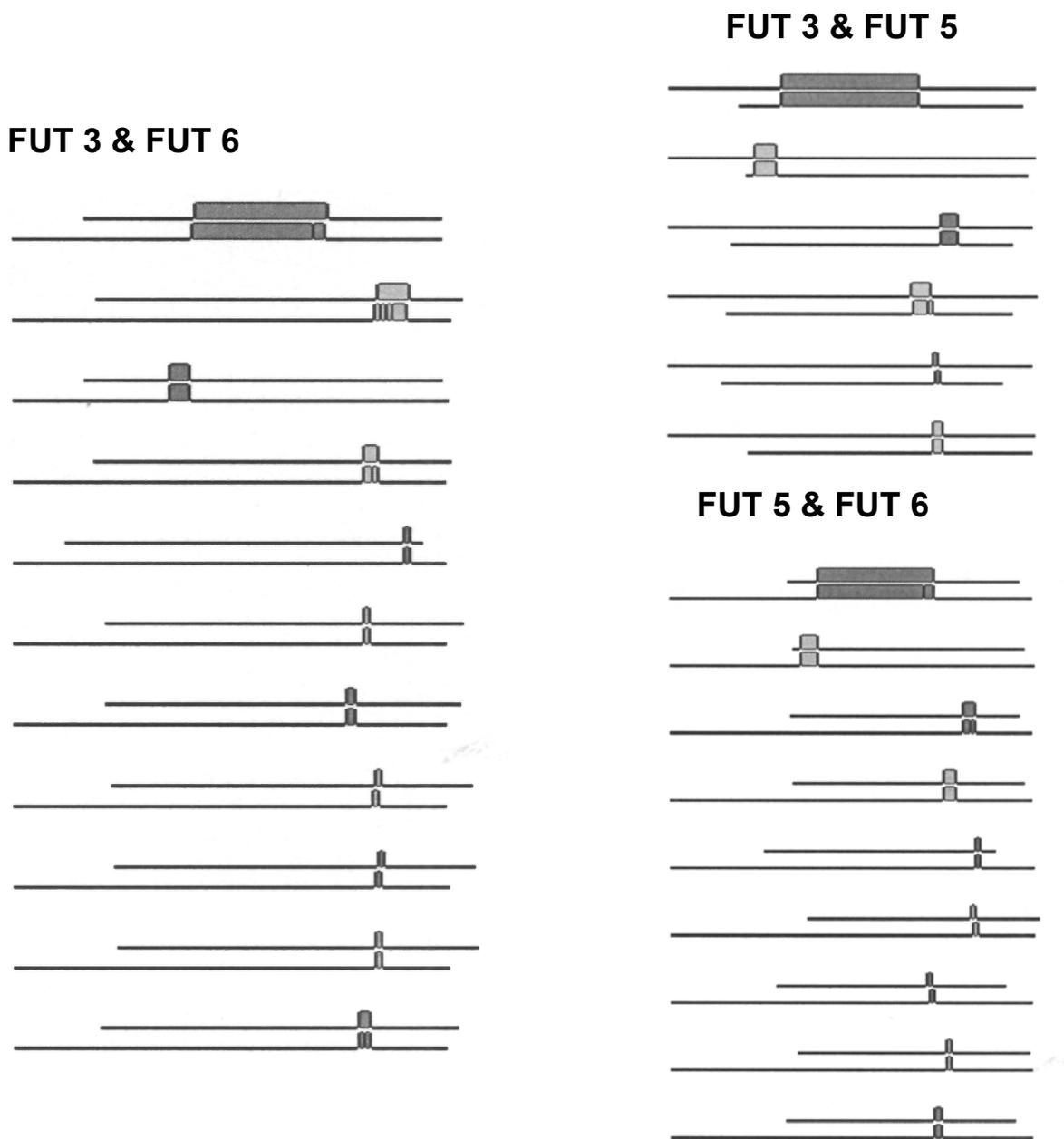


Abb. 4.14 Vergleich der cDNA-Sequenzen der FUT3, FUT5 und FUT6. Gezeigt ist ein Alignment der cDNA-Sequenzen in schematischer Form. FUT3, FUT5 und FUT6 wurden paarweise in den drei möglichen Kombinationen verglichen. Die grau unterlegten Bereiche zeigen Sequenzausschnitte sehr hoher Homologie. Die längsten Abschnitte hoher Homologie liegen in den jeweiligen das offene Leseraster kodierenden Exons. Die Alignments wurden mit dem Programm Blast des öffentlich zugänglichen NCBI-Servers erstellt.

Bei der Auswahl von Oligonukleotid-Primern aus den hochhomologen Bereichen ist die Gefahr relativ groß, Oligonukleotid-Primer zu erhalten, die an die zu diesen Bereichen hochhomologen Sequenzen der anderen beiden α 1-3-Fucosyltransferase-cDNAs, die in Abbildung 3.13 gezeigt sind, hybridisieren.

Außerdem gibt es eine Vielzahl von Spleißvarianten (für FUT 3 Abb. 4.15, für FUT 6 Abb. 4.16). Vermutlich sind noch gar nicht alle tatsächlich vorkommenden, durch alternatives Spleißen der mRNA entstandenen Varianten bekannt, die auch gewebsspezifisch vorkommen können.

In Abbildung 4.15 und 4.16 ist schematisch die genomische Struktur für FUT3 und FUT6 gezeigt, die tandemartig benachbart auf Chromosom 19 des Menschen liegen.

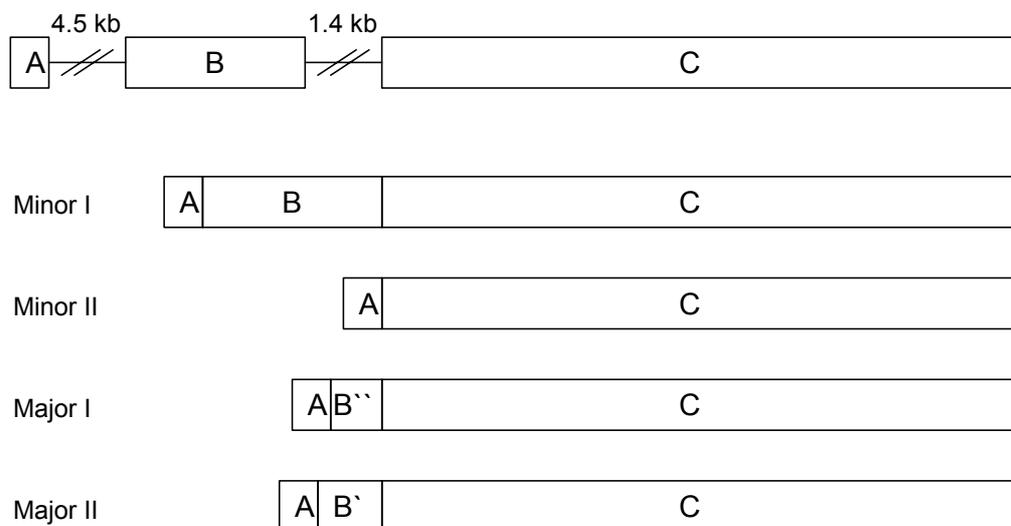


Abb. 4.15 Schematische Darstellung der Spleißvarianten der FUT3 (nach Cameron et al. 1995). Gezeigt ist die genomische Struktur und Organisation der Exons für FUT3. Die vier mit Minor I, Minor II, Major I und Major II bezeichneten Strukturen sind bisher nachgewiesene Transkripte, die sich aus der in der oberen Zeile dargestellten genomischen Struktur ableiten lassen. Exons B' und B'' sind „verkürzte“ Versionen des Exons B, denen Sequenzen aus dem 5'-Bereich von Exon B fehlen. An Exon C schliesst sich das Polyadenylierungssignal an. Das offene Leseraster ist monoexonisch und befindet sich in Exon C.

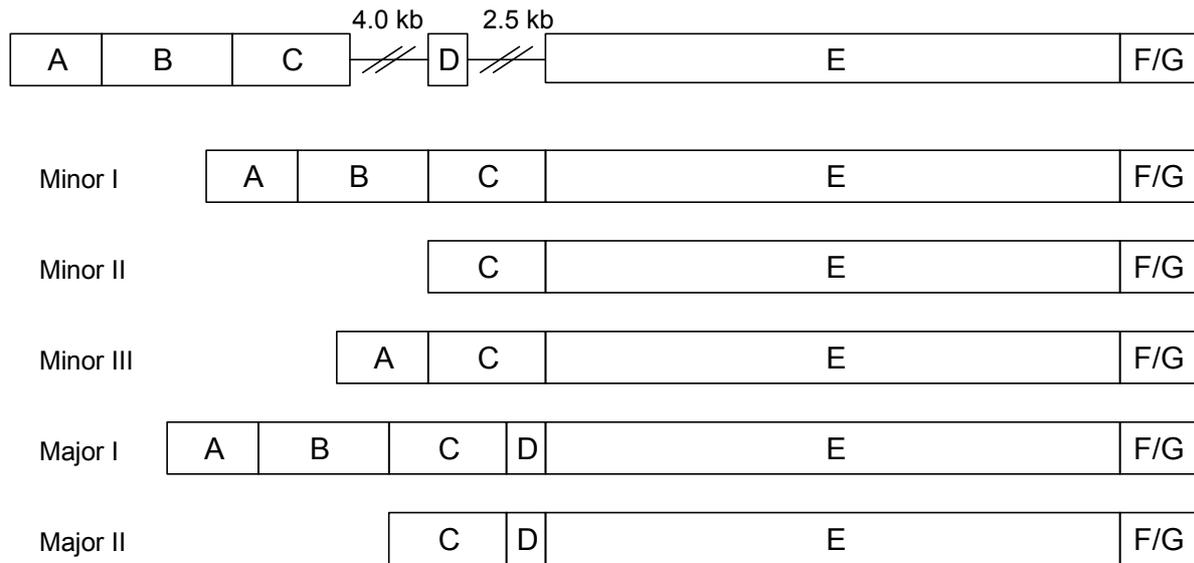


Abb. 4.16 Schematische Darstellung der Spleißvarianten der FUT6 (nach Cameron et al. 1995). Gezeigt ist die genomische Struktur sowie die Organisation der Exons der FUT6. Die gezeigten Spleißvarianten Minor I, Minor II, Minor III, Major I sowie Major II sind bisher gefundene Transkripte, die teilweise durch alternatives Spleissen gebildet werden. An Exon E schliesst sich Exon F oder Exon G an, wobei Exon G eine am 3'-Ende verlängerte Form des Exon F darstellt. Die FUT6 hat ein monoexonisches offenes Leseraster, das im Bereich von Exon E kodiert wird. An Exon F bzw. Exon G schliesst sich das Polyadenylierungssignal an.

Die Abbildungen 4.15 und 4.16 zeigen, dass das einzige Exon der FUT3, das in allen bisher bekannten Spleißvarianten vorkommt, Exon C (sowie Exon B'' als den 3'-Bereich des Exons B beinhaltendes Exon) ist. Im Falle der FUT6 ist dieses das Exon E. In diesen beiden Exons ist auch das offene Leseraster der jeweiligen α 1-3-Fucosyltransferase kodiert.

Beim Design der Oligonukleotid-Primer musste deshalb sehr sorgfältig vorgegangen werden, um wirklich die gewünschte Sequenz zu amplifizieren und nicht eine der beiden anderen hochhomologen Sequenzen zu erfassen. Dies wurde durch Subklonierung der amplifizierten Fragmente in pGEMTeasy und anschließende Sequenzierung der entsprechenden Amplifikate abgesichert. Diese Sequenzierungen zeigten außerdem, dass die Gewebe von Lewis-positiven Patienten stammten.

Zur Subklonierung wurde direkt das Produkt aus der Amplifikation mit dem LightCycler und dem später auch zur Quantifizierung angewandten Temperatur/Zeit-Programm verwendet. Das Amplifikationsprogramm wurde kurz vor Erreichen der Plateauphase abgebrochen. Dies man kann direkt auf dem Display verfolgen, auf dem während eines PCR-Laufs die Fluoreszenz gegen die Zeit aufgetragen wird. Für die Propagation wurden *E.-coli-CJ236*-Zellen benutzt, die defizient für das Enzym Uracil-DNA-Glykosylase sind. Dieses Enzym degradiert DNA, die dUTP statt dTTP enthält. Nukleotidmischungen mit dUTP werden

manchmal in der PCR verwendet, um so genannte *carry over contaminations* in PCR-Ansätzen unschädlich machen zu können, indem man die Reaktionsansätze vor dem Start der PCR mit Uracil-DNA-Glykosylase inkubiert und somit durch vorherige PCR-Versuche bedingte (ins nächste Experiment verschleppte) Kontaminationen beseitigt.

Weiterhin sollten die Oligonukleotid-Primer derart an die cDNA-Sequenz hybridisieren, dass ein Amplifikat gebildet wurde, das alle Spleißvarianten der entsprechenden mRNA im Gewebe repräsentiert. Hierdurch war es für die FUT3 und die FUT6 nicht möglich, die Primer intronüberspannend zu wählen, was wünschenswert gewesen wäre, um eine Beeinflussung der Messung durch genomische DNA-Kontamination ausschließen zu können. Man könnte in einem solchen Fall genomische Kontaminationen an der Bildung eines weiteren, längeren Amplifikates erkennen. Dieses Amplifikat wäre um die Länge des Introns länger als das eigentlich erwartete Amplifikat, welches auf ein mRNA Teilchen zurückgeht, bei dem das (genomische) Intron bereits herausgespleißt ist. Ein derartiges Auftreten zweier unterschiedlich langer Banden könnte in der Quantifizierung durch den LightCycler mit SybrGreen allerdings sowieso nicht berücksichtigt werden, es sei denn, die Elongationszeit im PCR-Programm würde so gewählt, dass unter Berücksichtigung der Prozessivität der verwendeten DNA-Polymerase die Zeit für die Amplifikation des längeren, genomischen Fragments nicht ausreichte.

In Abbildung 4.16 ist gezeigt, dass im Falle der FUT6 das einzige Exon, das in allen bisher gefundenen Spleißvarianten dieser Fucosyltransferase vorkommt, das Exon E ist, in welchem auch der das offene Leseraster kodierende Bereich liegt. Somit mussten sowohl der sense- als auch der antisense-Oligonukleotid-Primer in Exon E gelegt werden, um durch ein einziges Primerpaar in der Quantifizierung die Gesamtmenge an Transkript aller Spleißformen der FUT6 erfassen zu können.

Im Falle der FUT3 (Abb. 4.15) gibt es die Exons B' und B'' als verkürzte Versionen des Exons B, denen Teile der 5'-Sequenz des Exons B fehlen, die aber die 3'-gelegene Sequenz des Exons B beinhalten. Somit wären also zwei Exons vorhanden, die in allen Spleißvarianten der FUT3 präsent sind. Dies sind das Exon B'', welches sowohl in Exon B als auch in B' enthalten ist, sowie Exon C. Der Sequenzabschnitt aus Exon B, der das für Exon B, B' und B'' identische 3'-Ende darstellt, ist nur 136 bp lang. Somit ist der Bereich aus Exon C, in dem der antisense-Oligonukleotid-Primer liegen sollte, auf einen relativ kleinen Bereich beschränkt.

Die in diesem Assay zu quantifizierenden Fucosyltransferasen sollten alle durch ein etwa gleich langes PCR-Fragment repräsentiert werden, was letztlich die Etablierung der

alternativen Quantifizierungsmethode ermöglichte (siehe Ergebnisse 4.2.5). Dieses Fragment sollte zwischen 400 und 600 bp lang sein. Wollte man ein Oligonukleotid-Primerpaar zur Quantifizierung der FUT3 mRNA verwenden, das intronüberspannend sein sollte (um in der Messung nicht genomische Kontaminationen mitzuerfassen), ergäbe sich aus dem kleinen Bereich des Exons B'' von Position 485 bis 620 (in der Numerierung der FUT3-Sequenz nach NM_000149), in dem der sense-Oligonukleotid-Primer liegen würde, für den antisense-Oligonukleotid-Primer im Exon C ein größtmögliches Fenster von 336 Nukleotiden zwischen den Positionen $485 + 400 = 885$ und $620 + 600 = 1220$.

In Abbildung 4.17 ist ein Alignment der kodierenden Sequenzen der FUT3 und FUT6 in diesem in Frage kommenden Bereich der FUT3 gezeigt.

FUT 3	GTGCCCGGCA	CAGCCGACTG	CCACATCACT	GCCGACCGCA	924
FUT 6	GTGCCTGGCA	CGGCTGACTG	CAACATCACT	GCCGACCGCA	1442
FUT 3	AGGTGTACCC	ACAGGCAGAC	ACGGTCATCG	TGCACCACTG	964
FUT 6	AGGTGTATCC	ACAGGCAGAC	GCGGTCATCG	TGCACCACCG	1482
FUT 3	GGATATCATG	TCCAACCCTA	AGTCACGCCT	CCCACCTTCC	1004
FUT 6	AGAGGTCATG	TACAACCCCA	GTGCCCAGCT	CCCACGCTCC	1522
FUT 3	CCGAGGCCGC	AGGGGCAGCG	CTGGATCTGG	TTCAACTTGG	1044
FUT 6	CCGAGGCGGC	AGGGGCAGCG	ATGGATCTGG	TTCAGCATGG	1562
FUT 3	AGCCACCCCC	TAAGTGCAG	CACCTGGAAG	CCCTGGACAG	1084
FUT 6	AGTCCCAAG	CCACTGCTGG	CAGCTGAAAG	CCATGGACGG	1602
FUT 3	ATACTTCAAT	CTCACCATGT	CCTACCGCAG	CGACTCCGAC	1124
FUT 6	ATACTTCAAT	CTCACCATGT	CCTACCGCAG	CGACTCCGAC	1642
FUT 3	ATCTTCACGC	CCTACGGCTG	GCTGGAGCCG	TGGTCCGGCC	1164
FUT 6	ATCTTCACGC	CCTACGGCTG	GCTGGAGCCG	TGGTCCGGCC	1682
FUT 3	AGCCTGCCCA	CCCACCGCTC	AACCTCTCGG	CCAAGACCGA	2004
FUT 6	AGCCTGCCCA	CCCACCGCTC	AACCTCTCGG	CCAAGACCGA	1722

```

FUT 3  GCTGGTGGCC TGGGCG  2020
        |||||
FUT 6  GCTGGTGGCC TGGGCA  1738

```

Abb. 4.17 Direkter Vergleich der Sequenzen der FUT3 und FUT6. Gezeigt ist der in allen Spleißvarianten der FUT3 vorkommende Abschnitt aus Exon C, der für die Auswahl eines antisense-Oligonukleotid-Primers im RT-PCR-Assay in Frage käme (Position 885 bis 1220), wollte man den sense-Oligonukleotid-Primer in Exon B' (Position 485 bis 620), welches ebenfalls in allen Spleißvarianten der FUT3 vorkommt, lokalisieren. Vertikale Balken zeigen eine Übereinstimmung der Basen für FUT3 und FUT6 an der entsprechenden Position.

Die Ähnlichkeit der Sequenzen in diesem Bereich ist sehr hoch. Bei einer Länge von 336 Basenpaaren sind 298 identisch, die Identität beträgt folglich 89 %. Hier ist die Auswahl eines anti-sense-Oligonukleotid-Primers schwierig, der für die FUT3 spezifisch wäre, so dass für sense- und antisense-Oligonukleotid-Primer nur ein weiter 3'-gelegener Bereich aus Exon C in Frage kommt, um gewährleisten zu können, dass beide Primer sequenzspezifisch für die FUT3 sind. Liegen die Abweichungen der Sequenzen im 3'-Bereich oder ist wenigstens nur die letzte Base am 3'-Ende abweichend, ist unter stringenten Bedingungen eine spezifische Amplifikation möglich. Hierfür muss aber eine optimale Annealing-Temperatur gewählt werden. Da in dem entwickelten Assay aber FUT3 bis FUT7 mit dem gleichen PCR-Programm quantifiziert wurden, war eine optimale Annealing-Temperatur für jedes Oligonukleotid-Primer-Paar nicht zu gewährleisten. Für fünf unterschiedliche Template fünf hochspezifische Oligonukleotid-Primerpaare mit absolut identischen Annealing-Temperaturen zu finden, ist nicht möglich. Zudem ist, wählte man einen Oligonukleotid-Primer, der nur in der letzten Base am 3'-Ende abweicht, die Gefahr gegeben, dass mit zunehmender Zyklenzahl die DNA-Polymerase thermisch angegriffen wird und somit mit zunehmender Zyklenzahl die exakte Exonukleaseaktivität abnimmt. Bei auf Transkriptebene niedrig exprimierten Templaten wäre somit eine hohe Spezifität nicht mehr zu gewährleisten.

Der längste Abschnitt nicht-identischer Basen ist fünf Nukleotide lang (Position 1052 bis 1056 in der Sequenz für FUT3). Hier einen antisense-Oligonukleotid-Primer mit seinem 3'-Ende zu positionieren schied aber aus, da das Alignment der FUT3 Sequenz mit der FUT5 Sequenz nicht ein 5 Nukleotide langes abweichendes Fenster zeigt (Abb. 4.18), sondern dieses nur drei Nukleotide lang ist.

```

FUT 3  CCCTA  1056
      |      |
FUT 5  CAGCA   551

```

Abb. 4.18 Alignment der Sequenzabschnitte der FUT3 und FUT5 in dem Bereich aus Exon C der FUT3, der mit der FUT6 einen fünf Nukleotide langen ununterbrochenen, nicht identischen Abschnitt darstellt. Vertikale Balken stehen für übereinstimmende Nukleotide in beiden FUT-Sequenzen.

Der antisense-Oligonukleotid-Primer zur Quantifizierung der FUT3-Transkripte wurde ebenso wie der sense-Oligonukleotid-Primer in einen weiter 3'-gelegenen Bereich des Exons C gelegt, wo die Homologie zu den Sequenzen der FUT5 und der FUT6 nicht derart ausgeprägt ist wie in dem eben beschriebenen Sequenzabschnitt.

Für FUT3 und FUT6 war es somit nicht möglich, intronüberspannende Oligonukleotid-Primer auszuwählen. Um der Problematik genomischer Kontamination zu begegnen, wurde für jede cDNA auch eine Negativkontrolle ohne Zugabe Reverser Transkriptase angefertigt und im Assay gemessen. Für die anderen Fucosyltransferasen wurde ebenso verfahren, um einheitliche Assaybedingungen zu Grunde zu legen. Die Sequenzen der sense- und der antisense-Oligonukleotid-Primer sind Tabelle 4.1 zu entnehmen.

4.2.2.2 Vorversuche und Gewinnung der Template für die Standards

Die nach oben näher erläuterten Kriterien ausgewählten Oligonukleotid-Primer wurden in einem Vorversuch mit 2 µl einer humanen epididymalen cDNA (aus 5 µg Gesamt-RNA wurde ein cDNA-Volumen von 100 µl erhalten) getestet. Nach der PCR wurden die Ansätze gelelektrophoretisch getrennt, um Anzahl sowie Laufweite der erhaltenen Banden mit den erwarteten Werten abzugleichen (Abb. 4.19).

Aus Abbildung 4.19 ist ersichtlich, dass jedes Oligonukleotid-Primerpaar nur ein Amplifikat mit der erwarteten Amplifikatlänge bildet. Die Oligonukleotid-Primer, die für die PCR in Abbildung 4.19 verwendet wurden, wurden im RT-PCR-Quantifizierungsassay benutzt.

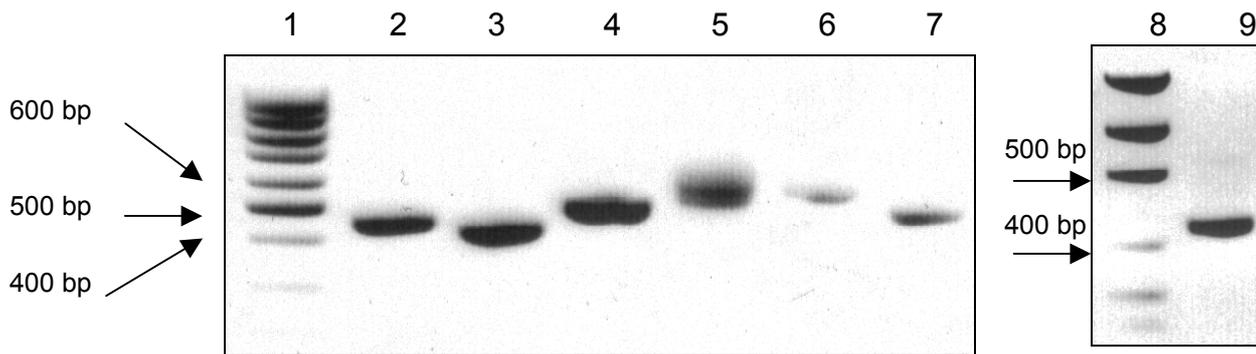


Abb. 4.19 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente aus einer humanen epididymalen cDNA mit den im RT-PCR-Assay verwendeten Primern und PCR-Programmen. Die Sequenzen der Oligonukleotid-Primer sind zu finden in Material und Methoden 3.9. Spur 1: DNA-Marker; Spur 2: FUT3-Fragment (mit den Oligonukleotid-Primern FUT3S/FUT3AS); Spur 3: FUT4-Fragment (mit den Oligonukleotid-Primern FUT4S/FUT4AS); Spur 4: FUT5-Fragment (mit den Oligonukleotid-Primern FUT5S/FUT5AS); Spur 5: FUT6-Fragment (mit den Oligonukleotid-Primern FUT6S/FUT6AS); Spur 6: FUT7-Fragment (mit den Oligonukleotid-Primern FUT7S/FUT7AS); Spur 7: FUT9-Fragment (mit den Oligonukleotid-Primern FUT9S/FUT9AS); Spur 8: DNA-Marker; Spur 9: β -Actin-Fragment (mit den Oligonukleotid-Primern BAS/BAAS).

Zur Erstellung der Standardkurven wurden die der jeweiligen FUT entsprechenden Banden aus einem präparativen Agarosegel mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, die DNA isoliert und eine fotometrische Konzentrationsbestimmung vorgenommen. Es wurden Konzentrationsreihen von 1 pg/ μ l in serieller 1:10-Verdünnung bis herunter auf 10 ag/ μ l angefertigt, im Falle des häufiger exprimierten β -Actin von 10 pg/ μ l bis auf 100 ag/ μ l. Diese Standards bekannter Konzentration wurden zur Erstellung der Eichkurven (Standardkurven) eingesetzt.

4.2.3 Standardreihen und Schmelzpunktanalysen der im RT-PCR-Assay verwendeten Sequenzabschnitte

Im Folgenden sind die Messungen zur Erstellung einer Eichkurve sowie die aus diesen Amplifikaten erhaltenen Schmelzkurven für die FUT3 bis FUT7 sowie für FUT9 und β -Actin aufgeführt. Es wurden die Temperatur/Zeit-Verläufe angewandt, wie sie auch für die Messungen in den unterschiedlichen Geweben benutzt wurden. Aus Gründen der Anschaulichkeit wird in gestrichelter Form jeweils eine cDNA-Probe (aus einer RNA-Präparation aus humanem Nebenhoden) mit aufgeführt. Die Messpunkte der Wasserprobe

(Negativkontrolle) sind als mit Sternchen markierte Kurven gezeigt. Die jeweiligen Temperatur/Zeit-Verläufe (PCR-Programme) sind dem Teil Material und Methoden zu entnehmen.

4.2.3.1 FUT3-Amplifikation

Das folgende Experiment zeigt unter Verwendung der für FUT3 spezifischen Oligonukleotid-Primer die Messung einer humanen epididymalen cDNA-Probe zusammen mit den Standards bekannter Konzentration und einer Wasserprobe, bei der statt Templat das gleiche Volumen an Wasser (PCR-Qualität) als Negativkontrolle in den Reaktionsansatz gegeben wurde.

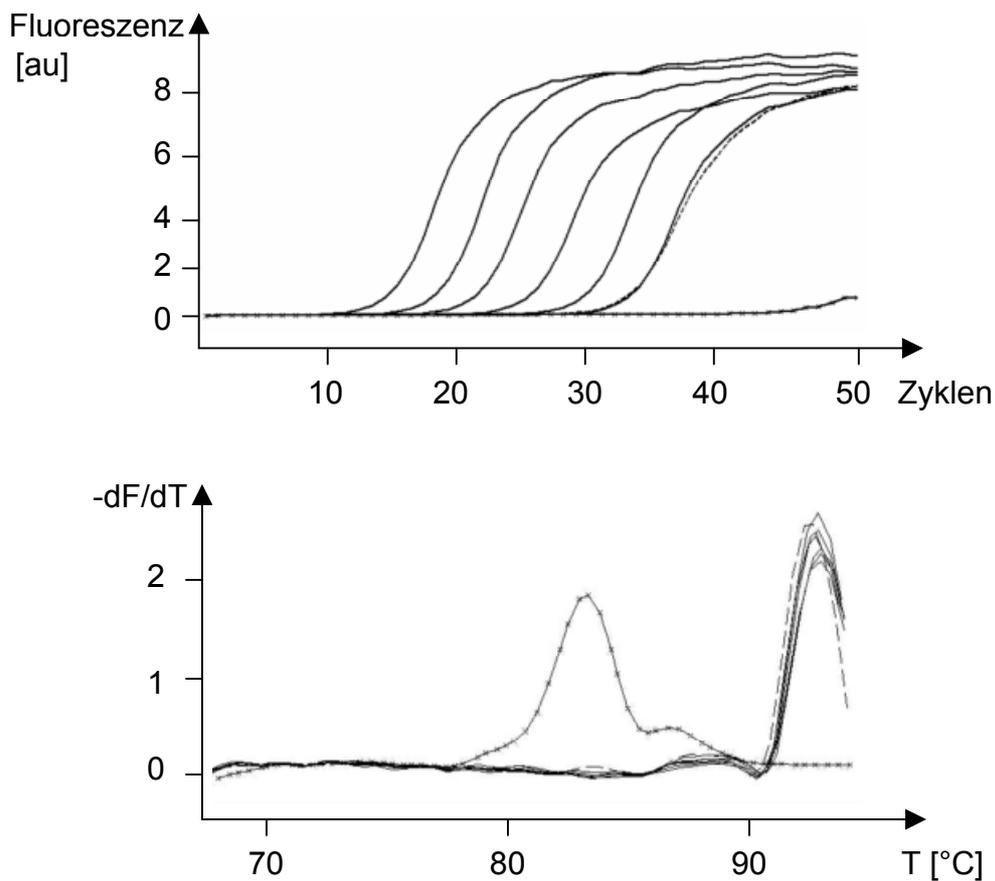


Abb. 4.20 Amplifikation (oben) und Schmelzpunktsanalyse ($-dF/dT$, unten) einer Echtzeit-PCR aus einer humanen epididymalen cDNA mit den FUT3-spezifischen Oligonukleotid-Primern FUT3S und FUT3AS. Die Standards (durchgezogene Linien) decken einen Konzentrationsbereich von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bis 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ in serieller 1:10-Verdünnung ab. Die cDNA-Kurve ist gestrichelt dargestellt, die Wasserkurve gepunktet.

Man sieht einen parallelen Verlauf aller Standardkurven bekannter Konzentration sowie einen hierzu parallelen Verlauf der cDNA-Probe im Bereich des 10 ag/ μ l-Standards (Abb. 4.20, oben). Das bedeutet, dass die Reaktionen mit gleicher Effizienz verlaufen. Dies ist entscheidend für die fehlerfreie Anwendung dieser Quantifizierungsmethode. Ein Signal in der Wasserprobe ist erst nach mehr als 44 Zyklen zu beobachten, entsprechend einer Differenz von mehr als zehn Zyklen zur kleinsten verwendeten Verdünnung des Standard-Amplikons. Das entspricht unter näherungsweise Verwendung einer PCR-Effizienz von 100 % einem Fehler von unter 0.1 % ($1/2^{10} < 0.001$). Zudem ist aus der Schmelzpunktsanalyse (Abb. 4.20, unten) ersichtlich, dass das in der Negativkontrolle gebildete Amplifikat einen von denen der Standards und der cDNA deutlich abweichenden Schmelzpunkt aufweist. Das heißt, dass das in der Wasserprobe gebildete Produkt nicht identisch ist mit dem zu quantifizierenden Amplikon. Es handelt sich hier um ein Produkt aus einer Reaktion der Oligonukleotid-Primer mit sich selbst oder miteinander. Die Wasserprobe in einer „konventionellen“ PCR gibt Auskunft darüber, ob eine Verunreinigung des Probenansatzes mit dem im jeweiligen Experiment zu untersuchenden Templat vorliegt. Anhand einer konventionellen PCR kann nicht ausgesagt werden, ob die Produkte unterschiedliche Schmelzpunkte haben (Identitätskriterium) und mit welcher Differenz in der Zyklenzahl die Produkte in der Wasserprobe und im eigentlichen Reaktionsansatz gebildet werden, wie hoch also der Grad an Kontamination ist. Eine Produktidentifizierung anhand des Schmelzpunktes sowie die Differenz der *crossing points* C_p und somit Signifikanz der Kontamination kann aber mit der LightCycler-Technologie ermittelt werden.

Der Schmelzpunkt des in der Wasserprobe gebildeten Amplifikats liegt mit 83° C deutlich unter der Temperatur der Fluoreszenzmessung während der Quantifizierung (89 °C). Dies bedeutet, dass bei der bei 89 °C erfolgenden Fluoreszenzmessung das in der Wasserprobe gebildete Amplifikat mit einem Schmelzpunkt von 83 °C aufgeschmolzen ist, die DNA also einzelsträngig vorliegt. Mit dieser einzelsträngigen DNA ergibt SybrGreen kein Fluoreszenzsignal. Das in der Wasserprobe gebildete Amplifikat wird also auf Grund seines niedrigeren Schmelzpunktes nicht quantifiziert.

4.2.3.2 FUT4-Amplifikation

Die für die FUT4 ausgewählten Oligonukleotid-Primer geben in der Echtzeit-PCR einen Kurvenverlauf (Abb. 4.21, oben), der für Standards und cDNA-Probe parallel verläuft. Die cDNA-Kurve verläuft zwischen den Standards mit 100 ag/ μ l und 1 fg/ μ l.

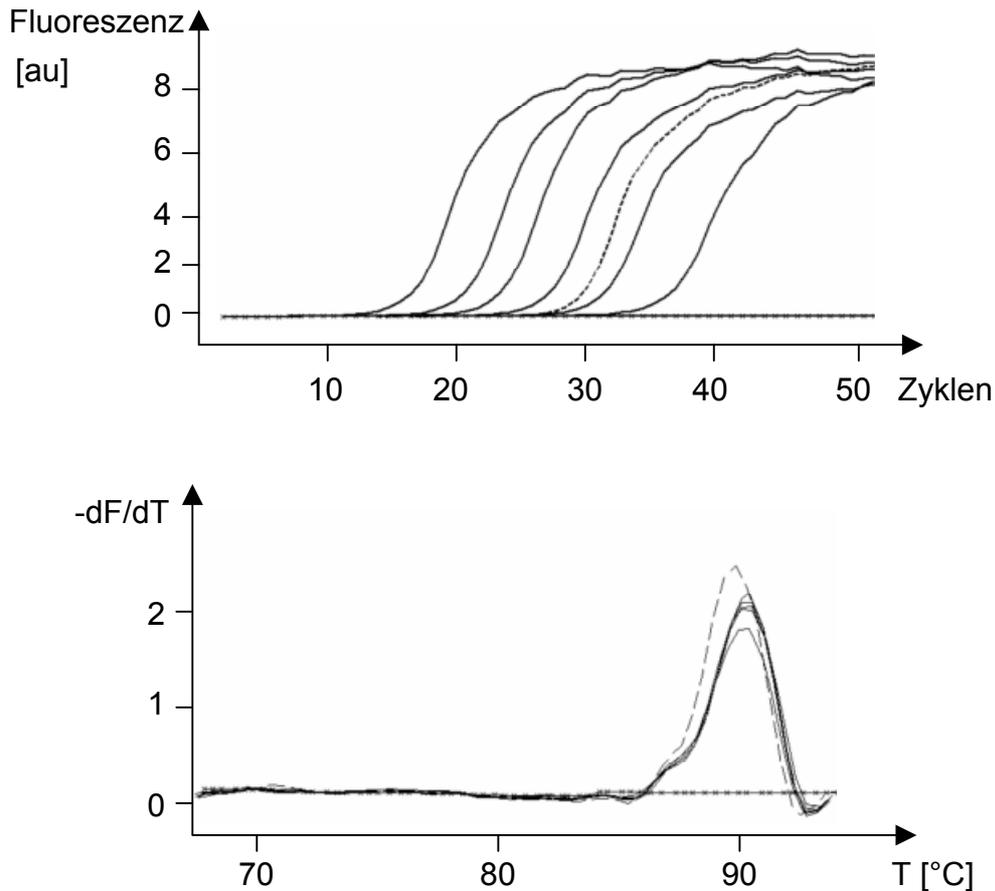


Abb. 4.21 Verlauf (oben) und Schmelzpunktsanalyse (unten, $-dF/dT$) einer Echt-Zeit-PCR aus einer humanen epididymalen cDNA mit den FUT4-spezifischen Oligonukleotid-Primern FUT4S und FUT4AS. Die Standards (durchgezogene Linien) decken einen Konzentrationsbereich von 1 pg/ μ l bis 10 ag/ μ l in serieller 1:10-Verdünnung ab. Die cDNA-Kurve ist gestrichelt dargestellt, die Wasserkurve gepunktet.

Aus der Schmelzpunktsanalyse (Abb. 4.21, unten) ist ersichtlich, dass nur ein Hauptprodukt gebildet wird. Die Schmelzkurve zeigt einen kleinen Nebenpeak an der linken Flanke des Hauptpeaks, der aber zu vernachlässigen ist. Dieses Amplifikat ist in nur äußerst geringer Menge vorhanden. Weiterhin tritt der Nebenpeak sowohl in den Standards als auch in der cDNA-Probe auf, sodass also eine eventuelle Beeinflussung des Messergebnisses für die

cDNA dadurch kompensiert würde, dass die gleiche Beeinflussung auch in der Standardkurve auftritt.

4.2.3.3 FUT5-Amplifikation

Auch im Falle der FUT5 laufen Standard- sowie cDNA-Probe in der logarithmischen Phase der PCR parallel, die Wasserprobe ist negativ (Abb. 4.22, oben). Die cDNA-Kurve verläuft im Bereich des 10-ag/ μ l-Standards.

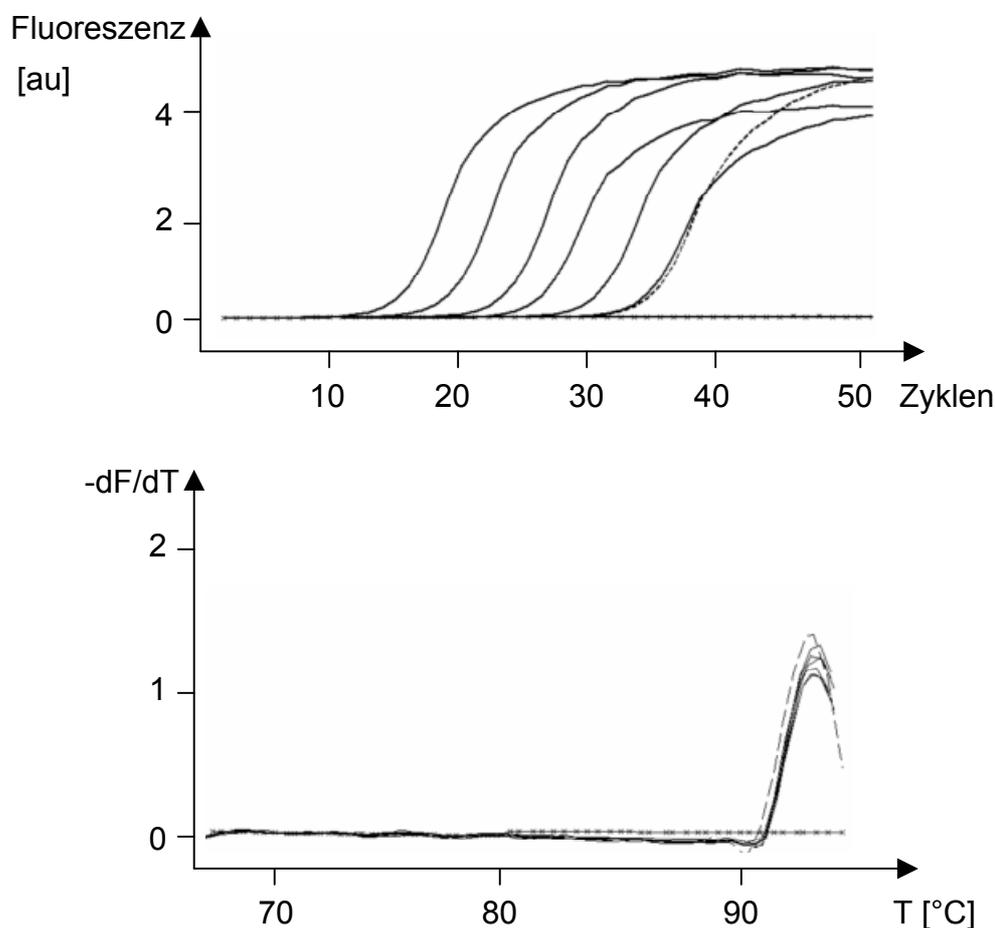


Abb. 4.22 Verlauf (oben) und Schmelzpunktsanalyse (unten, $-dF/dT$) einer Echtzeit-PCR aus einer humanen epididymalen cDNA mit den FUT5-spezifischen Oligonukleotid-Primern FUT5S und FUT5AS. Die Standards (durchgezogene Linien) decken einen Konzentrationsbereich von 1 pg/ μ l bis 10 ag/ μ l in serieller 1:10-Verdünnung ab. Die cDNA-Kurve ist gestrichelt dargestellt, die Wasserkurve gepunktet.

Aus der Darstellung $-dF/dT$ ist ersichtlich (Abb. 4.22, unten), dass keinerlei Nebenprodukte gebildet werden, Schmelzpunkte für Standards und cDNA-Probe sind identisch.

In Abbildung 4.23 ist der Einfluss der Annealing-Temperatur auf die Spezifität einer PCR-Reaktion gezeigt.

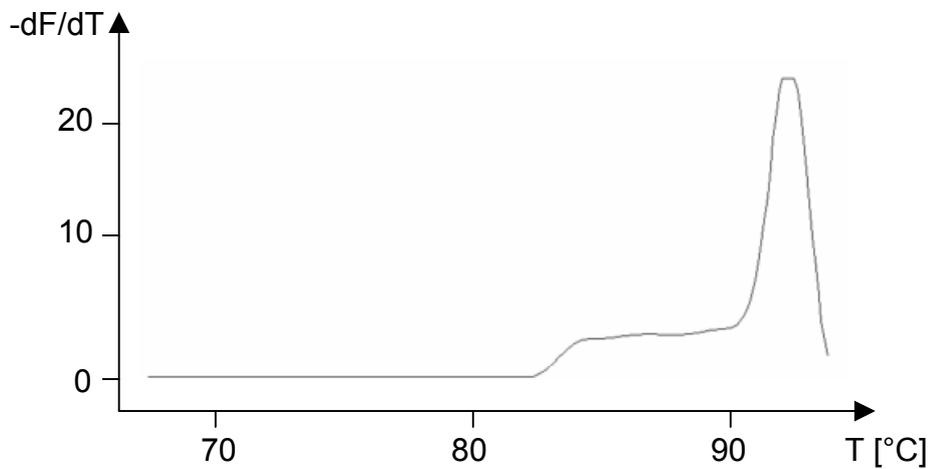


Abb. 4.23 Schmelzpunktsanalyse für das im RT-PCR-Assay verwendete spezifische Fragment der FUT5 bei einer Oligonukleotid-Primer-Annealing-Temperatur von 58 °C anstelle von 65 °C, wie im eigentlichen Quantifizierungsassay verwendet.

Bei Verwendung einer Annealing-Temperatur von 58 °C anstelle von 65 °C zeigt sich in der Darstellung $-dF/dT$ deutlich das Auftreten unspezifischer Produkte im Schmelzbereich ab 82 °C. Durch Erhöhung der Annealing-Temperatur wird die Spezifität der Primer-Anlagerung erhöht, bei einer Hybridisierungstemperatur von 65 °C kommt es nicht mehr zur Bildung unspezifischer Amplifikate.

4.2.3.4 FUT6-Amplifikation

Standard- und cDNA-Kurven für die Amplifikation mit den für die FUT6 spezifischen Oligonukleotid-Primern verlaufen parallel, die Wasserprobe ist negativ (Abb. 4.24, oben). Die cDNA-Kurve verläuft zwischen den 1-fg/ μ l- und 10-fg/ μ l-Standards. Dies spiegelt eine deutlich höhere Menge des FUT6-Templats gegenüber den anderen FUT-Templaten in der cDNA wider.

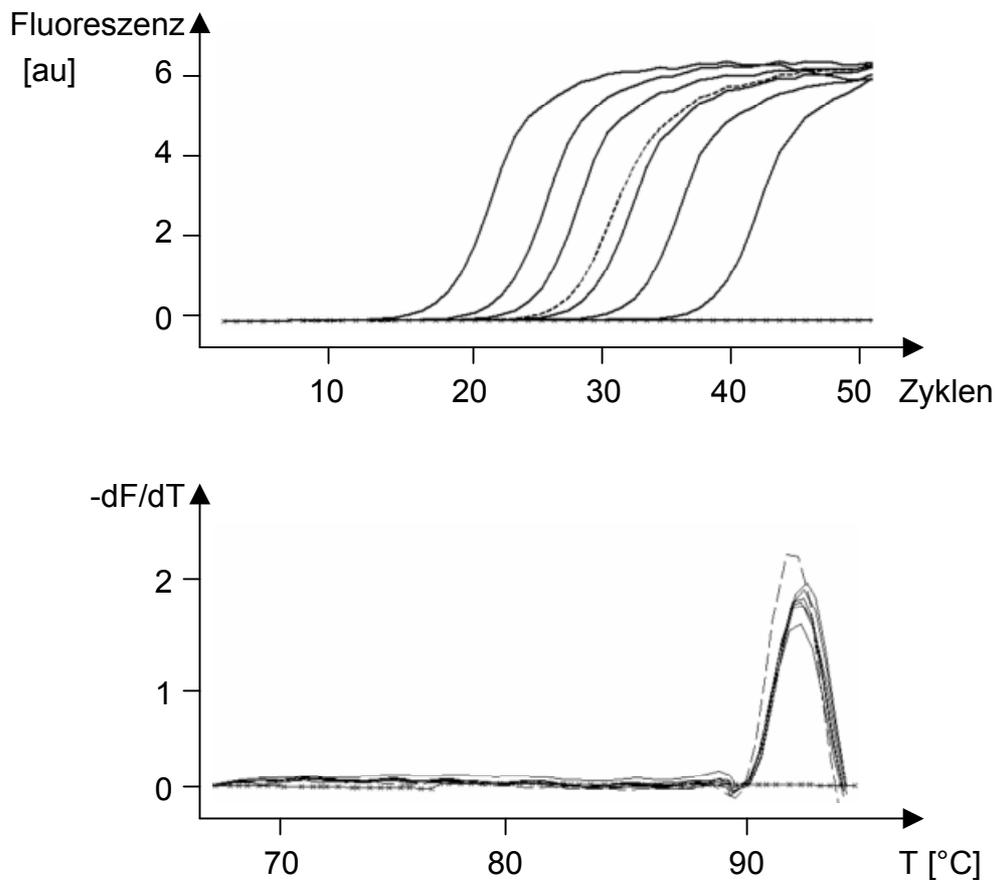


Abb.4.24 Verlauf (oben) und Schmelzpunktsanalyse (unten, $-dF/dT$) einer Echtzeit-PCR aus einer humanen epididymalen cDNA mit den FUT6-spezifischen Oligonukleotid-Primern FUT6S und FUT6AS. Die Standards (durchgezogene Linien) decken einen Konzentrationsbereich von 1 pg/ μ l bis 10 ag/ μ l in serieller 1:10-Verdünnung ab. Die cDNA-Kurve ist gestrichelt dargestellt, die Wasserkurve gepunktet.

Die Schmelzpunktsanalyse (Abb. 4.24, unten) zeigt einen sehr kleinen Nebenpeak, der aber durch Messung der Fluoreszenz bei 89 °C die Quantifizierungsmessung nicht beeinflusst. Die Schmelzpunkte für Standards und cDNA sind nahezu identisch. Leichte Abweichungen sind generell möglich durch einen anderen Salzgehalt sowie eine andere Menge an auch unspezifischen Templaten in der cDNA Probe. Dies beeinflusst das Schmelzverhalten geringfügig.

4.2.3.5 FUT7-Amplifikation

Gezeigt werden Amplifikationsverlauf und Schmelzpunktsanalyse für die Amplifikation mit den für die FUT7 spezifischen Oligonukleotid-Primern. Der Kurvenverlauf ist optimal mit

exakt parallelem Verlauf der Kurven für die Standards und die cDNA in der Auftragung Fluoreszenz gegen Zyklen (Abb. 4.25, oben). Die cDNA-Kurve verläuft im Bereich des 10-ag/ μ l-Standards.

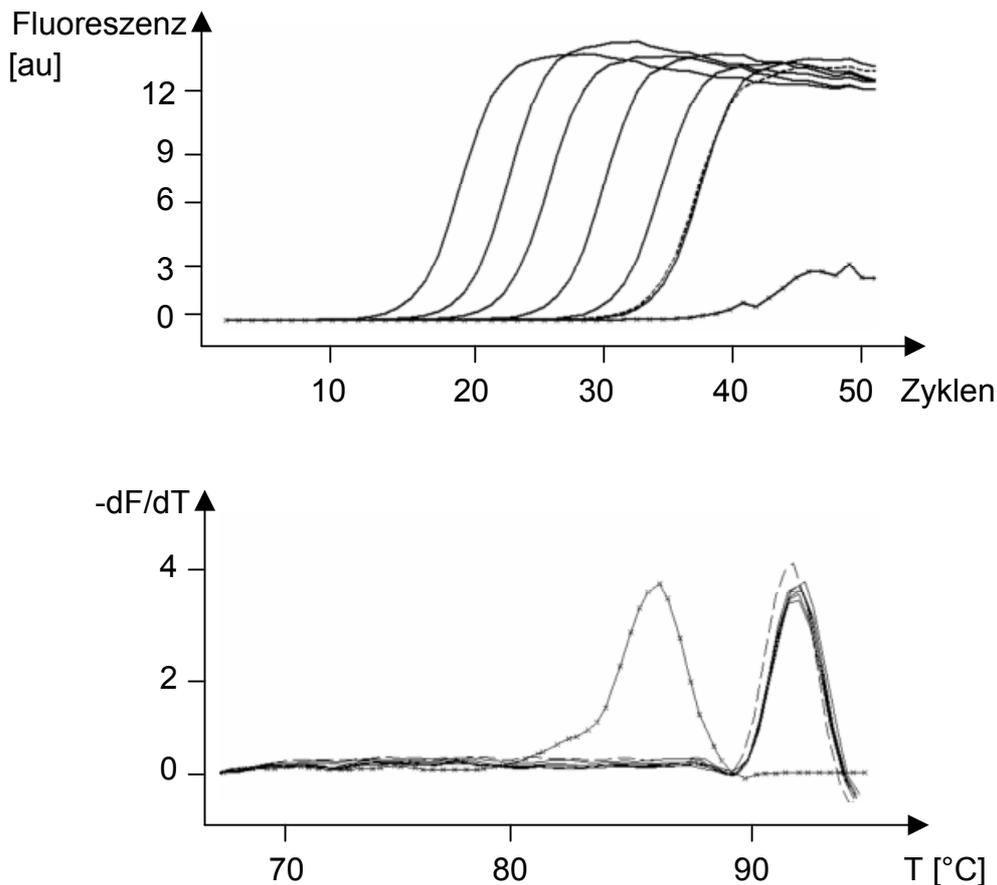


Abb. 4.25 Verlauf (oben) und Schmelzpunktanalyse (unten, $-dF/dT$) einer Echtzeit-PCR aus einer humanen epididymalen cDNA mit den FUT7-spezifischen Oligonukleotid-Primern FUT7S und FUT7AS. Die Standards (durchgezogene Linien) decken einen Konzentrationsbereich von 1 pg/ μ l bis 10 ag/ μ l in serieller 1:10-Verdünnung ab. Die cDNA-Kurve ist gestrichelt dargestellt, die Wasserkurve gepunktet.

Die Wasserprobe ist bei höheren Zyklenzahlen nicht negativ (Abb. 4.25, oben), allerdings lässt sich ein Signal erst bei deutlich höheren Zyklenzahlen beobachten, als dies sowohl für die geringste Standardkonzentration als auch für die cDNA-Probe gilt. Zudem geht aus der Schmelzkurve (Abb. 4.25, unten) eindeutig hervor, dass das in der Wasserprobe gebildete Amplifikat nicht identisch mit dem Amplifikat ist, das den zu quantifizierenden Sequenzabschnitt repräsentiert. Es schmilzt außerdem deutlich unterhalb 89 °C, das erhaltene Signal dürfte auf den Bereich der rechten Schulter dieses Peaks zurückzuführen sein. Es

handelt sich vermutlich um aus den Oligonukleotid-Primern gebildete Produkte oder Amplifikate. In den Standards und in der cDNA-Probe tritt dieser Peak nicht auf.

4.2.3.6 FUT9-Amplifikation

Bei Verwendung der für die FUT9 spezifischen Oligonukleotid-Primer ist der Verlauf der Amplifikationskurven für die Standards und für die cDNA-Probe parallel (Abb. 4.26, oben).

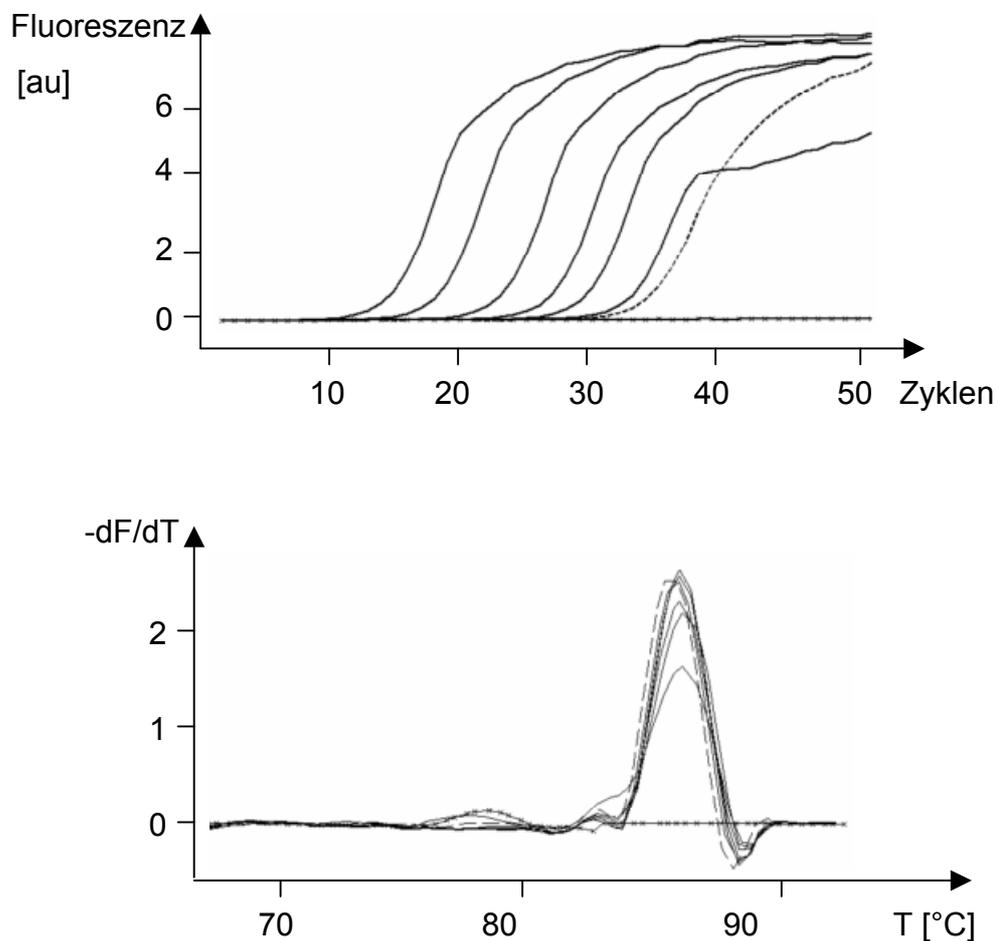


Abb. 4.26 Verlauf (oben) und Schmelzpunktanalyse (unten, $-dF/dT$) einer Echtzeit-PCR aus einer humanen epididymalen cDNA mit den FUT9-spezifischen Oligonukleotid-Primern FUT9S und FUT9AS. Die Standards (durchgezogene Linien) decken einen Konzentrationsbereich von $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bis $10 \text{ ag}/\mu\text{l}$ in serieller 1:10-Verdünnung ab. Die cDNA-Kurve ist gestrichelt dargestellt, die Wasserkurve gepunktet.

Der Standard mit der geringsten Amplikonkonzentration erreicht nicht die endgültige Stärke des Fluoreszenzsignals wie die anderen Standards und wie die cDNA-Probe. Der Kurvenverlauf ist aber parallel, d. h. auch in diesem Falle verläuft die PCR mit gleicher Effizienz, kann also für die Quantifizierung mit berücksichtigt werden. Die cDNA-Kurve verläuft in einem Bereich deutlich unterhalb des 10-ag/ μ l-Standards. In der Wasserprobe tritt kein Signal auf.

Die Schmelzpunktsanalyse (Abb. 4.26, unten) zeigt ein Nebenprodukt mit einem Schmelzpunkt um 79 °C. Das beeinträchtigt die Quantifizierungsmessung aber nicht, da die Fluoreszenz bei 83 °C gemessen wird. Bei dieser Temperatur liegt das bei 79 °C schmelzende Amplifikat, das wegen des deutlich abweichenden Schmelzpunktes nicht identisch mit dem durch die FUT9-spezifischen Oligonukleotid-Primer gebildeten FUT9-Amplifikat ist, bereits aufgeschmolzen, d. h. einzelsträngig vor. Das heißt, bei 83 °C, der Temperatur der Fluoreszenzmessung im Assay, ist bei diesem Produkt (in der Wasserprobe) kein Signal zu beobachten, da SYBRGreen nur mit doppelsträngiger DNA ein Signal gibt.

4.2.3.7 β -Actin-Amplifikation

Im Folgenden ist der PCR-Verlauf bei Verwendung der β -Actin-spezifischen Oligonukleotid-Primer gezeigt. Der Kurvenverlauf in der Amplifikation ist parallel; die Wasserprobe zeigt bei extrem hoher Zyklenzahl ein sehr schwaches Signal (Abb. 4.27, oben). Der Kurvenverlauf der β -Actin-cDNA-Messung zeigt bereits, dass die Actin-mRNA in der dieser Messung zu Grunde liegenden humanen Nebenhodenprobe deutlich häufiger ist als die mRNA-Mengen der α 1-3-Fucosyltransferasen.

Aus der Schmelzpunktsanalyse (Abb. 4.27, unten) ergeben sich Amplifikate identischen Schmelzpunkts für Standards und cDNA-Probe. Die Wasserprobe zeigt in der Echtzeit-PCR keine Fluoreszenz an. Das in der Wasserprobe gebildete Amplifikat hat einen Schmelzpunkt von deutlich unter 88° C, der Temperatur der Fluoreszenzmessung im Quantifizierungsprogramm.

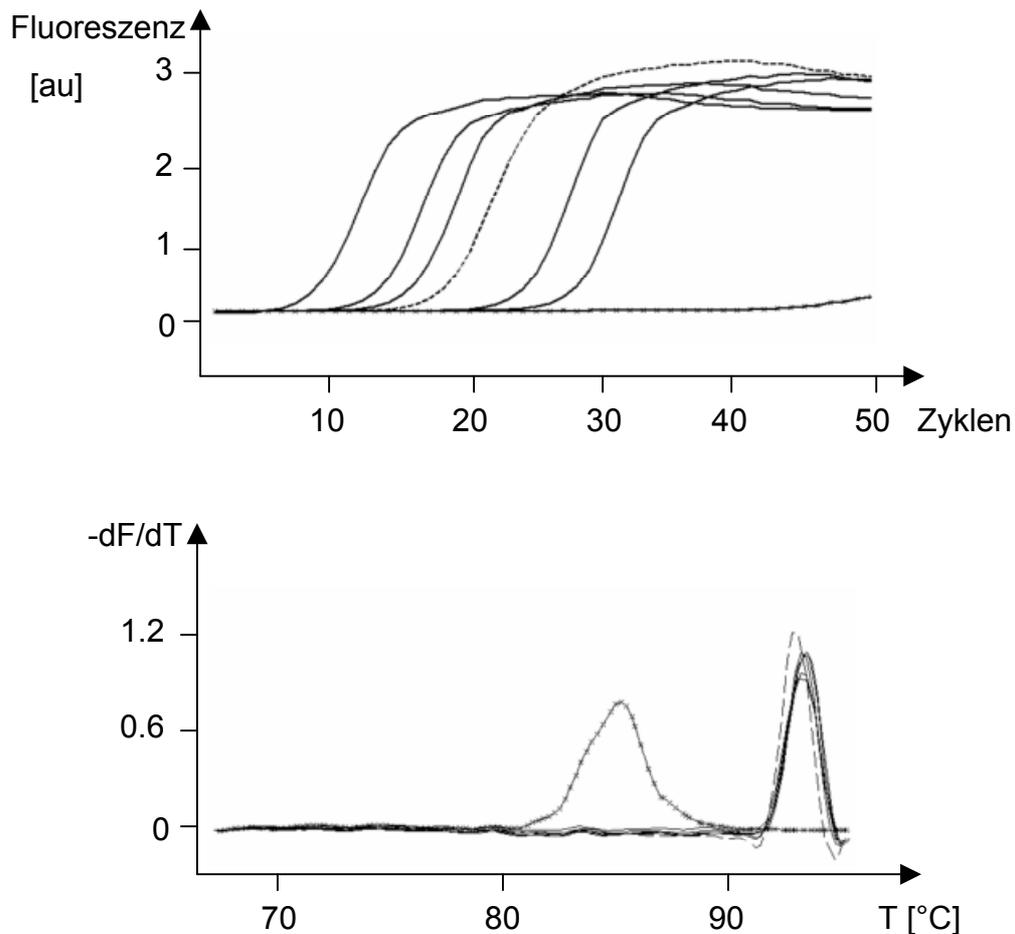


Abb. 4.27 Verlauf (oben) und Schmelzpunktsanalyse (unten, $-dF/dT$) einer Echtzeit-PCR aus einer humanen epididymalen cDNA mit den β -Actin-spezifischen Oligonukleotid-Primern BAS und BAAS. Die Standards (durchgezogene Linien) decken einen Konzentrationsbereich von 1 pg/ μ l bis 10 ag/ μ l in serieller 1:10-Verdünnung ab. Die cDNA-Kurve ist gestrichelt dargestellt, die Wasserkurve gepunktet.

Auf Grund der unsymmetrischen Form des Peaks in der Wasserprobe kann es sich hier um mehrere unterschiedliche Amplifikate handeln, was aber auf Grund der niedrigen Schmelzpunkte die Quantifizierung nicht beeinträchtigt. Bei 88 °C, der Temperatur der Fluoreszenzmessung im Assay, liegen diese Produkte einzelsträngig vor, geben folglich mit SYBRGreen kein Fluoreszenzsignal.

4.2.4 Quantifizierung der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs in den verschiedenen Organen des humanen männlichen Genitaltrakts

Es wurden die mRNA-Mengen der FUT3 bis FUT7 sowie der FUT9 in den Organen Hoden, Nebenhoden sowie Prostata des Menschen bestimmt. Die Spermienreifung, die in engem Zusammenhang mit dem Erwerb des Glykopeptids HE5/CD52 steht, erfolgt im Nebenhoden. Deshalb bildet dieses Organ den Schwerpunkt der Untersuchungen. Als somatische Kontrollgewebe dienten Leber und Niere. Bei den mit einer Raute # gekennzeichneten Abbildungen sind die zugehörigen Datensätze unter der entsprechenden Rautennummer im Anhang 9.2 aufgeführt.

4.2.4.1 Quantifizierung der α 1-3 Fucosyltransferase-mRNAs im Nebenhoden

Es wurden die α 1-3-Fucosyltransferase mRNAs in fünf unterschiedlichen humanen Nebenhoden-Geweben quantifiziert.

Des Weiteren wurden die mRNA-Mengen in einem Nebenhoden bestimmt, der nach Caput, Corpus und Cauda in Regionen aufgeteilt war. Von einem weiteren Nebenhoden standen RNA-Präparationen der Regionen Caput und Cauda zur Verfügung. Außerdem stand eine RNA-Präparation aus einem nach Caput, Corpus und Cauda in Regionen aufgeteilten Nebenhoden eines mit Anti-Androgenen behandelten Patienten zur Verfügung. Hierdurch war es möglich, den Einfluss einer Anti-Androgen-Behandlung auf die mRNA-Mengen der α 1-3-Fucosyltransferasen zu untersuchen.

Im Folgenden ist die Untersuchung der mRNA-Mengen der α 1-3-Fucosyltransferasen in fünf unterschiedlichen humanen Nebenhoden dargestellt.

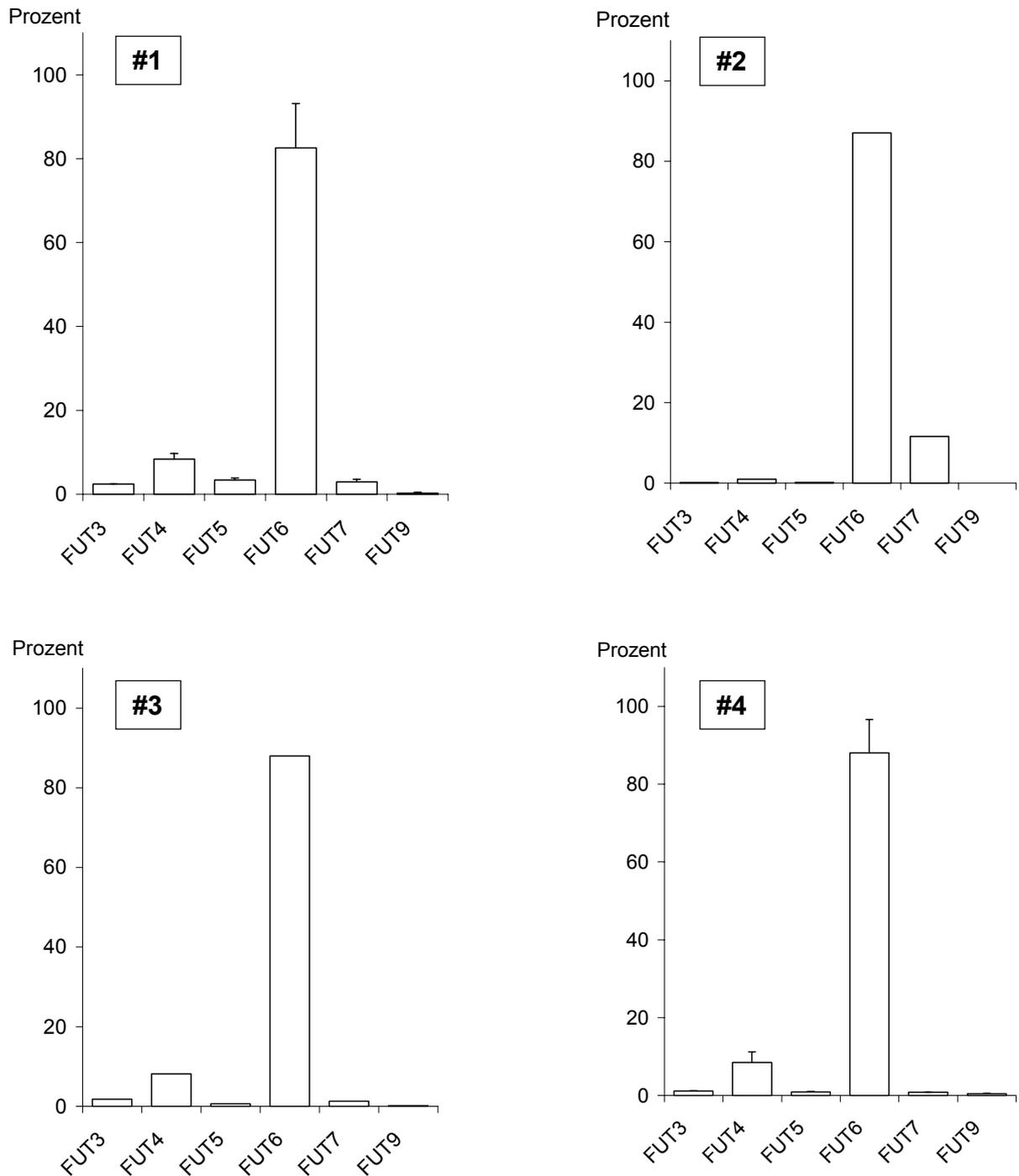


Abb. 4.28a Quantitativer Vergleich der mRNA-Mengen der FUT3 bis FUT7 sowie FUT9 für vier humane epididymale cDNAs. Die Werte beziehen sich auf 100 % als die Summe der gemessenen mRNA-Mengen der α 1-3-Fucosyltransferasen FUT3 bis FUT7 sowie FUT9. Die Werte wurden durch Dreifachmessung erhalten. #2 und #3 zeigen keine Fehlerbalken, weil die zur Verfügung stehende Menge an cDNA nur für eine Einfachbestimmung ausreichte.

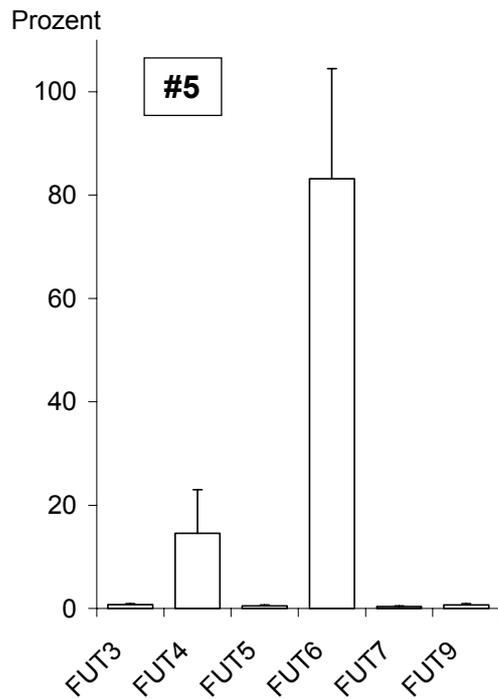


Abb. 4.28b Quantitativer Vergleich der mRNA Mengen der FUT3 bis FUT7 sowie FUT9 für eine weitere humane epididymale cDNA. Die Werte beziehen sich auf 100 % als die Summe der gemessenen mRNA-Mengen der α 1-3Fucosyltransferasen FUT3 bis FUT7 sowie FUT9. Die Werte wurden durch Dreifachmessung erhalten.

In allen fünf untersuchten Nebenhodengeweben ist die FUT6-mRNA die häufigste der untersuchten α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs (Abb. 4.28a und Abb. 4.28b). Definiert man die Summe der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA-Mengen als 100 %, ist nicht nur die FUT6 immer die häufigste α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA, auch der Anteil ist mit um 80 % reproduzierbar. Die zweithäufigste mRNA ist die FUT4-mRNA, wenn auch lange nicht so häufig wie die der FUT6.

Während ihrer Passage durch den Nebenhoden erlangen Spermien ihre volle Befruchtungsfähigkeit. Die anatomische Längsgliederung des Nebenhodens, die durch seine Unterteilung in Caput, Corpus und Cauda beschrieben wird, entspricht seiner gerichteten Funktion, mit der die Reifung der Spermien einhergeht. Es wurden die mRNA-Mengen der α 1-3-Fucosyltransferasen in den Regionen Caput, Corpus und Cauda des Nebenhodens untersucht (Abb. 4.29., Abb. 4.30).

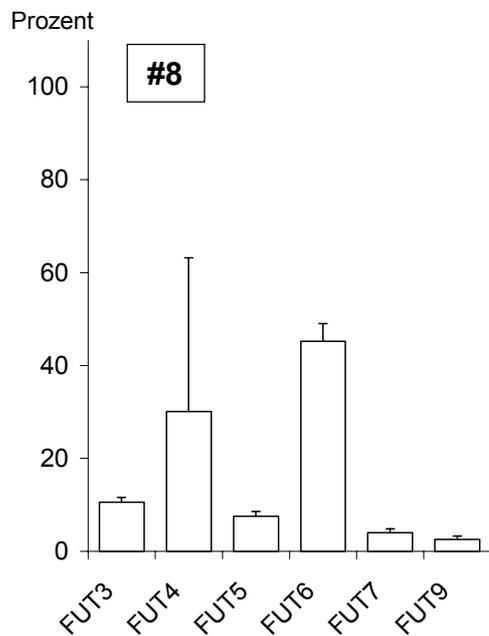
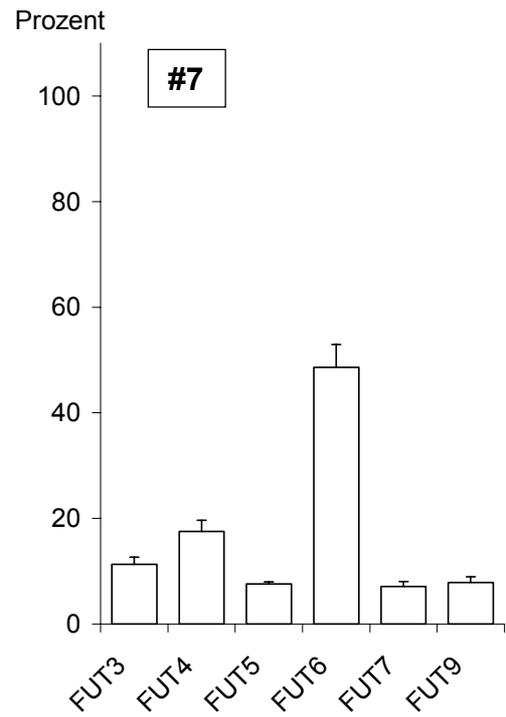
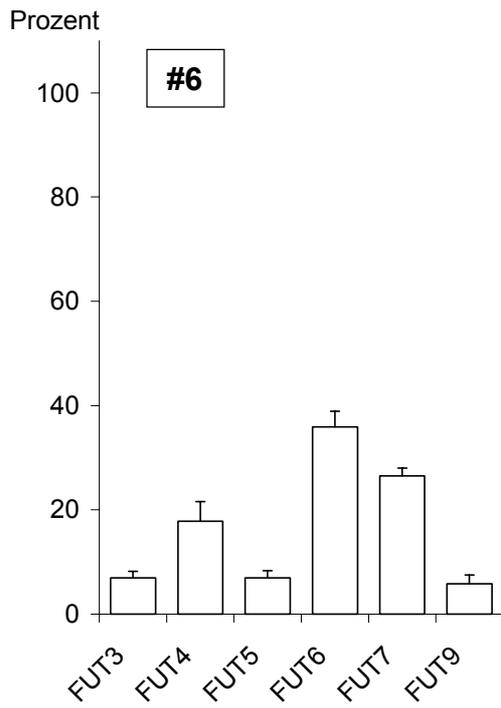


Abb. 4.29 Quantitativer Vergleich der mRNA-Mengen der FUT3 bis FUT7 sowie FUT9 nach Längsgliederung eines Nebenhodens in die Regionen Caput (#6), Corpus (#7) und Cauda (#8). Die Werte beziehen sich auf 100 % als die Summe der gemessenen mRNA-Mengen der α 1-3-Fucosyltransferasen FUT3 bis FUT7 sowie FUT9. Die Werte wurden durch Dreifachmessung erhalten.

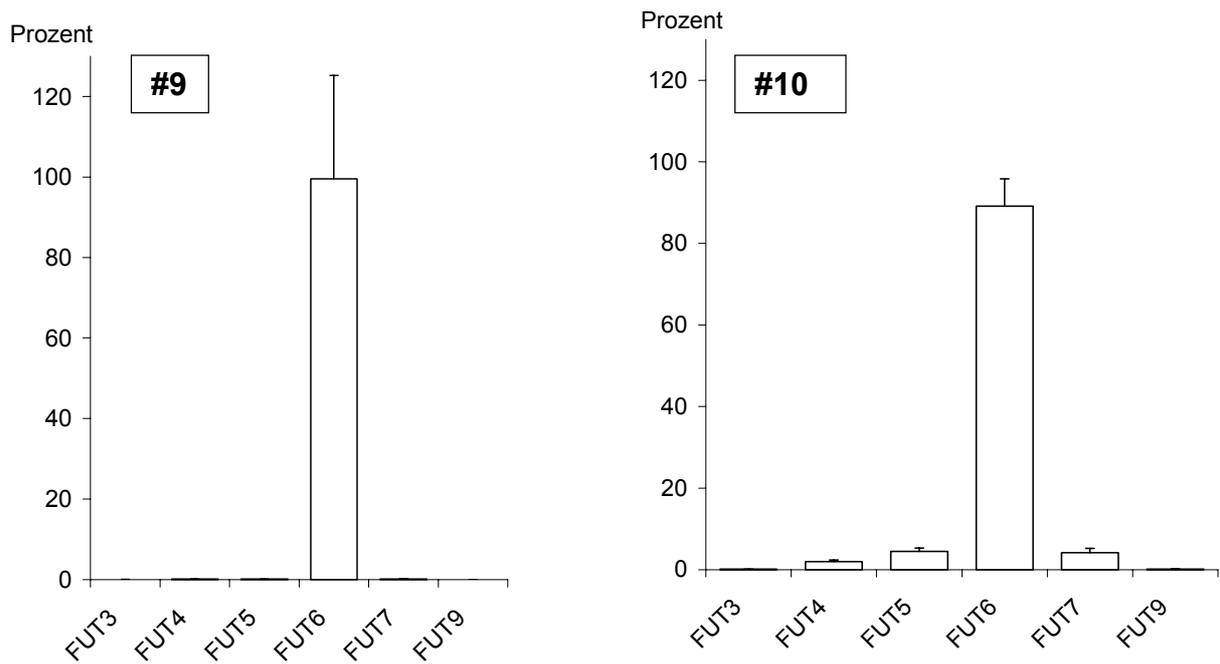


Abb. 4.30 Quantitativer Vergleich der mRNA-Mengen der FUT3 bis FUT7 sowie FUT9 nach Längsgliederung eines Nebenhodens. Gezeigt sind die Messwerte für die Regionen Caput (#9) und Cauda (#10). Aus der dazwischenliegenden Region (Corpus) stand keine RNA zur Verfügung. Die Werte beziehen sich auf 100 % als die Summe der gemessenen mRNA-Mengen der α 1-3 Fucosyltransferasen FUT3 bis FUT7 sowie FUT9. Die Werte wurden durch Dreifachmessung erhalten.

Wie in RNA-Extrakten des Gesamtnebenhodens war auch in RNA-Extrakten des nach Regionen aufgeteilten Nebenhodens in jeder der drei Regionen Caput, Corpus und Cauda die FUT 6 die häufigste mRNA (Abb. 4.29, Abb. 4.30).

Neben den bisher untersuchten Nebenhoden aus Prostatakarzinompatienten ohne Hormonbehandlung stand ein in die Regionen Caput, Corpus und Cauda präpariertes Nebenhodengewebe aus einem Patienten zur Verfügung, der vor seiner Kastration medikamentös mit Anti-Androgenen behandelt worden war. Der Nebenhoden ist ein androgenabhängiges Gewebe. Es konnten so in einem Einzelfall Daten darüber erhalten werden, wie sich der Entzug von Androgenen auf die Transkriptmengen der α 1-3-Fucosyltransferasen auswirkt.

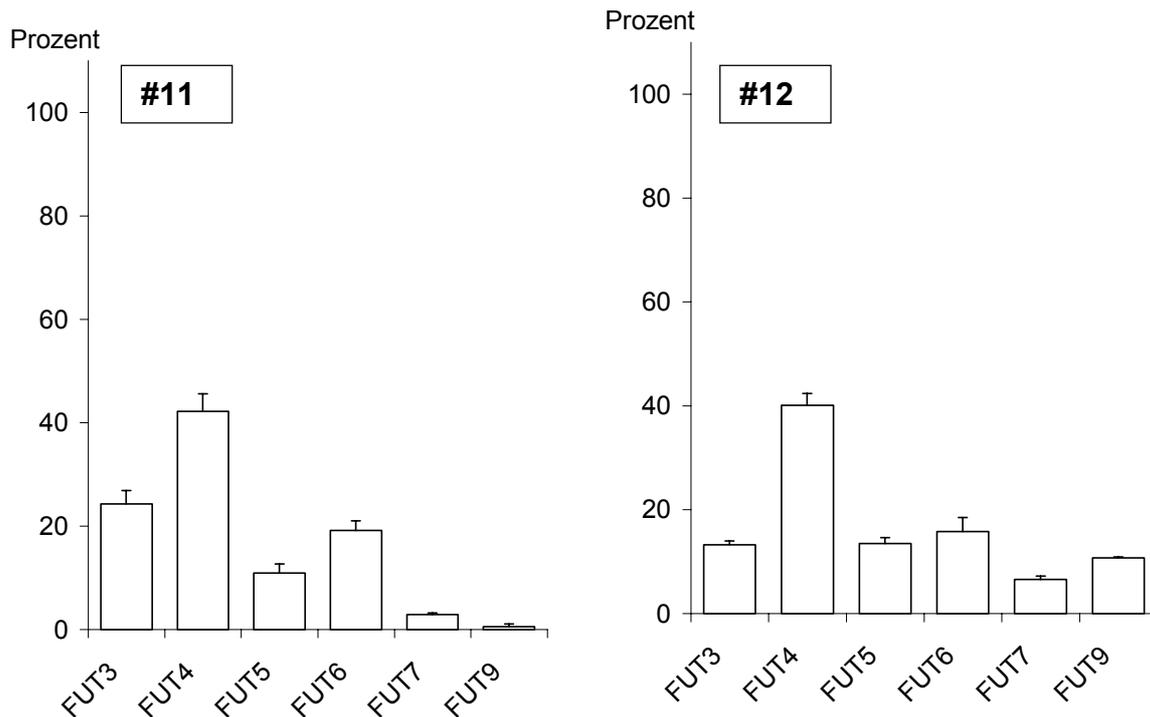


Abb 4.31 Quantitativer Vergleich der mRNA-Mengen der FUT3 bis FUT7 sowie FUT9 im Nebenhoden eines Patienten, der auf Grund seiner Erkrankung zuvor eine Anti-Androgen-Behandlung erfahren hatte. Es standen die Regionen Caput (#11) sowie Cauda (#12) zur Verfügung. Die Werte beziehen sich auf 100 % als die Summe der gemessenen mRNA-Mengen der α 1-3-Fucosyltransferasen FUT3 bis FUT7 sowie FUT9. Die Werte wurden durch Dreifachmessung erhalten.

Die Häufigkeitsverteilung der α 1-3-Fucosyltransferasen war auf mRNA-Ebene deutlich verändert (Abb. 4.31). War in allen Regionen des nicht mit Anti-Androgenen behandelten humanen Nebenhodens die FUT6 mit etwa 80 % die am weit häufigsten vorkommende α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA, war dies nach Anti-Androgen-Behandlung nicht mehr der Fall. Sowohl im Caput- als auch im Cauda-Abschnitt war nach dieser Behandlung die häufigste α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA die der FUT4 zugehörige (Abb. 4.31). Eine RNA aus der Corpus-Region stand nicht zur Verfügung. Aber sowohl in der gemäß der Längsgliederung des Nebenhodens vor der Corpus- gelegenen Caput- als auch in der dahinter liegenden Cauda-Region war die FUT4 nach Anti-Androgen-Behandlung im Gegensatz zur FUT6 im nicht mit Anti-Androgenen behandelten Gewebe die häufigste α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA.

Ein Vergleich der relativen Häufigkeitsverteilung der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs im unbehandelten und im mit Anti-Androgenen behandelten Cauda-Abschnitt ist in Abbildung 4.32 gezeigt.

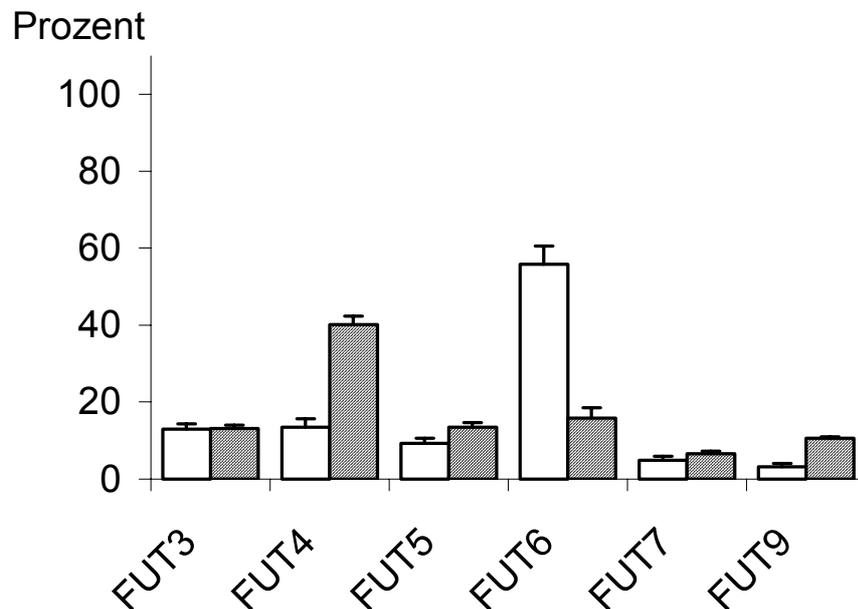


Abb. 4.32 Vergleich der relativen Häufigkeit der mRNA-Mengen der FUT3 bis FUT7 sowie FUT9 in der Caudaregion eines unbehandelten Nebenhodens ohne (leere Säule, #8) sowie nach Anti-Androgen-Behandlung (schraffierte Säule, #12). Die Werte beziehen sich auf 100 % als die Summe der gemessenen mRNA-Mengen der α 1-3-Fucosyltransferasen FUT3 bis FUT7 sowie FUT9 im entsprechenden Gewebe. Die Werte wurden durch Dreifachmessung erhalten. Der FUT4-Wert im unbehandelten Cauda-Abschnitt basiert auf zwei Messungen (#8 im Anhang basiert im Gegensatz hierzu auf drei Messungen. Ein Wert für FUT4 wich deutlich von den beiden anderen Messwerten ab und wurde daher für diese Darstellung nicht berücksichtigt.).

In dieser Darstellung der relativen Häufigkeitsverteilung (Abb. 4.32) sieht es so aus, als sei durch Anti-Androgen-Behandlung die FUT6-mRNA herunterreguliert, die FUT4-mRNA hingegen aufreguliert. Diese Darstellung erlaubt allerdings keine Aussage, ob evtl. die Expression der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs stark herunterreguliert wurde, die der FUT4 hingegen nicht. Es ist also anhand dieser Darstellung keine Aussage über die absoluten Mengen an mRNAs möglich. Obwohl die FUT4 im mit Anti-Androgenen behandelten Nebenhoden die häufigste mRNA darstellt, ist hieraus nicht ersichtlich, ob die FUT4-mRNA im mit Anti-Androgenen behandelten Nebenhoden tatsächlich häufiger ist als die FUT6-mRNA im unbehandelten Nebenhoden. Um dies klären zu können, wurde eine Darstellung gewählt, in der die Häufigkeit der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs als Teilchen mRNA pro Masse RNA gezeigt ist.

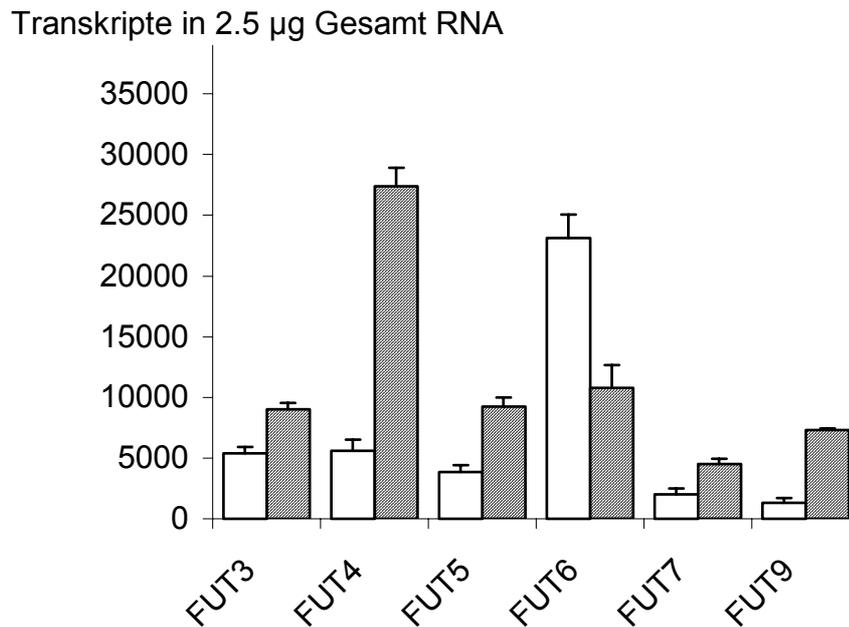


Abb. 4.33 Vergleich der absoluten Häufigkeit der mRNA-Mengen der FUT3 bis FUT7 sowie FUT9 in der Caudaregion eines unbehandelten Nebenhodens ohne (leere Säule, #8) sowie nach Anti-Androgen-Behandlung (schraffierte Säule, #12). Angegeben ist die Anzahl der Transkripte der entsprechenden α 1-3-Fucosyltransferase bezogen auf 2.5 µg Gesamt-RNA, die zur Synthese der cDNA eingesetzt wurde. Die Werte wurden durch Dreifachmessung erhalten. Der FUT4-Wert im unbehandelten Cauda-Abschnitt basiert auf einer Doppelmessung (vergleiche Abb. 4.32)

Aus dieser Darstellung (Abb. 4.33) ist klar ersichtlich, dass sich nicht nur das Muster der Häufigkeitsverteilung im Anti-Androgen-behandelten Gewebe verändert hat. Die FUT4-mRNA war nach Anti-Androgen-Behandlung auch absolut, also bezogen auf die Anzahl an Transkripten in gleichen Mengen Gesamt-RNA, häufiger, als die FUT6-mRNA im nicht mit Anti-Androgenen behandelten Nebenhoden.

4.2.4.2 Häufigkeit der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs in den Kontrollgeweben Niere und Leber

Als Kontrollgewebe dienten Leber und Niere, von denen bekannt ist, dass die FUT6-mRNA dort häufig ist (Kudo et al. 1998, Mas et al. 1998). Um einen Abgleich der eigenen Messungen bzw. der Zuverlässigkeit des eigenen Assays mit diesen Kontrollgeweben

vorzunehmen, wurden cDNA-Proben aus RNA-Präparationen dieser Gewebe mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Echtzeit-RT-PCR-Assay gemessen.

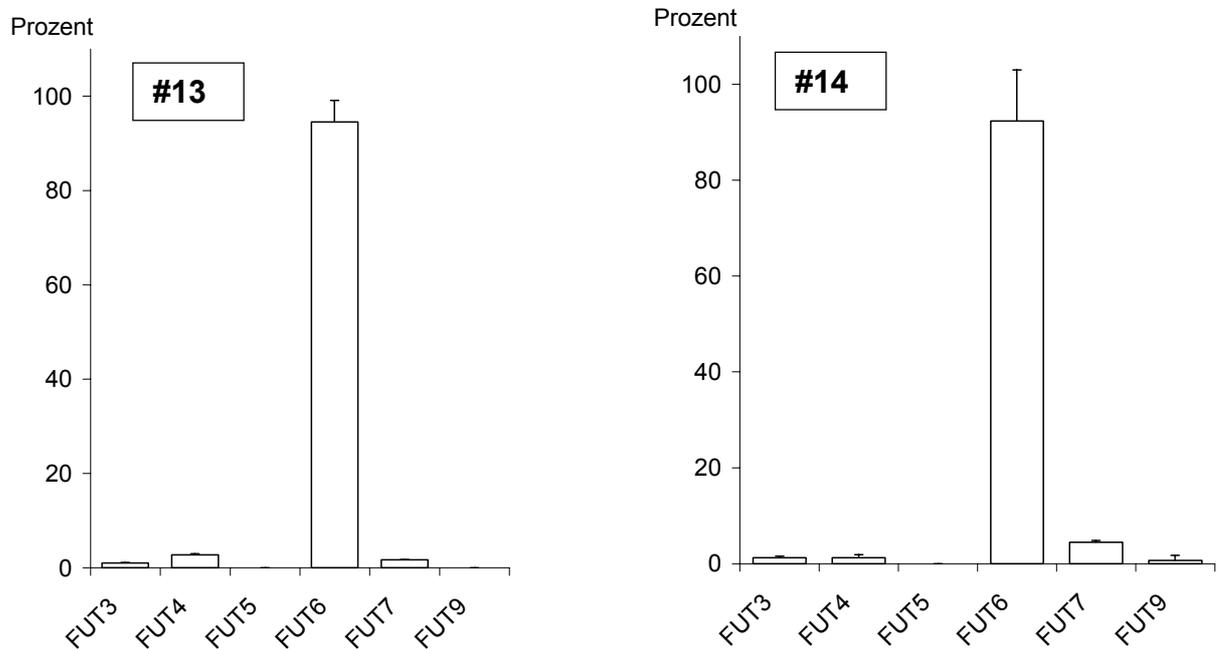


Abb. 4.34 Quantitativer Vergleich der mRNA-Mengen der FUT3 bis FUT7 sowie FUT9 in cDNAs aus humanem Nierengewebe (#13) und humanem Lebergewebe (#14). Die Werte beziehen sich auf 100 % als die Summe der gemessenen mRNA Mengen der α 1-3-Fucosyltransferasen FUT3 bis FUT7 sowie FUT9. Die Werte wurden durch Dreifachmessung erhalten.

Die Ergebnisse zeigen in Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen, dass die mRNA der FUT6 in Niere und Leber die häufigste α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA ist (Abb. 4.34).

4.2.4.3 Häufigkeit der α 1-3 Fucosyltransferase-mRNAs im Hoden

Um herauszufinden, ob die Funktionen der Spermatogenese im Hoden und der post-testikulären Reifung im Nebenhoden mit Unterschieden in den Häufigkeiten der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs einhergehen, wurde die Häufigkeitsverteilung der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs im humanen Hoden untersucht.

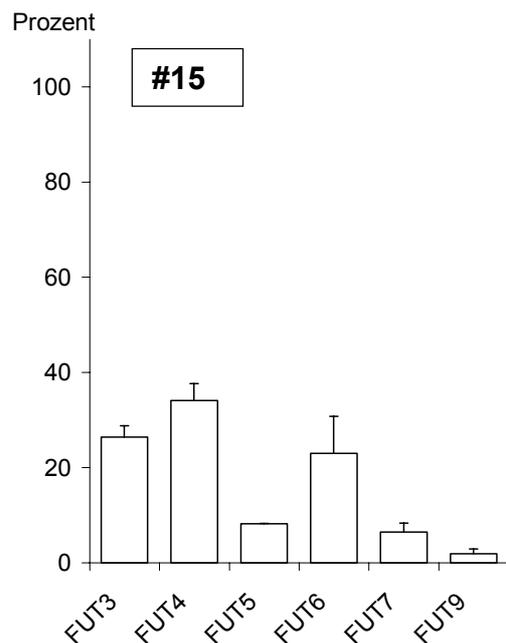


Abb. 4.35 Quantitativer Vergleich der mRNA-Mengen der FUT3 bis FUT7 sowie FUT9 in einer cDNA aus humanem Hodengewebe. Die Werte beziehen sich auf 100 % als die Summe der gemessenen mRNA-Mengen der α 1-3-Fucosyltransferasen FUT3 bis FUT7 sowie FUT9. Die Werte wurden durch Dreifachmessung erhalten.

Die Häufigkeitsverteilung der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs im Hoden (Abb. 4.35) weicht auffallend von der im Nebenhoden ab. Die FUT6-mRNA ist im Hoden im Gegensatz zum Nebenhoden nicht die häufigste α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA. Die Häufigkeitsverteilung sieht undifferenzierter aus, alle α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs sind ungefähr gleich häufig (Abb. 4.35).

4.2.4.4 Häufigkeit der α 1-3 Fucosyltransferase-mRNAs in der Prostata

Ebenso wie der Nebenhoden ist auch die Prostata ein posttestikuläres Organ. Die im humanen Seminalplasma gemessenen extrazellulären Fucosyltransferase-Aktivitäten gehen zum größten Teil auf Anteile des Prostatasekrets zurück. Auch hier wurde die Häufigkeitsverteilung der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs bestimmt.

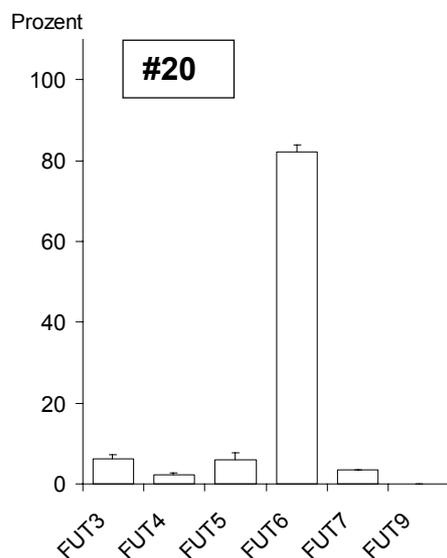
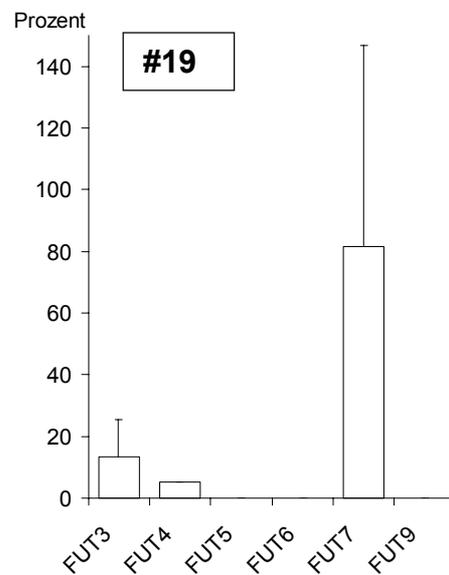
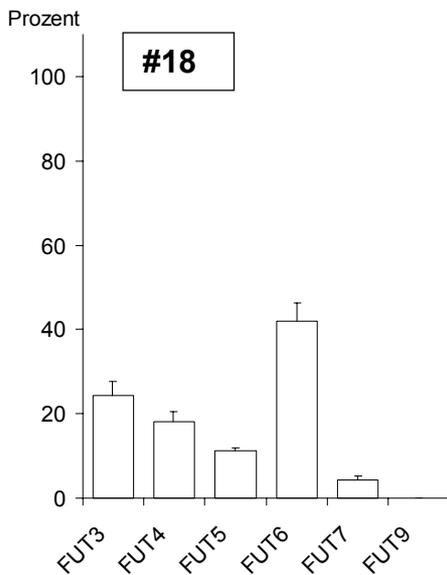
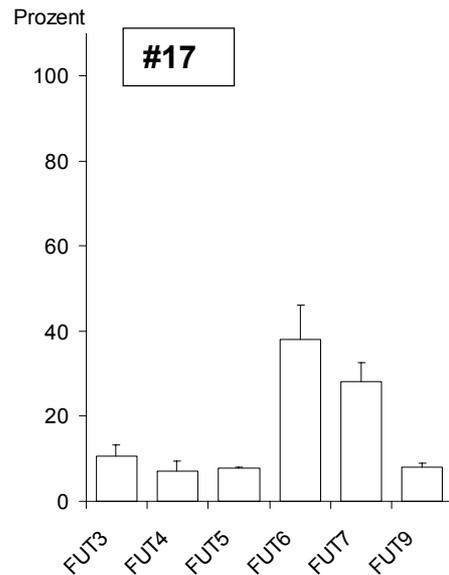
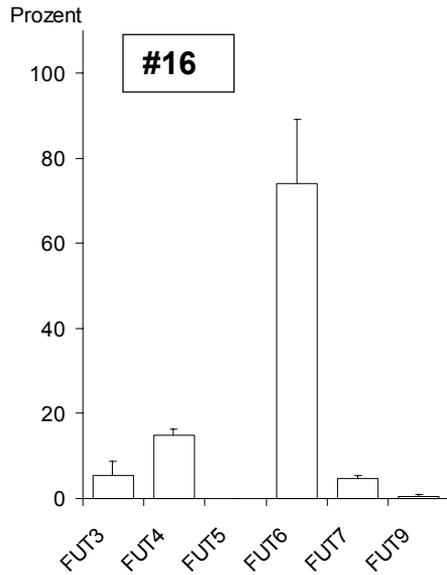


Abb. 4.36 Quantitativer Vergleich der mRNA-Mengen der FUT3 bis FUT7 sowie FUT9 in cDNAs aus humanem Prostatagewebe. Die Werte beziehen sich auf 100 % als die Summe der gemessenen mRNA-Mengen der α 1-3-Fucosyltransferasen FUT3 bis FUT7 sowie FUT9. Die Werte wurden durch Dreifachmessung erhalten.

Auch in den meisten Prostataprobe war die FUT6-mRNA die häufigste α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA (Abb. 4.36). Die in Abbildung 4.36 gezeigte Probe #19 weicht hiervon ab. Hier ist die FUT7-mRNA die weitaus häufigste α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA. Ob das Ergebnis auf in unterschiedlichem Ausmaß degradierte α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs zurückzuführen ist, oder ob die FUT7-mRNA tatsächlich die häufigste ist, lässt sich nicht sagen. Die Actin-mRNA-Werte für diese mRNA waren aber (siehe Anhang 9.2) äußerst gering. Diese RNA war also vermutlich stark degradiert.

4.2.4.5 Expression der FUT6-mRNA in Organen des männlichen Genitaltraktes im direkten Vergleich

In Nebenhoden und Prostata war die FUT6 auf mRNA-Ebene die am weit häufigsten exprimierte α 1-3-Fucosyltransferase im humanen männlichen Genitaltrakt. Im Hoden war keine differenzierte Häufigkeitsverteilung bezüglich der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA-Mengen zu beobachten. Es wurde im Folgenden untersucht, wie häufig die FUT-6-mRNA-Mengen in diesen Organen im Vergleich sind. Hierzu ist die Verwendung eines Standards notwendig, der eine Art Normalisierungsfaktor für den Vergleich verschiedener Gewebe darstellt. Diesen Messungen liegen unterschiedliche cDNAs zu Grunde, die mit jeweils unterschiedlicher Effizienz aus unterschiedlichen RNA-Präparationen aus unterschiedlichen Gewebeproben erhalten wurden. Ein direkter Vergleich der erhaltenen Messwerte für die FUT6-mRNA-Mengen ohne eine Normalisierung oder Bezugnahme auf einen Standard ist nicht möglich, da man die oben beschriebenen unterschiedlichen Ausgangsbedingungen für jede der untersuchten cDNAs nicht berücksichtigen würde. Man bezieht die mRNA-Menge der jeweils untersuchten Gene deshalb auf Transkripte, die man für alle Gewebe und Organe in Näherung als konstant exprimiert annimmt, wie z. B. die des Haushaltsgens GAPDH (Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) oder die mRNA des Muskelfaserproteins β -Actin. Durch Normierung der gemessenen Werte auf einen derartigen Standard innerhalb derselben cDNA können unterschiedliche Proben bezüglich der Transkription eines bestimmten Gens verglichen werden. In dieser Arbeit wurde β -Actin-mRNA für die Normierung verwendet; in Studien über die Häufigkeit von Glykosyltransferasen auf mRNA-Ebene ist die Verwendung von β -Actin als Standard bereits beschrieben (Mas et al. 1998, Kudo et al. 1998).

Im Folgenden ist ein Vergleich der FUT6-mRNA-Mengen in den Kontrollgeweben Niere und Leber sowie in den Organen Hoden, Nebenhoden und Prostata des männlichen Genitaltrakts gezeigt. Ausgewählt wurden Proben, die auf Grund hoher β -Actin-mRNA-Werte als nur geringfügig degradiert angesehen werden konnten.

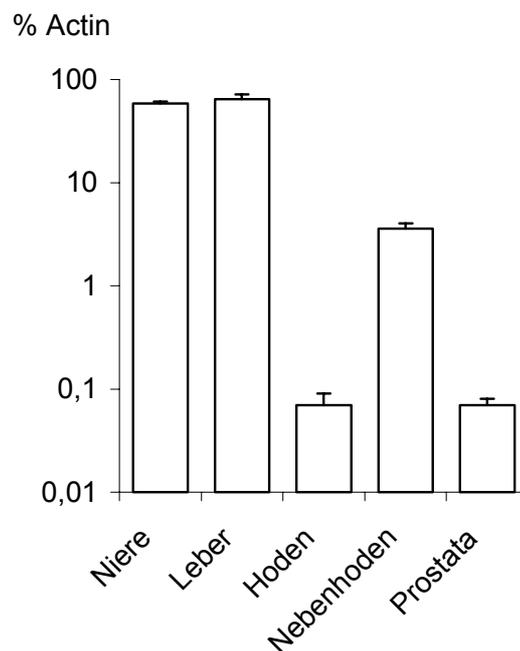


Abb. 4.37 Häufigkeit der FUT6-mRNA in den Organen Hoden (#15), Nebenhoden (#1) und Prostata (#16) des humanen männlichen Genitaltrakts. Als Positivkontrolle wurden Leber (#14) und Niere (#13) gemessen, für die eine starke Expression der FUT6-mRNA beschrieben ist. Die Darstellung zeigt in logarithmischer Form die Expression der FUT6-mRNA bezogen auf β -Actin-mRNA.

Die Expression der FUT6 auf mRNA-Ebene ist in Niere und Leber erwartungsgemäß hoch. Im humanen männlichen Genitaltrakt ist die FUT6-mRNA im Nebenhoden um fast zwei Größenordnungen häufiger als im Hoden oder in der Prostata (Abb. 4.37).

4.2.5 Entwicklung einer alternativen Quantifizierungsmethode zur Untersuchung der mRNA-Häufigkeitsverteilung

Bei der herkömmlichen Methode der relativen Quantifizierung durch fluoreszenzbasierte Echtzeit-RT-PCR ist der Material- und Zeitaufwand dadurch relativ hoch, dass in einem Probendurchlauf immer eine Standardreihe mit sechs Proben bekannter Amplikonkonzentration zusammen mit den jeweiligen cDNAs gemessen werden muss. Das bedeutet einen zusätzlichen Kosten- und Zeitaufwand. Da diese Proben zusätzlichen Platz im Probenkarussell beanspruchen, ist der Probendurchsatz pro Messung beschränkt; es können weniger cDNA-Proben vermessen werden, als eigentlich Positionen im Karussell zur Verfügung stehen. Im Folgenden wird beschrieben, wie es unter Einhaltung bestimmter Bedingungen möglich sein müsste, eine relative mRNA-Häufigkeitsverteilung zu messen, ohne in jedem Probenlauf Messungen für Proben bekannter Amplikonkonzentration (Standards) durchführen zu müssen.

Die Ausführungen bedienen sich zur Veranschaulichung der Beispiel-Template der FUT3- und der FUT6-mRNAs (oder cDNAs). Im zunächst vereinfachten Fall sollte mit jedem PCR-Zyklus eine Verdopplung der zu Beginn dieses Zyklus vorhandenen Amplifikat-Menge erzielt werden. So kann man durch Vergleich der *crossing points* C_p (d. h. derjenigen Zyklenzahl, bei der der Fluoreszenzwert durch interkaliertes SYBRGreen einen willkürlich festgelegten Schwellenwert innerhalb der logarithmischen Phase einer PCR überschreitet) für zwei Proben A und B der FUT3 auf die relative Häufigkeit dieses Amplikons in den zwei Proben vor Beginn der PCR schließen:

$$m(A)/m(B) = 2 \exp(C_p(B) - C_p(A)) \quad (1)$$

In der Praxis wird allerdings nie eine PCR-Effizienz von 100 % erreicht (was einer Verdopplung mit jedem Zyklus entspräche). Eine Korrektur unter Verwendung der tatsächlichen Effizienz E modifiziert die Gleichung:

$$m(A)/m(B) = (1+E) \exp(C_p(B) - C_p(A)) \quad (2)$$

Im nächsten Schritt wird anhand des C_p -Wertes eines Amplikons (z. B. des FUT3-spezifischen Fragments) die Häufigkeit eines weiteren Amplikons (z. B. des FUT6-

spezifischen Fragments) bestimmt. Abbildung 4.38 zeigt den Amplifikationsverlauf für gleiche Massen der FUT-spezifischen Fragmente der FUT3 bis FUT7.

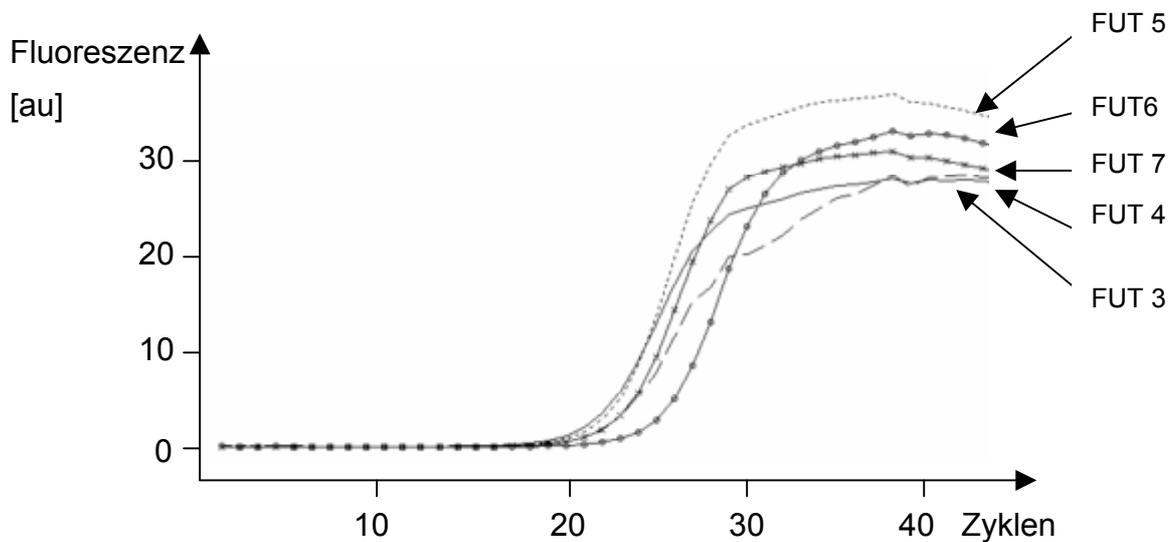


Abb.4.38 Amplifikationsverlauf für gleiche Massen (ungefähr gleiche Teilchenzahl) spezifischer Sequenzabschnitte der FUT3 bis FUT7. Die Amplifikationen verlaufen mit unterschiedlichen Effizienzen (nicht paralleler Kurvenverlauf). Außerdem sind die Cp-Werte unterschiedlich.

Anhand der nicht parallelen Kurvenverläufe wird ersichtlich, dass die PCRs der unterschiedlichen Amplikons mit unterschiedlicher Effizienz verlaufen. Außerdem sind die *crossing points* trotz identischer eingesetzter Massen bei vergleichbaren Amplifikatlängen (also ungefähr gleicher Teilchenzahl vor Beginn der PCR) unterschiedlich. Um ohne Verwendung von Standards das relative Verhältnis unterschiedlicher Amplikons zueinander ermitteln zu können, muß folglich für Gleichung (2) berücksichtigt werden, dass für jedes Amplikon eine andere Effizienz E gilt und dass identische Mengen unterschiedlicher Amplikons unterschiedliche Cp-Werte haben. Man kann also nicht bei gleichen *crossing points* für Transkript A und Transkript B auf gleiche Mengen der Transkripte in der Probe schließen (Zeile 4, Tabelle 4.2).

In Abbildung 4.39 und 4.40 ist gezeigt, wie sich die Cp-Werte bei Verwendung der FUT3-spezifischen bzw. der FUT6-spezifischen Oligonukleotid-Primer für eine bekannte Amplikonkonzentration und für eine epididymale cDNA unterscheiden.

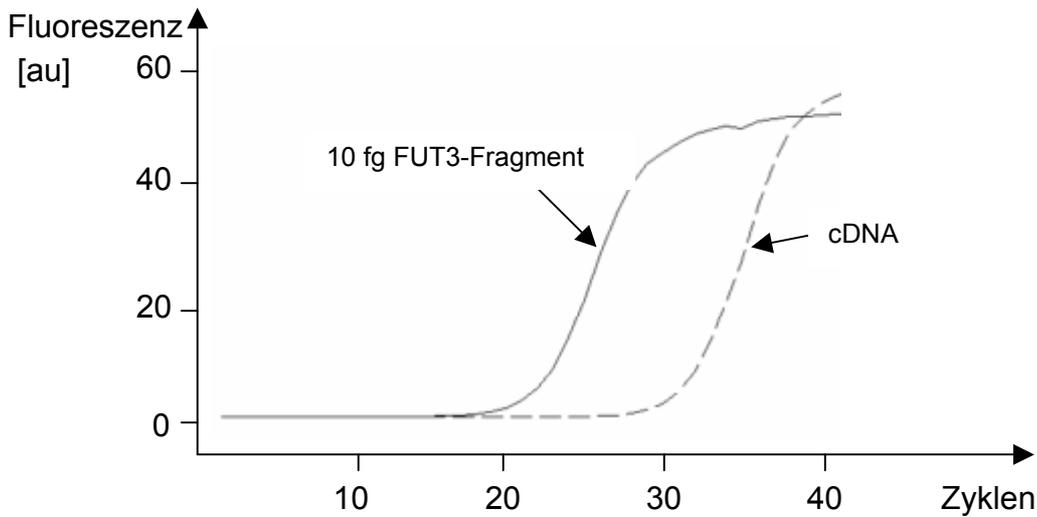


Abb. 4.39 Amplifikationsverlauf bei Verwendung FUT3-spezifischer Oligonukleotid-Primer für eine Probe bekannter Konzentration (10 fg FUT3-Fragment) und eine humane epididymale cDNA.

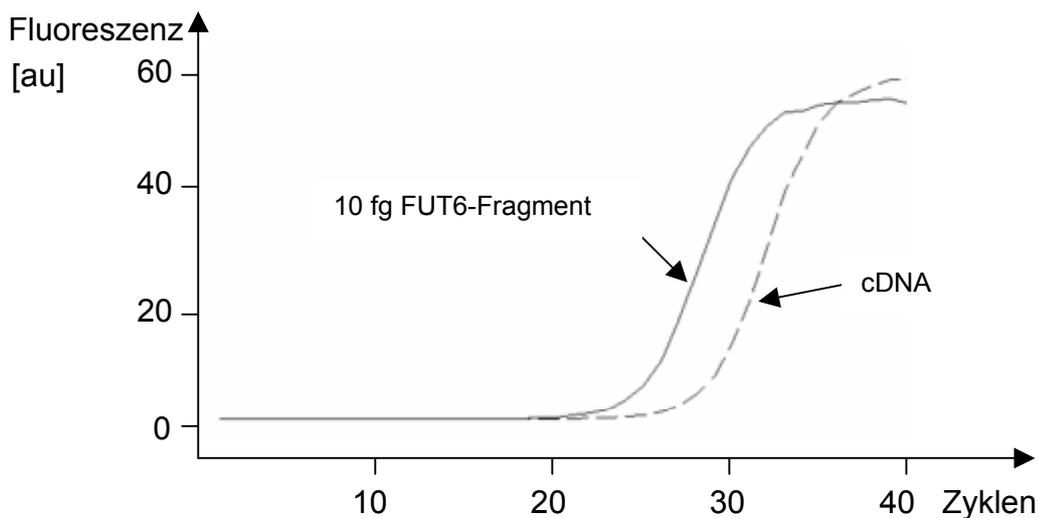


Abb. 4.40 Amplifikationsverlauf bei Verwendung FUT6-spezifischer Oligonukleotid-Primer für eine Probe bekannter Konzentration (10 fg FUT6-Fragment) und eine humane epididymale cDNA.

In der folgenden Tabelle 4.2 sind die Parameter aufgeführt, die man unter Berücksichtigung der oben geschilderten Beobachtungen braucht, um die relativen Häufigkeiten verschiedener Fragmente innerhalb derselben cDNA zu berechnen.

Tab. 4.2 Parameter zur Berechnung der relativen Häufigkeiten der FUT3- bis FUT7-spezifischen Fragmente in einer mit dem gleichen PCR-Programm im Echtzeit-RT-PCR-Assay untersuchten humanen epididymalen cDNA.

I-Molserie	FUT3	FUT4	FUT5	FUT6	FUT7
Molmasse [Dalton]	274339	256671	291117	27124	314184
Steigung	3.73	3.98	3.83	3.77	3.63
Cp (10fg)	21.95	22.28	22.61	25.83	23.17
Cp (cDNA)	30.68	29.89	30.52	28.85	31.69
ΔCp (10 fg)	0.00	0.33	0.66	3.88	1.22
ΔCp (cDNA)	0.00	-0.79	-0.16	-1.83	1.01
$\Delta\Delta$Cp(10fg, cDNA)	0.00	1.12	0.82	5.71	0.21
Effizienz	1.85	1.78	1.82	1.84	1.89
$E^{\Delta\Delta}$	1.00	1.91	1.64	32.82	1.14
Massen%	2.60	4.96	4.25	85.22	2.97
Mol%	2.6	5.3	4.0	85.6	2.6

Die relativ zueinander zu quantifizierenden Transkripte werden mit dem gleichen PCR-Programm gemessen. Die PCR-Effizienz für jedes dieser Transkripte im angewandten Quantifizierungsbereich ist bekannt. Die Effizienz erhält man, indem man einmal (und nicht in jedem weiteren Experiment zusätzlich) eine Verdünnungsreihe bekannter Amplikonkonzentration misst. Sind nun für jedes dieser zu quantifizierenden Transkripte der *crossing point* Cp einer definierten Menge an Transkript sowie die transkriptspezifische PCR-Effizienz bekannt, kann ohne Verwendung von Standards die relative Menge der unterschiedlichen Transkripte zueinander allein aus den gemessenen *crossing points* der zu quantifizierenden Proben bestimmt werden. Man bezieht hierbei die Mengen der Transkripte auf eines dieser Transkripte (hier das spezifische Fragment des FUT3-Transkripts), dessen Häufigkeit willkürlich eins gesetzt wird ($E^{\Delta\Delta}$).

Für die Berechnung der Transkriptmengen in der Probe wird nun die Differenz aus dem *crossing point* für eine bekannte Menge dieses Transkripts (Cp (10 fg)) und den *crossing points* gleicher bekannter Mengen der anderen Transkripte (Cp (10 fg)) gebildet. Sodann werden die Differenzen der *crossing points* in der zu quantifizierenden Probe (Cp (cDNA)) zum *crossing point* für das Transkript der FUT3 in der Probe (Cp (cDNA) für FUT3) gebildet.

Nun wird wiederum von diesen Differenzwerten, die man für die *crossing points* in der Probe erhält, die Differenz der *crossing points* in den Messungen mit bekannten gleichen Massen gebildet ($\Delta\Delta\text{Cp}(10 \text{ fg, cDNA})$). Durch Bildung dieses Doppel-Differenz-Wertes wird die Tatsache, bei identischen Transkriptmassen unterschiedlicher Transkripte unterschiedliche *crossing points* zu messen, berücksichtigt. Aus diesen Doppel-Differenz-Werten ($\Delta\Delta\text{Cp}(10 \text{ fg, cDNA})$) kann unter Berücksichtigung der PCR-Effizienz des relativ zum Transkript der FUT3 zu quantifizierenden Transkripts die relative Häufigkeit dieses Transkripts berechnet werden ($E^{\Delta\Delta}$):

$$m(\text{Transkript (FUTX)})/m(\text{Transkript (FUT 3)}) = (\text{Effizienz(FUTX)}) \exp (\Delta\Delta\text{Cp (FUTX)})$$

Um auf eine ähnliche Darstellung der Häufigkeit in Prozent wie für die herkömmliche Methode zu kommen, wurden die so erhaltenen Werte zunächst in Massenprozent umgerechnet (Massen%). Durch Berücksichtigung der Molmassen für jedes dieser FUT-spezifischen Fragmente fand eine Umrechnung auf relative Anzahl an Transkripten statt (Mol%). Für die Standards wurde DNA verwendet, die Molmassen beziehen sich auf die doppelsträngigen Fragmente.

In der folgenden Tabelle 4.3 werden die Ergebnisse, die sich nach der alternativen Methode ergeben, mit den Ergebnissen durch die konventionelle Methode verglichen.

Tab. 4.3 Vergleich der relativen Häufigkeitsverteilung der mRNA-Mengen der α 1-3-Fucosyltransferasen, die zum einen durch die alternative, zum anderen mit Hilfe der konventionellen Methode erhalten wurde.¹

	FUT 3	FUT 4	FUT 5	FUT 6	FUT 7
Alternative					
Methode	2.1 %	6.0 %	3.8 %	85.2 %	3.0 %
SD	0.5 %	1.8 %	1 %	3.6 %	0.7 %
Herkömmliche					
Methode	2.4 %	8.5 %	3.4 %	82.6 %	3.0 %
SD	0.3 %	1.7 %	0.7 %	2.6 %	0.7 %

¹ Die Werte wurden durch Dreifachmessung erhalten. SD bezeichnet die Standardabweichung. Einer dieser drei Datensätze ist in Tabelle 4.2 gezeigt. Die Häufigkeitsverteilung bezieht sich auf Teilchenzahlen.

In der folgenden Darstellung (Abb. 4.41) sind diese Ergebnisse aus Gründen der Anschaulichkeit noch einmal grafisch dargestellt.

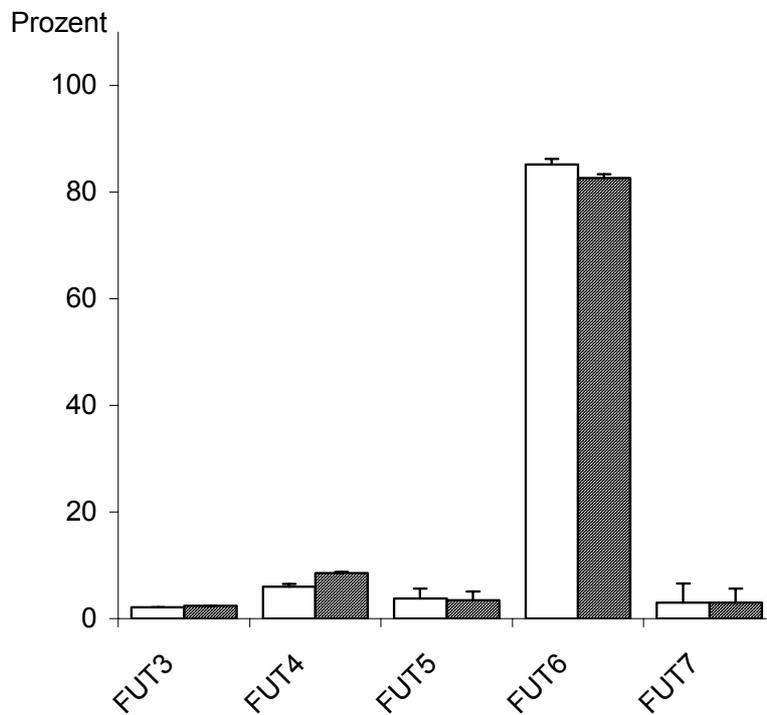


Abb. 4.41 Vergleich der relativen Häufigkeit der mRNA-Mengen der FUT3 bis FUT7 in einer humanen epididymalen cDNA, ermittelt mit der herkömmlichen sowie mit der alternativen Methode. Die weißen Balken repräsentieren die mit der alternativen, die schraffierten Balken die mit der herkömmlichen Methode erhaltenen Werte.

Eine Gegenüberstellung der alternativ erhaltenen Werte mit denen, die durch die konventionelle Methode erhalten wurden (Tab. 4.3, Abb. 4.41), zeigt, dass die alternative Methode bei weniger Material- und Zeitaufwand vergleichbare Ergebnisse liefert. Die alternative Quantifizierungsmethode stellt folglich eine preiswertere und weniger zeitaufwendige Möglichkeit dar, Ergebnisse vergleichbarer Qualität wie mit der konventionellen Methode zu erhalten.

5. Diskussion

5.1 Das Zelloberflächenantigen HE5/CD52

5.1.1 Rekombinante Expression von HE5/CD52

Das Zelloberflächenantigen HE5/CD52 aus dem humanen Nebenhoden unterscheidet sich hinsichtlich der Struktur seines GPI-Ankers wie auch seiner durch ausgeprägte Mikroheterogenität gekennzeichneten N-Glykane von dem auf Lymphozyten gefundenen Antigen (Schröter et al. 1999, Treumann et al. 1995). Von klinischem Interesse ist, welche dieser genitaltraktspezifischen Glykoformen mit natürlich auftretenden Antisperm-Antikörpern reagiert (Mahoney et al. 1991, Diekman et al. 1999a) und wie dieses Glykotop im Detail aussieht. In Zusammenhang damit ist bedeutsam, inwieweit spermien-spezifische Glykoformen des HE5/CD52 eventuell für die Entwicklung eines Kontrazeptivums für den Mann genutzt werden könnten (Diekman et al. 1997, Diekman et al. 1999b, Kirchhoff und Schröter 2001). Dies könnte zunächst über ein Tiermodell untersucht werden (McCauley et al. 2002). In dieser Arbeit wurde versucht, N-glykosyliertes HE5/CD52 mit Hilfe rekombinanter Expression zu gewinnen und die Glykostrukturen des rekombinanten Produkts zu charakterisieren. Hieraus sollten genauere Kenntnisse über den Aufbau des spermien-spezifischen Glykotops sowie die Bedeutung peripherer α 1-3-Fucosylierung für dieses Glykotop gewonnen werden. Für eine mögliche therapeutische Anwendung oder die Produktion eines Antigens zur aktiven Vaccinierung wäre man auf jeden Fall auf eine rekombinante Expression des HE5/CD52 angewiesen.

Bei Anwendung rekombinanter Expression hat man den großen Vorteil, die posttranslationalen Modifikationen des rekombinant exprimierten Proteins beeinflussen zu können. Dies ist möglich durch die Auswahl des Expressionssystems und der Kulturbedingungen. In Zusammenhang mit dem Zelloberflächenantigen HE5/CD52 wichtig ist hierbei der Einfluss des Expressionssystems auf die Glykosylierung. Dieses Molekül trägt N-Glykane des komplexen Typs. Das Wirtssystem zur rekombinanten Expression des HE5/CD52 sollte also in der Lage sein, N-Glykane des komplexen Typs zu synthetisieren. Im Folgenden werden kurz einige der gebräuchlichen Expressionssysteme hinsichtlich ihrer Glykosylierungseigenschaften dargestellt (Jenkins et al. 1996).

Bakterien

Dieses System bedient sich der Expression in Bakterien wie *E. coli*. Auf Grund der kurzen Generationsdauer von Bakterien kann man hier relativ schnell und in großer Menge das rekombinante Protein erhalten. In den gebräuchlichen Systemen, die sich *E. coli* bedienen, findet weder N-Glykosylierung noch O-Glykosylierung statt (Letourneur et al. 1995).

Hefen

Hefen (*Saccharomyces cerevisiae* oder *Picia pastoris*) sind Eukaryonten, weichen aber hinsichtlich ihrer Glykosylierungseigenschaften deutlich von denen in Säugerzellkulturen ab. Sie sind zwar zur N-Glykosylierung fähig, bilden jedoch keine N-Glykane des komplexen Typs. In den meisten Hefestämmen wird Hypermannosylierung beobachtet (Hersovics und Orleon 1993). Auch im Falle einer O-Glykosylierung können in Hefen andere Positionen innerhalb der Peptidkette glykosyliert werden als in Säugerzellen (Kalsner et al. 1992).

Insektenzellen/Baculovirussystem

Zur Transfektion ist das Baculovirus-System gebräuchlich. Insektenzellen werden mit rekombinanten Baculoviren, in die eine das Protein kodierende Sequenz eingebracht wird, infiziert. Die gebräuchlichen Insektenzellen sind *Spodoptera frugiperda* (*Sf9* sowie *Sf21*), hier werden nur N-Glykane vom Oligomannose-Typ beobachtet (Grabenhorst et al. 1993). Ein neuerer Ansatz beschreibt die Transfektion von Säugerzellen mit dem Baculovirus-Vektor (Condreay et al. 1999).

Säugerezelllinien, humane Zelllinien

Diese kommen den Glykosylierungseigenschaften, wie man sie in menschlichen Geweben und Zellen findet, sehr nahe. Trotzdem gibt es wichtige zelltypspezifische Unterschiede, besonders bezüglich der terminalen Komponenten in den Glykostrukturen. Hierzu zählen Vorkommen und Art der Verknüpfung von Sialinsäure oder peripherer sowie proximaler Fucose.

Die folgende Tabelle (nach Jenkins et al. 1996, Grabenhorst et al. 1999) gibt eine kurze Übersicht über einige Strukturmerkmale von Glykoproteinen aus verschiedenen Quellen.

Tab. 5.1 Glykosylierungscharakteristika einiger gebräuchlicher Expressionssysteme sowie Charakteristika der Glykosylierung, wie sie für humane Lymphozyten beschrieben ist.¹

	N-Glykane, komplex	Fucose, α 1-6	Fucose, α 1-3	NeuAc, α 2-6	NeuAc, α 2-3	bisecting GlcNAc
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Sf 9</i>	?	+	+	+	+	-
CHO	+	+	-	-	+	-
BHK	+	+	-	-	+	-
Lymphozyten	+	+	-	+	+	+

Die Glykosylierungseigenschaften der aufgeführten Systeme sind sehr unterschiedlich (Tabelle 5.1). Dies ist sehr wichtig bei der Auswahl des Systems, in dem HE5/CD52 rekombinant exprimiert wird. Dieses System sollte zur Synthese von N-Glykanen des komplexen Typs fähig sein. Somit scheidet eine rekombinante Expression des HE5/CD52 in *E. coli* aus. In Hefen (hier *Saccharomyces cerevisiae*) ist zwar die Synthese von N-Glykanen möglich, nicht aber von N-Glykanen des komplexen Typs. In *Sf-9*-Insektenzellen ist eventuell die Bildung von N-Glykanen des komplexen Typs möglich. Die Glykosylierungsmaschinerie ist bei rekombinanter Expression zu großer Proteinmengen jedoch vermutlich nicht schnell genug, um vollständig N-Glykane des komplexen Typs zu synthetisieren. Sowohl CHO- als auch BHK-Zellen können aber komplexe N-Glykane synthetisieren und ähneln auch in den weiteren Charakteristika Merkmalen, wie man sie für N-glykosyliertes CD52 auf Lymphozyten und im Nebenhoden und auf Spermien findet. Beide Zelltypen sind in der Lage, proximale α 1-6-Fucosylierung zu leisten, ein Merkmal, das Lymphozyten- und Genitaltraktprodukt aufweisen. Periphere α 1-3-Fucosylierung ist endogen weder in CHO- noch in BHK-Zellen möglich. Auf dem Lymphozyten-CD52 findet sich dieses Motiv nicht, auf dem HE5/CD52 aus dem Nebenhoden kommt dagegen α 1-3-Fucosylierung vor. Auch

¹ *E. coli* stellt ein bakterielles System dar, *Saccharomyces* sind Hefen, *Sf 9* sind Insektenzellen. CHO-Zellen sind Nagerzellen (*chinese hamster ovary cells*). Auch BHK-Zellen stammen vom Hamster (*baby hamster kidney cells*). + bedeutet, dass dieses Motiv gefunden wird, - heisst, dass das entsprechende Motiv in dem System nicht gefunden wird, ? zeigt kontroverse Ergebnisse an.

terminale Sialinsäure in α 2-3- sowie in α 2-6-Verknüpfung findet man in Glykoproteinen aus CHO- und BHK-Zellen. Beide Arten der Verknüpfung sind für CD52 relevant. Beim Lymphozyten-CD52 findet man überwiegend α 2-6-verknüpfte Sialinsäure (Treumann et al. 1995), beim Genitaltrakt-HE5/CD52 hingegen überwiegend α 2-3-gebundene terminale Sialinsäure (Schröter et al. 1999). Sowohl CHO- als auch BHK-Zellen stellen somit ein System zur rekombinanten Expression des HE5/CD52 dar. Beide Zelltypen verfügen nicht über eine endogene α 1-3-Fucosyltransferase-Aktivität. Dies könnte durch eine entsprechende Cotransfektion oder durch *In-vitro*-Fucosylierung des rekombinanten Produkts korrigiert werden. Es wurden letztendlich BHK-Zellen benutzt. CHO-Zellen stammen von ovariellen Zellen ab, HE5/CD52 kommt aber aus dem männlichen Genitaltrakt.

Eine rekombinante Expression des HE5/CD52 einschließlich der posttranslationalen N-Glykosylierung in BHK-Zellen war auch tatsächlich möglich, wie eine Spaltung durch PNGase F zeigte und die Laufweite des rekombinanten Produkts im SDS-PAGE schon vor der PNGase-F-Spaltung vermuten ließ. Die Mikroheterogenität des rekombinanten HE5/CD52 scheint aber weniger ausgeprägt, es sind nicht mehrere distinkte Banden wie beim nativen Produkt zu beobachten. Es gibt eine stärkere Bande mit einer Laufweite knapp unter 21 kD, eine schwächere Bande mit einer Laufweite zwischen 14 und 21 kD sowie eine Bande mit einer Laufweite von deutlich weniger als 14 kD, die auf nicht glykosyliertes HE5/CD52 zurückzuführen sein könnte. Die im Vergleich zum nativen System weniger ausgeprägte Mikroheterogenität des rekombinanten HE5/CD52 könnte damit zusammenhängen, dass Zelllinien immer eine Vereinfachung des ursprünglichen Systems darstellen und nicht so komplex organisiert sind. Viele Charakteristika differenzierter Zellen können in Zelllinien verloren gehen. Hierzu zählt auch die Fähigkeit zelltypspezifischer Glykosylierung.

Das durch stellenspezifische Mutagenese generierte β -Allel des HE5/CD52 zeigt bei transienter Expression in BHK-Zellen eine anscheinend stärkere Expression als das α -Allel. Hale et al. (1996) beobachteten dagegen eine höhere Expression des α -Allels. In den entsprechenden Experimenten wurden allerdings stabil transfizierte Zellen verwendet. Zudem wurden nicht BHK-Zellen benutzt, sondern CHO-Zellen und Jurkat-Zellen. Inwieweit die Anker-Signal-Sequenz (Eisenhaber et al. 1998) die Expression in unterschiedlichen Zelllinien tatsächlich unterschiedlich beeinflusst, müsste geklärt werden.

HE5/CD52 wird im männlichen, nicht aber im weiblichen Genitaltrakt gefunden. Der CHO-Zelltyp ist auf den weiblichen Genitaltrakt (im Hamster) zurückzuführen. Es wäre denkbar, dass die unterschiedliche Expression der beiden aus dem männlichen Genitaltrakt

stammenden Allele des HE5/CD52 in dieser Zelllinie aus dem weiblichen Genitaltrakt anders verläuft.

Während rekombinant exprimiertes HE5/CD52 eine deutliche Immunreaktivität mit dem CAMPATH-1-Antikörper zeigt, ist keine Immunreaktivität mit dem infertilitätsassoziierten Antikörper H6-3C4 zu beobachten. Der CAMPATH-1-Antikörper erkennt auf CD52 ein Epitop aus den 3 C-terminalen Aminosäuren und Teilen der Ankerstruktur (James et al. 1999). Die Immunreaktivität des spermien-spezifischen Antikörpers H6-3C4 mit dem nativen Produkt verschwindet allerdings nach vorhergehender Inkubation mit PNGase F.

Der spermien-spezifische Antikörper H6-3C4 richtet sich folglich gegen eine Glykokomponente (Glykotop), oder das Epitop auf HE5/CD52 besteht zumindest zu einem Teil aus einem Zuckermotiv. Demnach liefert die rekombinante Expression in BHK-Zellen zwar N-glykosyliertes HE5/CD52, allerdings keine Zuckermotive, die Immunreaktivität mit dem spermien-spezifischen Antikörper H6-3C4 bewirken. Das muss allerdings nicht heißen, dass nicht auch spermien-spezifische Glykoformen gebildet worden sein können. Es wären auch solche spermien-spezifischen Glykomotive denkbar, gegen die zwar nicht H6-3C4 gerichtet ist, dafür aber andere spermien-spezifische Antikörper.

5.1.2 Das spermien-spezifische Glykotop des nativen HE5/CD52

Zunächst wurde versucht, das Glykotop auf Seminalplasma-HE5/CD52 näher zu charakterisieren, gegen das sich der spermien-spezifische Antikörper H6-3C4 richtet. Hierzu wurde ein Folch-Extrakt aus humanem Seminalplasma, der HE5/CD52 in angereicherter Form enthielt, mit Exoglykosidasen inkubiert, um die spermien-spezifische N-Glykan-Struktur des HE5/CD52 vom nicht reduzierenden Ende her kontrolliert zu degradieren bzw. zu demaskieren. Neben einem deutlich maskierenden Einfluss terminal gebundener Sialinsäure konnte festgestellt werden, dass das Glykotop aus mehreren Lactosamineinheiten besteht. Die Zuckerkette muss in einer Galaktose enden, um vom H6-3C4-Antikörper erkannt zu werden. Bei mit N-Acetylglucosamin endenden Motiven lässt sich dagegen keine Immunreaktivität mit dem Antikörper H6-3C4 beobachten.

Diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit den Beobachtungen von Tsuji et al. (1988). Zur Charakterisierung des Glykotops wurde dort allerdings ein anderer Ansatz gewählt. Es wurde die Immunreaktivität des Antikörpers H6-3C4 mit verschiedenen aus natürlichen Quellen isolierten Gangliosiden untersucht.

Anhand der hier beschriebenen Ergebnisse lässt sich eine Aussage über die „Mindestausstattung“ des Glykotops machen. Eine Abgrenzung vom Lymphozyten-CD52 oder vom rekombinant in BHK-Zellen exprimierten Glykopeptid lässt sich so allerdings nicht vornehmen. Auch diese besitzen Lactosamin-Repeats. Auch die Möglichkeit, dass im rekombinanten HE5/CD52 das Glykotoptop durch vollständige Sialylierung maskiert wird, wurde in Betracht gezogen. Nach einer Sialidase-Spaltung des rekombinanten Produkts war jedoch trotzdem keine Immunreaktivität mit dem Antikörper H6-3C4 zu detektieren.

Es wären zwei alternative Ansätze denkbar, um genauere Aussagen über das Glykotoptop des HE5/CD52 treffen zu können, gegen das der Antikörper H6-3C4 gerichtet ist:

1.) Über einen Affinitätschromatografischen Ansatz mit dem Antikörper H6-3C4 könnte versucht werden, diejenigen Glykoformen des HE5/CD52 aus der Gesamtheit der HE5/CD52-Glykoformen zu isolieren und näher zu charakterisieren, die Immunreaktivität mit diesem Antikörper zeigen. Hierfür würden allerdings größere Mengen des hochreinen Antikörpers benötigt. Die freundlicherweise von Prof. Isojima zur Verfügung gestellte Menge in Form eines Hybridomazell-Kulturüberstandes eignet sich zur Durchführung von SDS-PAGE, Western-Blotting und anschließender Immundetektion, ist aber für Affinitätschromatografische Experimente nicht ausreichend.

2.) Ein anderer Ansatz würde eine Trennung der HE5/CD52-Glykoformen mit Hilfe der 2D-Elektrophorese (O'Farrell et al. 1975) beinhalten. In einem solchen Experiment wurde bereits versucht, das Proteom der humanen Spermatozoenoberfläche zu erfassen (Naaby-Hansen et al. 1997). Durch Auffinden bisher nicht bekannter Spermienoberflächenproteine könnte man Kandidaten für die Entwicklung eines kontrazeptiv wirkenden Impfstoffes ausfindig machen (Shetty et al. 2001). In weiteren Experimenten wurde versucht, mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese bisher unbekannte humane Spermienantigene zu identifizieren, die durch Spermien infertiler Frauen mit spermienimmobilisierenden Antikörpern detektiert werden können (Shibahara et al. 2002). Das Spermienoberflächenprotein HE5/CD52 wurde in einem 2D-Gelelektrophoreseexperiment studiert. Es zeigt nach der isoelektrischen Fokussierung mit dem spermien-spezifischen monoklonalen Antikörper S19 mindestens fünf Gruppen von Spots, was auf mindestens fünf sich durch ihre Ladung unterscheidende Isoformen rückschließen lässt (Diekman et al. 2000). In einem solchen 2D-Gelelektrophoreseexperiment zur hochauflösenden Trennung der Seminalplasmaformen des HE5/CD52 unter Detektion mit dem Antikörper H6-3C4 könnte man versuchen, die immunreaktiven und somit genitaltraktspezifischen Spots massenspektrometrisch zu erfassen. Die Zucker aus diesen Spots könnten abgespalten und mittels Massenspektrometrie analysiert werden.

5.1.3 *In-vitro*-Fucosylierung des nativen HE5/CD52

Aus der Strukturanalyse des HE5/CD52 (Schröter et al. 1999) war ersichtlich, dass ein Teil der Seminalplasma-Glykostrukturen des HE5/CD52 periphere Fucose in α 1-3-Verknüpfung enthält. α 1-3-Fucosylierung ist für das Lymphozyten-CD52 (Treumann et al. 1995) dagegen nicht beschrieben. Auch andere Lymphozyten-Glykoproteine enthalten keine α 1-3-Fucosylierung (Tabelle 5.1). Da auch BHK-Zellen keine α 1-3-Fucose enthaltenden Glykostrukturen synthetisieren, wurde nun versucht, dieses möglicherweise spermien-spezifische Motiv *in vitro* zu synthetisieren und für ein Experiment mit dem Antikörper H6-3C4 zu nutzen. Im nativen Produkt beobachtet man nur um 15 % periphere α 1-3-Fucosylierung (Schröter et al. 1999). Durch Inkubation eines Folch-Extrakts aus humanem Seminalplasma mit GDP-Fucose und dem Enzym Fuc-TVI sollte der Anteil der α 1-3-Fucosylierung des nativen HE5/CD52 erhöht werden. Das Enzym Fuc-TVI wurde verwendet, weil die entsprechende mRNA in dieser Arbeit als die bei weitem häufigste α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA im Nebenhoden ermittelt wurde. Wäre α 1-3-Fucose ein wichtiger Bestandteil des Glykotopts auf HE5/CD52, gegen das H6-3C4 gerichtet ist, sollte man eine Verstärkung der Immunreaktivität beobachten können, wenn man das Ausmass der α 1-3-Fucosylierung erhöht. Dies würde ein stärkeres Signal im Vergleich zum nicht fucosylierten Ansatz in der Westernblot-Analyse erwarten lassen. Die Immunreaktivität wurde jedoch nicht verstärkt, vielmehr war überhaupt keine Reaktivität des Antikörpers H6-3C4 mehr zu beobachten.

Es ist möglich, dass unter den gegebenen *In-vitro*-Versuchsbedingungen eine Difucosylierung stattgefunden hat, während *in vivo* eventuell nur monofucosyliert wird. Eine Erklärung wäre die Konkurrenz durch andere Akzeptoren. Ausserdem liegt das Enzym Fuc-TVI in der *In-vivo*-Situation räumlich fixiert im Golgi-Apparat vor.

Dass die FUT6-mRNA die häufigste α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA des Nebenhodens ist, heißt nicht zwingend, dass sie auch das häufigste Enzym stellt. Selbst wenn dies so wäre, könnte HE5/CD52 in der *In-vivo*-Situation trotzdem von einer anderen α 1-3-Fucosyltransferase als der Fuc-TVI fucosyliert werden.

Die Versuchsbedingungen einer *In-vivo*-Fucosylierung wären in jedem Fall anders als die Bedingungen der in dieser Arbeit durchgeführten *In-vitro*-Fucosylierung. Deshalb ist es möglich, dass in einem Coexpressions-Experiment von HE5/CD52 mit der Fuc-TVI oder einer anderen α 1-3-Fucosyltransferase in BHK-Zellen, die über keine endogene α 1-3-

Fucosyltransferase-Aktivität verfügen, trotzdem Immunreaktivität des rekombinanten HE5/CD52 mit dem Antikörper H6-3C4 auftritt.

Ein generelles Fehlen von α 1-3-Fucose-haltigen Glykomotiven in spermien-spezifischen HE5/CD52-Formen kann aus den Ergebnissen dieser Arbeit nicht gefolgert werden. Die hier beschriebenen Untersuchungen wurden mit nur einem spermien-spezifischen Antikörper durchgeführt. Es ist durchaus denkbar, dass es andere spermien-spezifische Glykomotive im Seminalplasma-HE5/CD52 gibt, die nicht mit dem Antikörper H6-3C4 reagieren.

5.2 Die α 1-3-Fucosyltransferasen im männlichen Genitaltrakt

Ausgangsfragestellung war, welche α 1-3-Fucosyltransferase auf Grund ihrer Häufigkeit im Nebenhoden der wahrscheinlichste Kandidat für die spermien-spezifische periphere α 1-3-Fucosylierung des HE5/CD52 sein könnte.

5.2.1 Häufigkeitsverteilung der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs im Nebenhoden und im Hoden

Im Nebenhoden war die bei weitem häufigste α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA die FUT6. Dies gilt für Gesamtnebenhodenextrakte wie auch für jede der drei Regionen Caput, Corpus und Cauda. Für die ebenfalls posttestikulär gelegene Prostata ist ebenfalls die FUT6-mRNA die bei weitem häufigste α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA. Im Hoden hingegen sind alle α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs ungefähr gleich häufig.

Spermien erlangen ihre Befruchtungsfähigkeit erst während der Passage des Nebenhodens. Hiermit verbunden sind auch dramatische Modifikationen der Spermien-Glykokalix. Dies geht einher mit einem gegenüber dem Testis differenzierten Muster der Häufigkeitsverteilung der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs. Bei einem Vergleich der mRNA-Mengen der FUT6, die in Nebenhoden und Hoden gefunden werden, zeigt sich, dass die FUT6-mRNA im Nebenhoden um ein bis zwei Größenordnungen häufiger ist als im Hoden. Nimmt man an, dass die mRNA-Menge mit der Menge des Enzyms korreliert, ergibt sich hier eine interessante Parallele zu Arbeiten über Fucosylierungen im Genitaltrakt der Maus (Cossu und Boitani 1984). Hier wird beschrieben, dass Lactosaminoglykane testikulärer Spermatozoen im

Gegensatz zu denen epididymaler Spermatozoen nicht fucosyliert sind. Bei einem deutlich geringeren Anteil des Enzyms im Hoden würde man auch einen geringeren Anteil der durch dieses Enzym gebildeten Strukturen erwarten.

Zusammengenommen ergibt sich für den Nebenhoden eine im Vergleich zum Hoden differenzierte und vor allem deutlich erhöhte mRNA-Menge der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs. Korreliert dies mit der Menge an Enzym, würde dies direkt die massiven Veränderungen, die die Spermien-Zuckerstrukturen während ihrer Passage durch den Nebenhoden erfahren, widerspiegeln.

5.2.2 Vergleich der durch Fuc-TIII oder Fuc-TVI fucosylierten Glykostrukturen im Genitaltrakt

Eine Möglichkeit, um Rückschlüsse auf in bestimmten Geweben vorhandene Glykosyltransferaseaktivitäten zu ziehen, bedient sich der Möglichkeit, die durch Glykosyltransferasen synthetisierten Glykostrukturen über Lektinbindung nachzuweisen. Hierzu gibt es Untersuchungen im humanen männlichen Genitaltrakt, die auf der Methode der Lektin-Histochemie basieren (Arenas et al. 1998a, Arenas et al. 1998b). Unter Berücksichtigung früherer Arbeiten, die Lewis-a- und Lewis-b-Antigene im männlichen Genitaltrakt beschreiben (zusammengefasst in Ravn und Dabelsteen 2000), ist die große Häufigkeit der FUT6 auf Transkriptebene bei gleichzeitigen sehr geringen Mengen des FUT3-Transkripts überraschend. Lewis a und Lewis b sind beide vom Typ I (Gal β 1-3GlcNAc), sodass man hier auf eine Aktivität der Fuc-TIII rückschließen würde. Dem widerspricht, dass in humanem Seminalplasma ausschließlich Formen des Typs II (Gal β 1-4GlcNAc) gefunden werden (Chalabi et al. 2002). Dies macht eine größere Häufigkeit der Fuc-TIII gegenüber der Fuc-TVI wiederum unwahrscheinlich. Auch in anderen Arbeiten ist für Testis (Arenas et al. 1998b) sowie für Epididymis (Arenas et al. 1998a) und Vas deferens (Arenas et al. 1998c) ein häufiges Vorkommen von Strukturen des Typs II beschrieben. Auch dies spricht für eine größere Häufigkeit der Fuc-TVI gegenüber der Fuc-TIII.

5.2.3 Mögliche Funktionen der Fuc-TVI

Ein quantitativer Nachweis auf Proteinebene oder ein Nachweis, welche der α 1-3-Fucosyltransferasen im Nebenhoden die größte Aktivität aufweist, ist für den humanen Nebenhoden schwierig durchführbar. Gewebeproben stehen nur in sehr begrenzter Menge zur Verfügung. Dies reicht für Untersuchungen auf Proteinebene oder für Aktivitätsassays der α 1-3-Fucosyltransferasen nicht aus. Daher wurden die Untersuchungen zur Häufigkeit der α 1-3-Fucosyltransferasen auf mRNA-Ebene durchgeführt. Es ist allerdings nicht mit Bestimmtheit zu sagen, ob die Menge an mRNA mit der Menge an Protein korreliert und ob die häufigste α 1-3-Fucosyltransferase in der *In-vivo*-Situation mit einem komplexen Gemisch verschiedenster Akzeptoren auch die größte Aktivität aufweist. Glykosyltransferasen sind als Golgi-assoziierte Proteine enzymatisch aktiv. Liegen sie als nicht Golgi-assoziierte, sezernierte Proteine vor, ist ihre enzymatische Aktivität zumindest eingeschränkt. Dies ist auch für Fuc-TVI beschrieben (Grabenhorst et al. 1998). Ob die in dieser Arbeit nachgewiesenen α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs nun tatsächlich Golgi-assoziierten Proteinen zuzuordnen sind, lässt sich ebenfalls nicht sagen. So wurde beispielsweise die Fuc-TVI in anderen Arbeiten in so genannten Weibel-Palade-Körperchen (endotheliale Speichergranula) nachgewiesen, also in nicht-Golgi assoziierter Form (Schnyder-Candrian et al. 1999). Die dort nachgewiesene Fuc-TVI scheint konformationelle Unterschiede zur Golgi-assoziierten Form aufzuweisen. Die mögliche Funktion in den Weibel-Palade-Körperchen ist unbekannt, enzymatische Aktivität ist so gut wie nicht vorhanden. Es wird vermutet, dass die Fuc-TVI dort eine lektinartige Funktion übernehmen könnte. Sie erkennt dort Fucose, setzt sie aber nicht enzymatisch um. Im Gegensatz dazu werden in einer anderen Arbeit nicht golgi-assoziierte Glykosyltransferasen auf epididymalen Spermatozoen und in der Seminalflüssigkeit aus der Ratte postuliert (Tulsiani et al. 1998). In diesen Studien wurde aber die enzymatische Aktivität in *In-vitro*-Experimenten unter Zugabe von GDP-Fucose festgestellt. Hieraus Rückschlüsse auf die enzymatische Aktivität nicht golgiassoziierter Glykosyltransferasen in einer *In-vivo*-Situation zu ziehen, ist schwierig.

5.3 Methodische Überlegungen zum Echtzeit RT-PCR-Assay

5.3.1 RT-PCR-Assays zur relativen und absoluten Quantifizierung

Bei Expressionsstudien gilt ein großes Interesse der Menge des in der Zelle oder im Gewebe vorhandenen Proteins. Im Falle von Enzymen ist natürlich auch die Aktivität im untersuchten System von großem Interesse. Um diese Informationen zu erhalten, kann man eine Proteomanalyse durchführen oder Enzymassays verwenden. Im Falle eines Enzymassays für eine „Rangfolge“ der Aktivitäten der α 1-3- Fucosyltransferasen würde man sich die unterschiedlichen Spezifitäten der einzelnen α 1-3-Fucosyltransferasen zu Nutze machen. Hierbei würde man unterschiedliche Akzeptoren einsetzen, wie z. B. sialylierte oder nicht sialylierte Typ I-(Gal β 1-3GlcNAc) oder Typ II-(Gal β 1-4GlcNAc)-Strukturen. Limitierend an diesem Ansatz wäre allerdings, dass es sich bei diesen Akzeptoren um relativ kleine-Modellakzeptoren handelt, die weder die Vielfalt noch die Größe und damit Komplexität der Kohlenhydratstrukturen innerhalb einer Zelle oder eines Gewebes widerspiegeln können. Zudem konkurrieren in einer *In-vivo*-Situation viele Akzeptoren, was durch einen *In-vitro*-Ansatz nicht nachzuvollziehen ist.

Für den Ansatz der Proteomanalyse wie auch für Enzymassays bedarf es relativ großer Mengen an Protein. Dieses ist bei Studien an humanem Nebenhodengewebe nicht zu leisten. Diese Proben stehen nur in sehr begrenzter Menge zur Verfügung. Man ist hierbei also auf deutlich empfindlichere Methoden angewiesen, die mit deutlich geringeren Mengen an Gewebe auskommen.

Man geht dazu vom Protein eine Ebene „rückwärts“ auf Transkriptebene und unternimmt eine Quantifizierung auf mRNA-Ebene. Es wird angenommen, dass die Menge an mRNA mit der Menge an Protein korreliert.

Zur Untersuchung auf Transkriptebene kommen grundsätzlich mehrere Verfahren in Frage (Bustin 2000). Es sind dies die Methoden Northernblotting und *In-situ*-Hybridisierung (Parker et al. 1999), RNase-Protection-Assays (Hod 1992, Saccomanno et al. 1992) sowie RT-PCR-Assays (Weis et al. 1992).

Die Informationen, die man mit diesen Methoden erhalten kann, unterscheiden sich. So ist eine Aussage über die Transkriptlänge beispielsweise nur mit der Methode des Northern-Blotting möglich. Eine Lokalisation der untersuchten mRNA an bestimmten Positionen im Gewebe ist nur mit *In-situ*-Hybridisierung möglich. RNase-Protection-Assays sind geeignet, um Spleißstellen aufzufinden. Diese drei Methoden sind aber eher als halbquantitativ zu

bezeichnen. Außerdem sind diese Methoden gekennzeichnet durch geringe Empfindlichkeit, d. h. kleine Mengen an Transkript sind mit diesen drei Methoden nicht nachweisbar, nicht einmal rein qualitativ (Melton et al. 1984).

Die Methode RT-PCR ist deutlich sensitiver, theoretisch ist der Nachweis eines einzelnen Transkripts im Probenvolumen möglich.

Man misst allerdings nicht direkt die mRNA. Es ist hier ein zusätzlicher Schritt erforderlich. Aus der mRNA wird zunächst über reverse Transkription eine cDNA hergestellt, die als Probe für die eigentliche Messung dient.

5.3.2 Genomische Kontamination

Bei der Isolierung von RNA aus Geweben besteht die Gefahr, dass die RNA-Präparation mit genomischer DNA kontaminiert ist. Es gibt drei unterschiedliche Ansätze, um dieser Problematik gerecht zu werden:

1.) Man behandelt die RNA vor der cDNA-Synthese, also vor der reversen Transkription, mit DNase. Dieses Enzym hydrolysiert DNA, nicht aber RNA. Vor der cDNA-Synthese muss dieses Enzym inaktiviert werden, denn im nachfolgenden Experiment zur Quantifizierung wird DNA gemessen, die man vor einem Abbau durch DNase schützen muss. Ob eine Hitzeinaktivierung die DNase-Aktivität bei gleichzeitiger Unversehrtheit der RNA vollständig beseitigen würde, ist nicht gesichert. Ein anderes Problem dieser Technik liegt darin, dass DNAsen mit großer Wahrscheinlichkeit, bedingt durch die Art der Isolierung aus natürlichen Quellen, Kontaminationen mit RNAsen in sich tragen. Bei der hydrolytischen Spaltung der genomischen DNA-Kontamination mit der zugesetzten DNase würde man so gleichzeitig einen Teil der Transkripte, die man quantifizieren möchte, zerstören.

2.) Eine zweite Methode basiert darauf, Oligonukleotid-Primer so auszuwählen, dass sense- und antisense-Oligonukleotid-Primer in unterschiedlichen Exons liegen, also intron-überspannend sind. Im PCR-Programm wählt man unter Berücksichtigung der Prozessivität der verwendeten Polymerase die Elongationszeit so, dass diese zur Amplifikation aus dem genomischen Fragment, das um die Länge des Introns größer ist als das zu quantifizierende Transkript, nicht ausreicht. Dies funktioniert nur bei relativ langen Introns.

3.) Die dritte Möglichkeit besteht darin, die genomische Kontamination zu messen, indem man einen zum cDNA-Ansatz identischen Ansatz herstellt, der allerdings nicht mit Reverser Transkriptase versetzt wird. Über die Differenz der *crossing points* für die eigentliche cDNA

und die Kontroll-cDNA ohne reverse Transkription kann auf den Grad der Kontamination geschlossen werden.

In dieser Arbeit wurde die dritte Möglichkeit gewählt. Der DNase-Dau erschien auf Grund oben beschriebener Risiken als nicht geeignet. Die Möglichkeit, intronüberspannende Primer zu wählen, schied aus, da man hierbei im Falle der FUT3 und FUT6 nicht alle Spleißvarianten hätte erfassen können. Zudem sind für die FUT6 vermutlich noch gar nicht alle Spleiss-Varianten bekannt. Daher erscheint es sinnvoll, mit Hilfe eines Amplikons zu quantifizieren, das in dem Exon liegt, welches das offene Leseraster beinhaltet.

5.3.3 Verwendung eines externen Standards in RT-PCR-Assays

Es gibt zwei mögliche Ausgangsfragestellungen für einen RT-PCR-Assay. Zum einen kann die Fragestellung sein, wie häufig ein Gen in unterschiedlichen Geweben auf Transkriptebene vorkommt. Zum anderen kann die Frage gestellt werden, wie häufig verschiedene Gene auf Transkriptebene innerhalb derselben Probe vorkommen, d.h. man ist an einer Häufigkeitsverteilung interessiert.

Für den ersten Fall gibt es zwei Möglichkeiten, die Messwerte für unterschiedliche Gewebe vergleichbar zu machen. Zum einen kann man als Bezugsgröße ein so genanntes Haushaltsgen wie z. B. β -Actin oder GAPDH verwenden (Abb. 5.1 B). In Näherung setzt man diese Gene als in allen Geweben gleich stark transkribiert voraus und bezieht die Messwerte, die man für das Transkript erhält, auf die Werte, die man für das entsprechende Gewebe für das Haushaltsgen misst. Im Vergleich, in welchem der untersuchten Gewebe das Transkript häufiger ist, wird also ermittelt, in welchem Gewebe pro Haushaltsgen-Transkript mehr Transkript des untersuchten Gens vorhanden ist. Dass das entsprechende Haushaltsgen in allen Geweben und zu jedem Zeitpunkt auf Transkriptebene gleich häufig vorhanden ist, ist allerdings fragwürdig (Pritchard et al. 2001). So ist beispielsweise der Anteil an β -Actin in Leber sehr gering. Damit wird bei Verwendung dieses Haushaltsgens als Standard im Vergleich mit anderen Geweben eine ungleich höhere Transkripthäufigkeit angedeutet, was nur auf die Bezugsgröße zurückzuführen ist. Zudem kann sich die Zusammensetzung eines Gewebes sehr stark in Abhängigkeit vom Alter verändern. So nimmt beispielsweise der Fettgehalt in Geweben des männlichen Genitaltrakts mit dem Alter deutlich zu. In diesem Fettgewebe ist aber der Anteil an β -Actin zu vernachlässigen.

Entscheidend ist auch die Präparation der Gewebe. Bei unterschiedlichen Präparationen können unterschiedliche Mengen Fett am Gewebe verbleiben. Die gemessene Menge der als Bezugsgröße gewählten mRNA hängt davon ab, wieviel Bindegewebe entfernt wird oder aber am Präparat verbleibt. Diese Problematik betrifft hauptsächlich *In-vivo*-Studien. Im Falle von *In-vitro*-Studien, beispielsweise bei der Untersuchung der Genexpression (auf Transkriptebene) in Zelllinien, sind die zu vergleichenden Zellen gleich alt, wurden unter gleichen Kulturbedingungen gehalten und werden auch einheitlich aufgearbeitet. Hiermit entfallen also die Faktoren, die den Vergleich verschiedener Gewebe erschweren oder sogar fragwürdig erscheinen lassen.

Eine zweite Möglichkeit des Vergleichs der Transkriptmenge eines Gens zwischen verschiedenen Geweben bezieht die Menge des zu quantifizierenden Transkripts auf die für die Synthese der cDNA eingesetzte Menge an RNA (Abb. 5.1 C). Durch diesen Ansatz kann man die bei Verwendung eines Haushaltgens angesprochene Problematik umgehen. Liegen jedoch RNAs mit unterschiedlichem Degradationsgrad vor, sind mit dieser Methode erhaltene Ergebnisse vorsichtig zu interpretieren. Unter der Annahme, dass in degradierten RNAs das untersuchte Transkript und das Transkript eines entsprechenden Haushaltgens ähnlich stark degradiert sind, ist die Methode unter Bezugnahme auf das Transkript des Haushaltgens zu bevorzugen.

Bei der Ermittlung einer Häufigkeitsverteilung der Transkripte unterschiedlicher Gene innerhalb ein und desselben Gewebes (Abb. 5.1 A), also innerhalb einer RNA-Präparation, entfällt die Notwendigkeit einer Normalisierung mit Hilfe eines Haushaltgens oder die Bezugnahme auf die zur cDNA-Synthese eingesetzte Menge an RNA. Die hiermit eingeführte Normalisierung würde alle Werte gleichermaßen beeinflussen, das relative Mengenverhältnis der Transkripte der untersuchten Gene innerhalb derselben RNA-Präparation bliebe hierdurch unverändert.

In der folgenden Abbildung 5.1 sind die unterschiedlichen Möglichkeiten zur Wahl eines Bezugssystems bei der Ermittlung der mRNA-Menge der FUT6 in drei verschiedenen humanen Nebenhoden gezeigt.

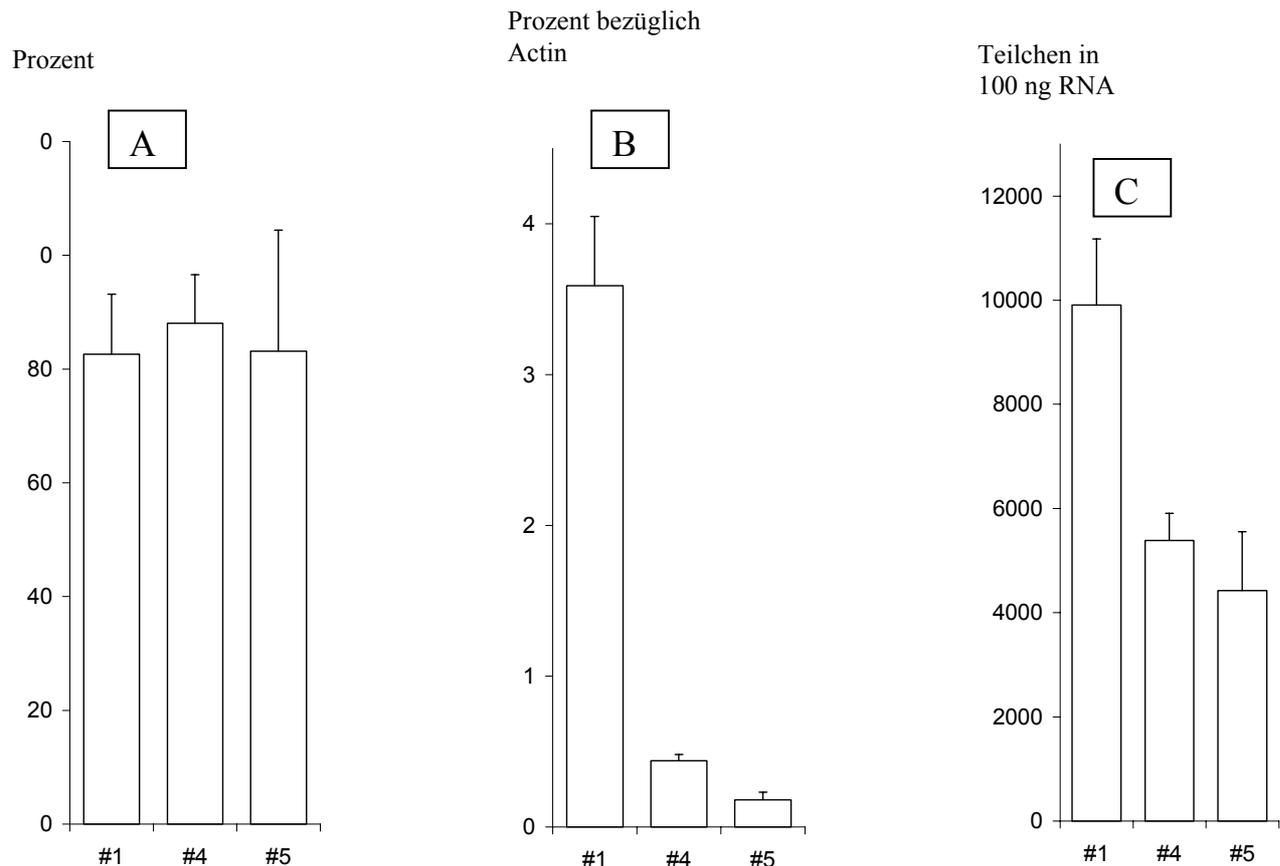


Abb. 5.1 Darstellung der mRNA-Menge der FUT6 in den Nebenhoden #1, #4 und #5 (Zahlenwerte siehe Anhang 9.2) unter Verwendung unterschiedlicher Bezugsgrößen. In A ist die Häufigkeit der FUT6-mRNA als Anteil an der Gesamthäufigkeit der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs (deren Summe als 100 % gesetzt wird) in #1, #4 und #5 angegeben. In B ist die mRNA des β -Actin als Bezugsgröße gewählt; es ist der Anteil der FUT6-mRNA in Prozent bezogen auf die β -Actin mRNA angegeben. In C ist gezeigt, wie viel Transkripte in einer gemessenen Probe (d. h. in einer Kapillare bei einem Experiment) gefunden wurden, diese Werte beziehen sich also auf die Ausgangsmenge der zur cDNA-Synthese eingesetzten Menge an RNA (dies entspricht 100 ng RNA pro Kapillare). Man sieht, dass in der Darstellung A die Abweichung in den unterschiedlichen Proben #1, #4 und #5 am geringsten ist. Bei dieser Wahl der Bezugsgröße ist das Ausmaß der RNA-Degradation (dies beeinflusst hauptsächlich Darstellung C) sowie unterschiedliche Gewebeaufarbeitung durch unterschiedliche Präparatoren (dies beeinflusst hauptsächlich Darstellung B) nicht relevant.

Aus Abbildung 5.1 ist ersichtlich, dass man ungefähr gleich bleibende Werte für die mRNA-Menge der FUT6 erhält, wenn man diese Menge auf die Gesamt-Menge der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs in der jeweiligen Probe bezieht. Bei der Wahl eines Haushaltsgens als Bezugsgröße schwanken die Werte der FUT6-mRNA-Menge deutlich. Dies ist auch der Fall, wenn man die Häufigkeit in Beziehung setzt zur Menge an RNA, die zur cDNA-Synthese eingesetzt wurde. Hier wird die Darstellung direkt durch den Degradationsgrad der mRNA bestimmt.

In dieser Arbeit wurde daher größtenteils die Darstellung gemäß Abbildung 5.1 A gewählt. Dies war außerdem unter Berücksichtigung der Frage, welche α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA die häufigste in der jeweils untersuchten Probe ist, die naheliegendste Art der Darstellung.

5.4 Die alternative Quantifizierungsmethode

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode zur relativen Quantifizierung zeichnet sich durch den Vorteil aus, dass man nur ein einziges Mal eine Standardreihe, in der jede der sechs Proben eine andere, aber bekannte Amplikonkonzentration enthält, messen muss. Aus dieser Messung erhält man die Cp-Werte (*crossing points*) in Abhängigkeit von der bekannten Amplikonkonzentration vor dem Start der PCR. Hieraus lässt sich die Amplifikations-effizienz für dieses Amplikon unter diesen PCR-Bedingungen ermitteln. Diese Werte sind sehr gut reproduzierbar, sodass man die hieraus erhaltene PCR-Effizienz auch in anderen Experimenten unter identischen PCR-Bedingungen erhält. Ist diese PCR-Effizienz für alle Amplikons, die man in einer cDNA untersuchen möchte, bekannt (für jedes Amplikon erhält man eine andere Effizienz), kann die relative Häufigkeitsverteilung ermittelt werden, ohne dass in jedem PCR-Experiment eine Standardreihe mit gemessen werden muss. Dieser Ansatz entspricht im Wesentlichen dem von Liu und Saint (2002) beschriebenen; die PCR-Effizienz wird hier allerdings auf andere Weise ermittelt. Die für jedes Amplikon unter den gegebenen PCR-Bedingungen spezifische Effizienz ist für die nachfolgende Quantifizierung sehr wichtig. Dies veranschaulicht nachfolgende Tabelle 5.2., in der die Vervielfachung des Amplikons in Abhängigkeit von der Zyklenzahl und der PCR-Effizienz gezeigt ist.

Tab. 5.2 Vervielfachung eines Amplikons in Abhängigkeit von der PCR-Effizienz und der Zyklenzahl.¹

Zyklen Effizienz	70 %	80 %	90 %	100 %
5	14	19	25	32
10	202	357	613	1024
20	40642	127482	375900	1048576

¹ Eine Effizienz von 100 % entspricht einer Verdoppelung mit jedem Zyklus.

Tabelle 5.2 zeigt, dass es sehr wichtig ist, die spezifische Effizienz eines Amplikons für einen Quantifizierungsansatz zu kennen. Würde man eine Verdoppelung der Templatmenge mit jedem Zyklus einer PCR zur Grundlage der Berechnungen annehmen, würde bei einer Differenz von 20 Zyklen im Falle einer 70%igen PCR-Effizienz ein Fehler mit einem Faktor von 26 resultieren ($1048576/40642=26$).

Unter Berücksichtigung der amplikonspezifischen PCR-Effizienz allerdings ist es mit diesem alternativen Ansatz möglich, zeit- und kostensparend Ergebnisse von vergleichbarer Qualität wie mit der herkömmlichen, zeit- und materialaufwendigeren Methode zu erhalten.

6. Zusammenfassung

Das Zelloberflächenantigen CD52 kommt auf Lymphozyten und im männlichen Genitaltrakt vor. Bei identischem Peptidrückgrat unterscheiden sich die beiden Formen aber in der Struktur des GPI-Ankers und der komplexen N-Glykane. Das Genitaltrakt-HE5/CD52 ist als Hauptreifungsantigen entscheidend für die Spermienreifung im Nebenhoden. In dieser Arbeit wurde HE5/CD52 rekombinant exprimiert und charakterisiert. Wichtig war hierbei die Immunreaktivität sowohl des nativen als auch des rekombinant exprimierten HE5/CD52 mit einem spermien-spezifischen, infertilitätsassoziierten Antikörper H6-3C4. Für die Genitaltraktform des HE5/CD52, das im Unterschied zum Lymphozyten-CD52 periphere α 1-3-Fucosylierung zeigt, ist die Frage nach den im Nebenhoden vorhandenen α 1-3-Fucosyltransferasen sehr wichtig. Diese wurden auf mRNA-Ebene im Nebenhoden sowie in den auch zum männlichen Genitaltrakt zählenden Organen Hoden sowie Prostata quantifiziert. Die Modifizierung des HE5/CD52 durch die auf mRNA-Ebene häufigste α 1-3-Fucosyltransferase FUT6 wurde hinsichtlich der Immunreaktivität mit dem spermien-spezifischen Antikörper H6-3C4 untersucht.

Die beiden Allele des Spermienoberflächen-Glykoproteins HE5/CD52 wurden rekombinant in BHK-21 Zellen exprimiert. Das rekombinant exprimierte HE5/CD52 ist ebenso wie das native Produkt N-glykosyliert, zeigt in der Western-Blot-Analyse nach SDS-PAGE aber ein weniger komplexes Bandenmuster als das native HE5/CD52. Die Mikroheterogenität ist demnach vermutlich nicht so ausgeprägt wie im Falle des HE5/CD52 aus Seminalplasma. Mit dem spermien-spezifischen Antikörper H6-3C4, der gegen eine Glykokomponente des HE5/CD52 gerichtet ist, lässt sich keine Immunreaktivität beobachten. Die durch den Antikörper H6-3C4 erkannte Glykokomponente des nativen HE5/CD52 besteht aus β 1-4-verknüpften N-Acetylglucosamin- und Galaktoseeinheiten (Typ II), die in Galaktose am nicht reduzierenden Ende terminiert werden. Dieses Strukturmotiv wird durch terminale Sialinsäure maskiert. Bei *In-vitro*-Fucosylierung des nativen HE5/CD52 durch humane α 1-3-Fucosyltransferase VI aus *Spodoptera frugiperda* tritt keine Immunreaktivität mit dem spermien-spezifischen Antikörper H6-3C4 mehr auf.

Es wurde ein fluoreszenzbasierter Echtzeit-RT-PCR-Assay entwickelt, mit dem die bisher bekannten α 1-3-Fucosyltransferasen auf Transkriptebene in jedem Humangewebe quantifiziert werden können. Mit diesem Assay wurden α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA-Mengen im humanen männlichen Genitaltrakt, hauptsächlich im Nebenhoden, bestimmt.

Im Testis lässt sich keine dominierende α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA ermitteln. Die weit häufigste α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA in den posttestikulären Organen Nebenhoden und Prostata ist die der FUT6. Die FUT6-mRNA ist sowohl im Gesamtnebenhoden als auch in jeder der Regionen Caput, Corpus und Cauda des Nebenhodens die häufigste.

Bei Langzeit-Anti-Androgen-Behandlung geht die Menge an FUT6-mRNA im Nebenhoden zurück, die häufigste α 1-3 Fucosyltransferasen mRNA ist die der FUT4, deren Transkriptmenge bei Anti-Androgen-Behandlung deutlich ansteigt.

Es wurde des Weiteren eine Methode entwickelt, um mit fluoreszenzbasierter Echtzeit RT-PCR kostengünstiger und außerdem zeitsparender Ergebnisse vergleichbarer Qualität wie mit der konventionellen Methode zu erhalten. Bei der konventionellen Methode wird in jedem Experiment eine Reihe von Proben bekannter Amplikonkonzentration zusätzlich zu den eigentlichen Proben vermessen. Dieses ist bei der alternativen Methode nicht der Fall, hier muss nur in einem einzigen Experiment eine Reihe bekannter Amplikonkonzentrationen vermessen werden. In allen weiteren Messungen ist kein Vermessen von Standards bekannter Amplikonkonzentration mehr nötig.

7. Summary

The cell surface glycoprotein HE5/CD52 is found on lymphocytes and also in the male genital tract. In both cell types it has an identical peptide backbone but differs in its posttranslational modifications GPI-anchor and N-linked glycan. The male genital tract product is also known as the major maturation-associated antigen, reflecting its essential role concerning sperm maturation in the epididymis. In this study HE5/CD52 was recombinantly expressed and characterized laying an emphasis on its immunoreactivity of both, the native as well as the recombinantly expressed CD52, with a sperm-specific, infertility-associated antibody H6-3C4. As HE5/CD52 from the male genital tract differed from the lymphocyteproduct by peripheral α 1-3-fucosylation, the α 1-3-fucosyltransferases were investigated. They were quantified on the mRNA level in the human epididymis as well as in other male genital tract organs, i. e. testis and prostate. Modification of HE5/CD52 by the most abundant α 1-3-fucosyltransferase on the mRNA level was investigated by looking at immunoreactivity with the sperm-specific antibody H6-3C4.

Both alleles of HE5/CD52 were expressed recombinantly in BHK-cells. Recombinantly expressed HE5/CD52 is N-glycosylated like the native product, however, showing a less complex pattern in Western-Blot-analysis. Its microheterogeneity probably is not as elaborated as it is for the native product isolated from seminal plasma. With the recombinantly expressed HE5/CD52 no immunoreactivity with the sperm-specific antibody H6-3C4 which is directed against a glyco-structure can be detected. The glycotope of the native HE5/CD52 which is recognized by H6-3C4 consists of β 1-4-linked acetylglucosamine- and galactose-units (type II) being terminated by galactose at the non-reducing end. This motive is masked by terminal sialic acid. HE5/CD52 which has been modified by *in-vitro*-fucosylation using α 1-3-fucosyltransferaseVI from *spodoptera frugiperda* no longer shows any immunoreactivity with the sperm-specific antibody H6-3C4.

A fluorescence-based RT-PCR assay was developed for quantifying on a transcript level all known α 1-3-fucosyltransferases in every human tissue of interest. Using this assay α 1-3-fucosyltransferase mRNA quantities were determined in the male genital tract focussing on epididymis. In the testis there is no pre-dominant α 1-3-fucosyltransferase mRNA. In the epididymis as well as in the prostate FUT6 was the by far most abundant α 1-3-fucosyltransferase mRNA. This was true for the whole epididymis as well as for each of the anatomical regions caput, corpus and cauda.

Concerning the methodology an alternative way of quantification was developed by using a fluorescence-based RT-PCR-assay which is less expensive and time-consuming. The results obtained were of a quality which is comparable to those obtained by using the conventional method. Using the conventional method a series of samples of known amplicon-concentration in addition to the samples of interest has to be measured in each experiment. Using the alternative method, this series of samples containing amplicons of known concentration has to be measured only once. In all following experiments only the samples of interest have to be measured.

8. Literaturverzeichnis

Arenas, M. I., Madrid, J. F., Bethencourt, F. R., Fraile, B. und Paniagua, R. (1998a). Identification of N- and O-linked Oligosaccharides in the Human Epididymis. *J Histochem Cytochem* 46, 1185-1188.

Arenas, M. I., Madrid, J. F., Fraile, B. und Paniagua, R. (1998b). Lectin histochemistry of the human testis. *Int J Androl* 21, 332-342.

Arenas, M. I., Madrid, J. F., Bethencourt, F. R., Fraile, B. und Paniagua, R. (1998c). Lectin histochemistry study in the human vas deferens. *Glycoconj J* 15, 1085-1091.

Baldino, F., Chesselet, M.-F. und Lewis, M. E. (1989). High-resolution in situ hybridization histochemistry. *Methods Enzymol* 168, 761-777.

Benoff, S. (1997). Carbohydrates and fertilization: an overview. *Mol Hum Reprod* 3, 599-637.

Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1522.

Bleil, J. D. und Wassarman, P. M. (1980). Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol* 76, 185-202.

Britten, C. J., van den Eijnden, D. H., McDowell, W., Kelly, V. A., Witham, S., Edbrooke, M. R., Bird, M. I., de Vries, T. und Smithers, N. (1998). Acceptor specificity of the human leukocyte $\alpha 3$ fucosyltransferase: role of FucT-VII in the generation of selectin ligands. *Glycobiology* 8,321-327.

Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169-193.

Cameron, H.S., Szczepaniak, D. und Weston, B.W. (1995). Expression of human chromosome 19p alpha(1,3)-fucosyltransferase genes in normal tissues. Alternative splicing, polyadenylation, and isoforms. *J Biol Chem* 270, 20112-20122.

Cantell, K., Hirvonen, S., Sareneva, T., Pirhonen, J. und Julkunen, I. (1992). Differential inactivation of interferons by a protease from human granulocytes. *J Interferon Res* 12, 177-183.

Chalabi, S., Easton, R. L., Patankar, M. S., Lattanzio, F. A., Morrison, J. C., Panico, M., Morris, H. R., Dell, A. und Clark, G. F. (2002). The Expression of Free Oligosaccharides in Human Seminal Plasma. *J Biol Chem* 277, 32562-32570.

Chavira, R., Burnett, T. J. und Hageman, J. H. (1984). Assaying proteinases with azocoll. *Anal Biochem* 136, 446-450.

Cline, J. (1996). PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 24, 3546-3551.

Condreay, J. P., Witherspoon, S. M., Clay, W. C. und Kost, T. A. (1999). Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 127-132.

Conradt, H. S., Grabenhorst, E. und Nimtz, M. (1996). Protein-linked Oligosaccharides: The Structural Variety of Natural Glycoproteins Requires the Construction of Novel Cell Factories for the Biotechnological Production of Improved Recombinant Human Therapeutics. In: Scientific Annual Report, GBF Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH Braunschweig, 5-24.

Cossu, G. und Boitani, C. (1984). Lactosaminoglycans synthesized by mouse male germ cells are fucosylated by an epididymal fucosyltransferase. *Dev Biol* 102, 402-408.

Deschuyteneer, M., Eckhardt, A., Roth, J. und Hill, R. L. (1988). The subcellular localization of apomucin and nonreducing terminal N-acetylgalactosamine in porcine submaxillary glands. *J Biol Chem* 263, 2452-2459.

Diekmann, A. B., WestbrookCase, V. A., Naaby Hansen, S., Klotz, K. L., Flickinger, C. J. und Herr, J. C. (1997). Biochemical characterization of sperm agglutinating antigen-1, a human sperm surface antigen implicated in gamete interactions. *Biol Reprod* 57, 1136-1144.

Diekman, A. B., Norton, E. J., Klotz, K. L., Westbrook, V. A., Shibahara, H., Naaby-Hansen, S., Flickinger, C. J. und Herr, J. C. (1999a). N-linked glycan of sperm CD52 glycoform associated with human infertility. *FASEB J* 13, 1303-1313.

Diekman, A. B., Norton, E. J., Klotz, K. L., Westbrook, V. A. und Herr, J. C. (1999b). Evidence for a unique N-linked glycan associated with human infertility on sperm CD52: a candidate contraceptive vaccinogen. *Immunol Rev* 171, 203-212.

Diekman, A. B., Norton, E. J., Westbrook, V. A., Klotz, K. A., Naaby-Hansen, S und Herr, J. C. (2000). Anti-Sperm Antibodies from Infertile Patients and their Cognate Sperm Antigens: A Review. Identity Between SAGA-1, the H6-3C4 Antigen, and CD52. *Am J Reprod Immunol* 43, 134-143.

Dupuy, F., Germot, A., Marends, M., Oriol, R., Blancher, A., Julien, R. und Maftah, A. (2002). Alpha1,4-fucosyltransferase activity: a significant function in the primate lineage has appeared twice independently. *Mol Biol Evol* 19, 815-824.

Edge, C. J., Rademacher, T. W., Wormald, M. R., Parekh, R. B., Butters, T. D., Wing, D. R. und Dwek, R. A. (1992). Fast sequencing of oligosaccharides: the reagent-array analysis method. *Proc Nat Acad Sci USA* 89, 6638-6642.

Eisenhaber, B., Bork, P. und Eisenhaber, F. (1998). Sequence properties of GPI-anchored proteins near the ω -site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein Eng* 11, 1155-1161.

Field, M. C. und Wainwright, L. J. (1995). Molecular cloning of eukaryotic glycoprotein and glycolipid glycosyltransferases: a survey. *Glycobiology* 5, 463-472.

Gersten, K. M., Natsuka, S., Trinchera, M., Petryniak, B., Kelly, R. J., Hiraiwa, N., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G. und Lowe, J. B. (1995). Molecular cloning, expression, chromosomal assignment, and tissue-specific expression of a murine alpha-(1,3)-fucosyltransferase locus corresponding to the human ELAM-1 ligand fucosyltransferase. *J Biol Chem* 270, 25047-25056.

Goelz, S. E., Hession, C., Goff, D., Griffiths, B., Tizard, R., Newman, B., Chi-Rosso, G. und Lobb, R. (1990). ELFT: A Gene That Directs the Expression of an ELAM-1 Ligand. *Cell* 63, 1349-1356.

Goldwasser, E., Kung, C. K. H. und Eliason, J. (1974). On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. XIII The role of sialic acid in erythropoietin action. *J Biol Chem* 249, 4202-4206.

Goochee, C. F., Gramer, M. J., Anderson, D. C., Bahr, J. B. und Rasmussen, J. R. (1991). The Oligosaccharides of Glycoproteins: Bioprocess Factors affecting Oligosaccharide Structure and their Effect on Glycoprotein Properties. *Biotechnology* 9, 1347-1355.

Gorman, C. M. und Howard, B. H. (1983). Expression of recombinant plasmids in mammalian cells is enhanced by sodium butyrate. *Nucleic Acids Res* 11, 7631-7648.

Grabenhorst, E., Hofer, B., Nimtz, M., Jager, V. und Conradt, H. S. (1993). Biosynthesis and secretion of human interleukin-2 glycoprotein variants from baculovirus-infected sf21 cells – characterization of polypeptides and posttranslational modifications. *Eur J Biochem* 215, 189-197.

Grabenhorst, E., Nimtz, M., Costa, J. und Conradt, H. S. (1998). *In Vivo* Specificity of Human α 1,3/4-Fucosyltransferases III-VII in the Biosynthesis of Lewis^x and Sialyl Lewis^x Motifs on Complex-type N-Glycans. *J Biol Chem* 273, 30985-30994.

Grabenhorst, E., Schlenke, P., Pohl, S. Nimtz, M. und Conradt, H. S. (1999). Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells. *Glycoconj J* 16, 81-97.

Haberhausen, G. (1998) Polymerase-Kettenreaktion. In: Bioanalytik, 1. Auflage, Lottspeich, F. und Zorbach, H. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 673-703.

Hale, G., Dyer, M. S., Clark, M. R., Phillips, J. M., Marcus, R., Riechmann, L., Winter, G. und Waldmann, H (1988). Remission induction in non-Hodgkin lymphoma with reshaped human monoclonal antibody. *Lancet* 2, 1394-1399.

Hale, G., Rye, P. D., Warford, A., Lauder, I. und Brito-Babapulle, A. (1993). The glycosylphosphatidylinositol-anchored lymphocyte antigen CDw52 is associated with the epididymal maturation of human spermatozoa. *J Reprod Immunol* 23,189-205.

Hale, G. (1995). Synthetic peptide mimotope of the CAMPATH-1 (CD52) antigen, a small glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein. *Immunotechnology* 1, 175-187.

Hale, C., Bartholomew, M., Taylor, V., Stables, J., Topley, P. und Tite, J. (1996). Recognition of CD52 allelic gene products by CAMPATH-1H antibodies. *Immunology* 88, 183-190.

Hale, G. (2001). CD52 (CAMPATH-1). *J Biol Regul Homeos Agents* 15, 386-391.

Hamadeh, R. M., Jarvis, G. A., Galili, U., Mandrell, R. E., Zhou, P. und Griffiss, J. M. (1992). Human natural anti-Gal IgG regulates alternative complement pathway activation on bacterial surfaces. *J Clin Invest* 89, 1223-1235.

Hersovics, A. O. und Orlean, P. (1993). Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J* 7, 540-550.

Hod, Y. (1992). A simplified ribonuclease protection assay. *Biotechniques* 13, 852-854.

Ignatz, G. G., Lo, M. C., Perez, C. L., Gwathmey, T. Y. M. und Suarez, S. S. (2001). Characterization of a Fucose-Binding Protein from Bull Sperm and Seminal Plasma That May Be Responsible for Formation of the Oviductal Sperm Reservoir. *Biol Reprod* 64, 1806-1811.

Imai, N., Higuchi, M., Kawamura, A., Tomonoh, K., Oh-Eda, M., Fujiwara, M., Shimonaka, Y. und Ochi, N. (1990). Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin. Suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin in vitro. *Eur J Biochem* 194, 457-462.

Isojima, S., Kameda, K., Tsuji, Y., Shigeta, M., Ikeda, Y. und Koyama, K. (1987). Establishment and characterization of human hybridoma secreting monoclonal antibody with high titers of sperm immobilizing and agglutinating activity against human seminal plasma. *J Reprod Immunol* 10, 67-78.

James, L. C., Hale, G., Waldman, H. und Bloomer, A. C. (1999). 1.9 A Structure of the Therapeutic Antibody CAMPATH-1H Fab in Complex with a Synthetic Peptide Antigen. *J Mol Biol* 289, 293-301.

Jenkins, N. und Curling, M. A. (1994). Glycosylation of recombinant proteins: Problems and prospects. *Enzyme Microb Technol* 16, 354-364.

Jenkins, N., Parekh, R. B. und James, D. C. (1996). Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry. *Nat Biotechnol* 14, 975-981.

Johnston, D. S., Wright, W. W., Shaper, J. H., Hokke, C. H., Van den Eijnden, D. H. und Joziase, D. H. (1998). Murine sperm-zona binding, a fucosyl residue is required for a high affinity sperm-binding ligand. A second site on sperm binds a nonfucosylated, beta-galactosyl-capped oligosaccharide. *J Biol Chem* 273, 1888-1895.

Joziase, D. H., Shaper, J. H., Jabs, E. W. und Shaper, N. L. (1991). Characterization on an α 1-3-galactosyltransferase homologue on human chromosome 12 that is organized as a processed pseudogene. *J Biol Cem* 266, 6991-6998.

Jurk, M. (1998) Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren. In: *Bioanalytik*, 1. Auflage, Lottspeich, F. und Zorbas, H. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 571-592.

Kalsner, I., Schneider, F. J., Geyer, R., Ahorn, H. und Maurerfogy, I. (1992). Comparison of the carbohydrate moieties of recombinant soluble Fc-epsilon receptor (sFc-ε-RII/scd23) expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and chinese hamster ovary cells – different O-glycosylation sites are used by yeast and mammalian cells. *Glycoconj J* 9, 209-216.

Kaneko,M., Kudo,T., Iwasaki,H., Ikehara,Y., Nishihara,S., Nakagawa,S., Sasaki,K., Shiina,T., Inoko,H., Saitou,N. und Narimatsu,H. (1999). Alpha1,3-fucosyltransferase IX (Fuc-TIX) is very highly conserved between human and mouse; molecular cloning, characterization and tissue distribution of human Fuc-TIX. *FEBS Lett* 452, 237-242.

Kirchhoff, C. (1996). CD52 is the “major maturation associated“ sperm membrane antigen. *Mol Hum Reprod* 2, 9-17.

Kirchhoff, C., Krull, N., Pera, I. und Ivell, R. (1993). A Major mRNA of the Human Epididymal Principal Cells, HE5, Encodes the Leucocyte Differentiation CDw52 Antigen Peptide Backbone. *Mol Reprod Dev* 34, 8-15.

Kirchhoff, C. und Hale, G. (1996). Cell-to-Cell transfer of glycosylphosphatidyl-anchored membrane proteins during sperm maturation. *Mol Hum Reprod* 2, 177-184.

Kirchhoff, C. und Schröter, S. (2001). New Insights into the Origin, Structure and Role of CD52: A Major Component of the Mammalian Sperm Glycocalyx. *Cells Tissues Organs* 168, 93-104.

Kleene, R. und Berger, E. G. (1993). The molecular and cell biology of glycosyltransferases. *Biochim Biophys Acta* 1154, 283-325.

Kobata, A. (1979). Use of endo- and exoglycosidases for structural studies on glycoconjugates. *Anal Biochem* 100, 1-14.

Kobata, A. (1992). Structures and function of the sugar chains of glycoproteins. *Eur J Biochem* 209, 483-501.

Kornfeld, R. und Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54, 631-664.

Koszdin, K. L. und 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.

Kudo, T., Ikehara, Y., Togayachi, A., Morozumi, K., Watanabe, M., Nakamura, M., Nishihara, S., Narimatsu, H. (1998). Up-regulation of a Set of Glycosyltransferase Genes in Human Colorectal Cancer. *Lab Invest* 78, 797-811.

Kukowska-Latallo, J. F., Larsen, R. D., Nair, R. P. und Lowe, J. B. (1990). A cloned human cDNA determines expression of a mouse stage-specific embryonic antigen and the Lewis blood group alpha(1,3/1,4)fucosyltransferase. *Genes Dev* 4, 1288-1303.

Kumar, R., Potvin, B., Muller, W. A. und Stanley, P. (1991). Cloning of a human alpha(1,3)fucosyltransferase gene that encodes ELFT but does not confer ELAM-1 recognition on Chinese hamster ovary cell transfectants. *J Biol Chem* 266, 21777-21783.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Langer, B. G., Weisel, J. W., Dinauer, P. A., Nagaswami, C. und Bell, W. R. (1988). Deglycosylation of fibrinogen accelerates polymerization and increases lateral aggregation of fibrin fibers. *J Biol Chem* 263, 15056-15063.

Letourneur, O., Sechi, S., Willettebrown, J., Robertson, M. W. und Kinet, J. P. (1995). Glycosylation of human truncated Fc-epsilon-RI α -chain is necessary for efficient folding in the endoplasmatic reticulcum. *J Biol Chem* 270, 8249-8256.

Liu, D. T.-Y. (1992). Glycoprotein pharmaceuticals: scientific and regulatory considerations , and the US Orphan Drug Act. *Trends Biotechnol* 10, 114-120.

Liu, W. und Saint, D. A. (2002). A New Quantitative Method of Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay Based on Simulation of Polymerase Chain Reaction Kinetics. *Anal Biochem* 302, 52-59.

Lowe, J. B., Kukowska-Latallo, J. F., Nair, R. P., Larsen, R. D., Marks, R. M., Macher, B. A., Kelly, R. J. und 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.

Mahoney, M. C., Fulgham, D. L., Blackmore, P. F. und Alexander, N. J. (1991). Evaluation of human sperm-zona pellucida tight binding by presence of monoclonal antibodies to sperm antigens. *J Reprod Immunol* 19, 269-285.

Mas, E., Pasqualani, E., Caillol, N., Battari, A. E., Crotte, C., Lombardo, D. und Sadoulet, M.-O. (1998). Fucosyltransferase activities in human pancreatic tissue: comparative study between cancer tissues and established tumoral cell lines. *Glycobiology* 8, 605-613.

McCauley, T. C., Kurth, B. E., Norton, E. J., Klotz, K. L., Westbrook, V. A., Rao, A. J., Herr, J. C. und Diekman, A. B. (2002). Analysis of a Human Sperm CD52 Glycoform in Primates: Identification of an Animal Model for Immunocontraceptive Vaccine Development. *Biol Reprod* 66, 1681-1688.

McEver, R. P., Moore, K. L. und Cummings, R. D. (1995). Leukocyte Trafficking Mediated by Selectin-Carbohydrate Interactions. *J Biol Chem* 270, 11025-11028.

Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K. und Green, M. R. (1984). Efficient *in vitro* synthesis of biologically intact RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promotor. *Nucleic Acids Res* 12, 7035-7056.

Miletich, J. P. und Broze, G. J. (1990). β Protein C is not glycosylated at asparagine 329. *J Biol Chem* 265, 11397-11404.

Monroe, R. S. und Huber, B. E. (1994). The major form of the murine asialoglycoprotein receptor – cDNA sequence and expression in liver, testis and epididymis. *Gene* 148, 237-244.

-
- Moore, D., White, T. W. und Ensrud, K. M. (1989). The major maturation associated glycoprotein on rat cauda epididymal sperm surface is linked to the membrane via phosphatidylinositol. *Biochem Biophys Res Comm* 160, 460-468.
- Mülhardt, C. (1999) *Der Experimentator: Molekularbiologie*, 1.Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, 67-68.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 55, 335-350.
- Murray, B. M., Wittmann, V., Burkart, M. D., Hung, S.-H. und Wong, C.-H. (1997). Mechanism of Human α 1-3-Fucosyltransferase V: Glycosidic Cleavage Occurs Prior to Nucleophilic Attack. *Biochemistry* 36, 823-831.
- Naaby-Hansen, S., Flickinger, C. J. und Herr, J. C. (1997). Two-Dimensional Gel Electrophoretic Analysis of Vectorially Labeled Surface Proteins on Human Spermatozoa. *Biol Reprod* 56, 771-787.
- Nishihara, S., Iwasaki, H., Kaneko, M., Tawada, A., Ito, M. und Narimatsu, H. (1999). α 1,3-Fucosyltransferase 9 (FUT9; Fuc-TIX) preferentially fucosylates the distal GlcNAc residue of polyglucosamine chain while the other four α 1-3FUT members preferentially fucosylate the inner GlcNAc residue. *FEBS Lett* 462, 289-294.
- O'Farrell, P. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007-4021.
- Oulmouden, A., Wierinckx, A., Petit, J.-M., Costache, M., Palcic, M. M., Mollicone, R., Oriol, R. und Julien, R. (1997). Molecular Cloning and Expression of a Bovine α (1,3)-Fucosyltransferase Gene Homologous to a Putative Ancestor Gene of the Human *FUT3-FUT5-FUT6* Cluster. *J Biol Chem* 272, 8764-8773.
- Parker, R. M. und Barnes, N. M. (1999). mRNA: detection by *in situ* and northern hybridisation. *Methods Mol Biol* 106, 247-283.

Pritchard, C.C., Hsu, L., Delrow, J. und Nelson, P.S. (2001). Project normal: Defining normal variance in mouse gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 13266-13271.

Ram, P. A., Cardullo, R. A. und Milette, C. F. (1989). Expression and topographical localization of cell surface fucosyltransferase activity during epididymal sperm maturation in the mouse. *Gamete Res* 22, 321-332.

Ravn V. und Dabelsteen, E. (2000). Tissue distribution of histo-blood group antigens. *APMIS* 108, 1-28.

Reguigne-Arnould, I., Couillin, P., Mollicone, R., Faure, S., Fletcher, A., Kelly, R. J., Lowe, J. B. und Oriol, R. (1995). Relative positions of two clusters of human alpha-L-fucosyltransferases in 19q (FUT1-FUT2) and 19p (FUT6-FUT3-FUT5) within the microsatellite genetic map of chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet* 71, 158-162.

Ronin, C. (1998). Remodeling of Glycoprotein and Carbohydrate Antigens. *Clin Chem Lab Med* 36, 373-378.

Rychlik, W., Spencer, W. J. und Rhoads, R.E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research*, 18, 6409-6412 und Erratum: *Nucleic Acids Res* 19, 698.

Sacomanno, C. F., Bordonaro, M., Chen, J. S. und Nordstrom, J. L. (1992). A faster ribonuclease protection assay. *Biotechniques* 13, 846-850.

Saiki, R. K., Scharf, F., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.

Saiki, R. K., Gelford, D. H. Stoeffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467.

Sasaki, K., Kurata, K., Funayama, K., Nagata, M., Watanabe, E., Ohta, S., Hanai, N. und Nishi, T. (1994). Expression cloning of a novel alpha 1,3-fucosyltransferase that is involved in biosynthesis of the sialyl Lewis x carbohydrate determinants in leukocytes. *J Biol Chem* 269, 14730-14737.

Schnyder-Candrian, S., Borsig, L., Moser, R. und Berger, E.G. (1999). Localization of α 1-3-fucosyltransferase VI in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 8369-8374.

Schröter, S., Derr, P., Conradt, H. S., Nimtz, M., Hale, G. und Kirchhoff, C. (1999). Male-specific Modification of Human CD52. *J Biol Chem* 274, 29862-29873.

Scudder, P. R., Shailubhai, K., Duffin, K. L., Streeter, P. R., Jacob und G. S. (1994). Enzymatic synthesis of a 6'-sulphated sialyl-Lewisx which is an inhibitor of L-selectin binding to peripheral addressin. *Glycobiology* 4, 929-933.

Seppälä, M., Taylor, R. N., Koistinen, H., Koistinen, R. und Milgrom, E. (2002). Glycodelin: A Major Lipocalin Protein of the Reproductive Axis with Diverse Actions in Cell Recognition and Differentiation. *Endocr Rev* 23, 401-430.

Shetty, J., Diekman, A. B., Jayes, F. C. L., Sherman, N. E., Naaby-Hansen, S., Flickinger, C. J. und Herr, J. C. (2001). Differential extraction and enrichment of human sperm surface proteins in a proteome: Identification of immunocontraceptive candidates. *Electrophoresis* 22, 3053-3066.

Shibahara, H., Sato, I., Shetty, J., Naaby-Hansen, S., Herr, J. C., Wakimoto, E. und Koyama, K. (2002). Two-dimensional electrophoretic analysis of sperm antigens recognized by sperm immobilizing antibodies detected in infertile women. *J Reprod Immunol* 53, 1-12.

Spiess, A.-N. und Ivell, R. (2002). A Highly Efficient Method for Long-Chain cDNA Synthesis Using Trehalose and Betaine. *Anal Biochem* 301, 168-174.

Tarentino, A. L., Gomez, C. M. und Plummer, T. H. (1985). Deglycosylation of Asparagine-Linked Glycans by Peptide:N-Glycosidase F. *Biochemistry* 24, 4665-4671.

Treumann, A., Lively, M. R., Schneider, P. und Ferguson, M. A. J. (1995). Primary Structure of CD52. *J Biol Chem* 270, 1-12.

Tsuji, Y., Clausen, H., Nudelman, E., Kaizu, T., Hakomori, S. und Isojima, S. (1988). Human sperm carbohydrate antigens defined by an anti-sperm human monoclonal antibody derived from an infertile woman bearing anti-sperm antibodies in her serum. *J Exp Med* 168, 343-356.

Tulsiani, D. R., Skudlarek, M. D., Holland, M. K. und Orgebin-Crist, M. C. (1993). Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biol Reprod* 48, 417-428.

Tulsiani, D. R., Orgebin-Crist, M.-C. und Skudlarek, M. D. (1998). Role of luminal fluid glycosyltransferases and glycosidases in the modification of rat sperm plasma membrane glycoproteins during epididymal maturation. *J Reprod Fertil Suppl* 53, 85-97.

Vandekerckhove, J. und Weber, K. (1978). Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 1106-1110.

Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3, 97-130.

de Vries, T., Srnka, C. A., Palcic, M. M., Swiedler, S. J., van den Eijnden, D. H. und Macher, B. A. (1995). Acceptor Specificity of Different Length Constructs of Human Recombinant α 1,3/4-Fucosyltransferases. *J Biol Chem* 270, 8712-8722.

de Vries, T., Palcic, M. P., Schoenmakers, P. S., van den Eijnden, D. H. und Joziase, D. H. (1997). Acceptor specificity of GDP-Fuc:Gal β 1-4GlcNAc-R α 3-fucosyltransferase VI (FucT VI) expressed in insect cells as soluble, secreted enzyme. *Glycobiology* 7, 921-927.

Walter, E. I., Ratnoff, W. D., Long, K. E., Kazura, J. W. und Medof, M. E. (1992). Effect of glycoinositolphospholipid anchor lipid groups on functional properties of decay-accelerating factor protein in cells. *J Biol Chem* 267, 1245-1252.

Wassarman, P. M. (1988). Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem* 57, 415-442.

Wassarman, P. M. (1992). Mouse gamete adhesion molecules. *Biol Reprod* 46, 186-191.

Weiner, M. P., Costa, G. L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E. und Bauer, J. C. (1994). Site-directed mutagenesis of doublestranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* 51, 119-123.

Weis, J. H., Tan, S. S., Martin, B. K. und Wittwer, C. T. (1992) Detection of rare mRNAs via quantitative PCR. *Trends Genet* 8, 263-264.

Weston, B. W., Nair, R. P., Larsen, R. D. und Lowe, J. B. (1992). Isolation of a novel human alpha (1,3)fucosyltransferase gene and molecular comparison to the human Lewis blood group alpha (1,3/1,4)fucosyltransferase gene. Syntenic, homologous, nonallelic genes encoding enzymes with distinct acceptor substrate specificities. *J Biol Chem* 267, 4152-4160.

Wierinckx, A., Mercier, D., Oulmouden, A., Petit, J.-M. und Julien, R. (1999). Complete Genomic Organization of *futb* Encoding a Bovine α 3-Fucosyltransferase: Exons in Human Orthologous Genes Emerged from Ancestral Intronic Sequences. *Mol Biol Evol* 16, 1535-1547.

Wittwer, A. J. und Howard, S. C. (1990). Glycosylation at Asn-184 inhibits the conversion of single-chain to two-chain tissue-type plasminogen activator by plasmin. *Biochemistry* 29, 4175-4180.

Xia, M. Q., Tone, M., Packman, L., Hale, G. und Waldmann, H. (1991). Characterization of the CAMPATH-1 (CDw52) antigen: biochemical analysis und cDNA cloning reveal an unusually small peptide backbone. *Eur J Immunol* 21, 1677-1684.

Yamaguchi, K., Akai, K., Kawanishi, G., Ueda, M., Masuda, S. und Sasaki, R. (1991). Effects of site-directed removal of N-glycosylation sites in human erythropoietin on its production and biological properties. *J Biol Chem* 266, 20434-20439.

9.1 Vektorkarte pCR3.1Uni

Die folgende Abbildung 9.1 zeigt die Vektorkarte des eukaryotischen Expressionsvektors pCR3.1 Uni (Invitrogen, Groningen, Niederlande), der für die rekombinante Expression des HE5/CD52 benutzt wurde. Die Abbildung ist der Gebrauchsanweisung des Herstellers entnommen.

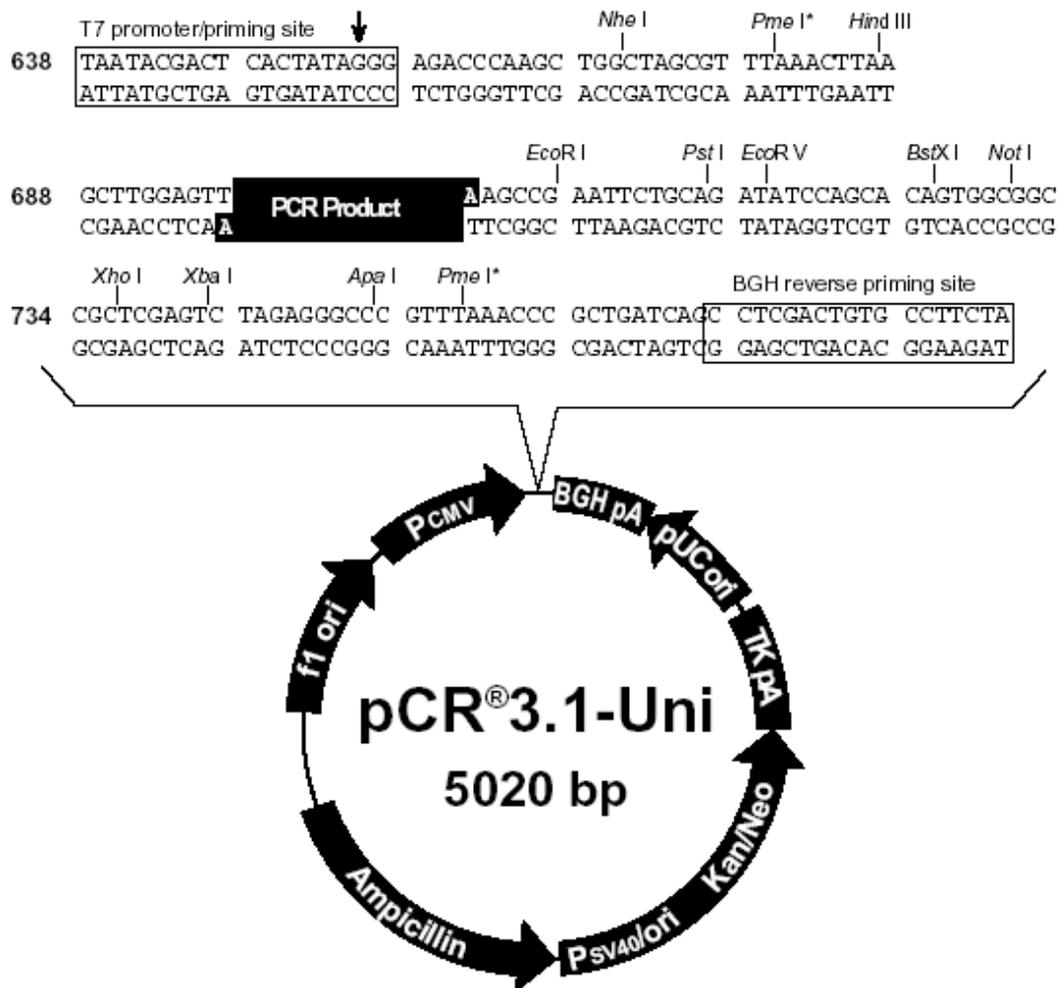


Abb. 9.1 Vektorkarte des eukaryotischen Expressionsvektors pCR3.1Uni

9.2 Tabellen zu den Häufigkeitsverteilungen der α 1-3-Fucosyltransferase-RNAs

Im Folgenden sind die Tabellen zu den Grafiken aus dem Ergebnisteil präsentiert, in denen die Häufigkeit der α 1-3-Fucosyltransferase mRNAs in den untersuchten Proben gezeigt ist. Das Symbol in der linken oberen Ecke (#) verweist auf die Grafik im Ergebnisteil. **m (cDNA) [ag]** zeigt den in der Probe gemessenen Durchschnittswert, **SD (m) [ag]** die zugehörige Standardabweichung. **Anteil [%]** zeigt mengenmäßig den Anteil (Teilchenzahl) der jeweiligen α 1-3-Fucosyltransferase-mRNA, wenn man die Summe der α 1-3-Fucosyltransferase-mRNAs als 100 % definiert. **SD (Anteil) [%]** gibt die zugehörige Standardabweichung an. **Anteil (Actin) [%]** zeigt den prozentualen Anteil der Transkript-Anzahl bezogen auf Actin an mit der zugehörigen Standardabweichung **SD (Anteil, Actin) [%]**. **Anzahl in 2.5 μ g** gibt die Anzahl an Transkripten in 2.5 μ g RNA an, wenn man die cDNA-Synthese als mit 100% Effizienz verlaufend ansieht. **SD (Anzahl)** gibt die zugehörige Standardabweichung an. **m (gen. Kont.) [ag]** zeigt die durch Einfachmessung (daher gibt es hier keine Standardabweichung) erhaltene genomische Kontamination an.

In #2 und #3 sind aufgrund begrenzter cDNA-Mengen nur Einfachmessungen möglich gewesen, sodass hier Angaben zur Standardabweichung fehlen.

#1	Actin	FUT 3	FUT 4	FUT 5	FUT 6	FUT 7	FUT 9
m (cDNA) [ag]	32470.00	32.96	107.64	48.92	1115.50	46.46	3.21
SD (m) [ag]	5532.00	0.99	16.36	7.65	142.75	9.16	3.23
Anteil [%]		2.41	8.42	3.37	82.59	2.97	0.23
SD (Anteil) [%]		0.07	1.28	0.53	10.57	0.59	0.24
Anteil (Actin) [%]		0.10	0.37	0.15	3.59	0.13	0.01
SD (Anteil, Actin) [%]		0.00	0.06	0.02	0.46	0.03	0.01
Anzahl in 2.5 μg	6896741.29	7235.03	25254.43	10119.51	247660.41	8905.04	704.08
SD (Anzahl)	1175016.10	217.97	3839.08	1581.60	31692.98	1755.71	709.13
m (gen. Kont.) [ag]							

#2	Actin	FUT 3	FUT 4	FUT 5	FUT 6	FUT 7	FUT 9
m (cDNA) [ag]	10.62	1.82	16.00	4.11	1484.00	229.00	0.05
SD (m) [ag]							
Anteil [%]		0.11	0.99	0.22	87.07	11.60	0.00
SD (Anteil) [%]							
Anteil (Actin) [%]		17.67	166.42	37.71	14606.12	1945.83	0.51
SD (Anteil, Actin) [%]							
Anzahl in 2.5 μg	2255.73	398.63	3753.91	850.60	329473.82	43892.69	11.48
SD (Anzahl)							
m (gen. Kont.) [ag]							

#3	Actin	FUT 3	FUT 4	FUT 5	FUT 6	FUT 7	FUT 9
m (cDNA) [ag]	283300	74.39	316.50	26.93	3586.00	59.88	6.78
SD (m) [ag]							
Anteil [%]		1.80	8.20	0.62	87.95	1.27	0.16
SD (Anteil) [%]							
Anteil (Actin) [%]		0.03	0.12	0.01	1.32	0.02	0.00
SD (Anteil, Actin) [%]							
Anzahl in 2.5 µg	60173908.40	16329.31	74257.05	5570.70	796154.40	11477.27	1487.17
SD (Anzahl)							
m (gen. Kont.) [ag]							

#4	Actin	FUT 3	FUT 4	FUT 5	FUT 6	FUT 7	FUT 9
m (cDNA) [ag]	144400	7.98	55.56	6.83	606.7	6.87	3.13
SD (m) [ag]	64570	0.68	17.59	1.01	58.61	0.60	0.38
Anteil [%]		1.15	8.53	0.92	88.09	0.86	0.45
SD (Anteil) [%]		0.10	2.70	0.14	8.51	0.08	0.05
Anteil (Actin) [%]		0.01	0.04	0.00	0.44	0.00	0.00
SD (Anteil, Actin) [%]		0.00	0.01	0.00	0.04	0.00	0.00
Anzahl in 2.5 µg	30671063.80	1752.56	13035.45	1412.64	134697.96	1317.16	686.74
SD (Anzahl)	13714893.30	150.08	4126.96	208.51	13012.44	115.50	83.25
m (gen. Kont.) [ag]	14.05	2.32	5.57	9.08	8.59	6.51	3.70

#5	Actin	FUT 3	FUT 4	FUT 5	FUT 6	FUT 7	FUT 9
m (cDNA) [ag]	284100	4.42	82.30	3.32	497.90	2.74	4.10
SD (m) [ag]	51460	1.20	47.84	1.30	127.50	0.85	1.45
Anteil [%]		0.73	14.53	0.52	83.16	0.39	0.68
SD (Anteil) [%]		0.20	8.44	0.20	21.29	0.12	0.24
Anteil (Actin) [%]		0.00	0.03	0.00	0.18	0.00	0.00
SD (Anteil, Actin) [%]		0.00	0.02	0.00	0.05	0.00	0.00
Anzahl in 2.5 µg	60343831.20	970.67	19309.18	685.94	110542.46	524.41	898.97
SD (Anzahl)	10930283.50	262.75	11224.19	269.33	28307.22	162.59	318.68
m (gen. Kont.) [ag]	7.53	0.96	2.00	4.32	1.37	4.65	9.54

#6	Actin	FUT 3	FUT 4	FUT 5	FUT 6	FUT 7	FUT 9
m (cDNA) [ag]	7.78	4.85	11.63	5.15	24.80	21.23	4.06
SD (m) [ag]	1.04	0.87	2.46	1.02	2.07	1.16	1.18
Anteil [%]		6.95	17.81	6.95	35.92	26.55	5.81
SD (Anteil) [%]		1.25	3.77	1.38	2.99	1.45	1.68
Anteil (Actin) [%]		64.46	165.16	64.51	333.18	246.30	53.93
SD (Anteil, Actin) [%]		11.62	34.97	12.82	27.76	13.48	15.61
Anzahl in 2.5 µg	1652.36	1065.13	2729.09	1065.87	5505.29	4069.82	891.07
SD (Anzahl)	221.75	192.07	577.90	211.84	458.68	222.75	257.88
m (gen. Kont.) [ag]	5.55	9.319	9.04	7.69	35.45	2.57	n.d.

#7	Actin	FUT 3	FUT 4	FUT 5	FUT 6	FUT 7	FUT 9
m (cDNA) [ag]	62.50	48.70	70.65	34.69	207.30	35.22	33.80
SD (m) [ag]	7.48	5.84	8.58	1.85	18.24	4.30	4.90
Anteil [%]		11.30	17.52	7.58	48.63	7.13	7.84
SD (Anteil) [%]		1.36	2.13	0.40	4.28	0.87	1.14
Anteil (Actin) [%]		80.53	124.86	54.05	346.67	50.84	55.88
SD (Anteil, Actin) [%]		9.66	15.17	2.88	30.50	6.20	8.10
Anzahl in 2.5 µg	13275.93	10690.84	16576.64	7175.23	46024.21	6750.02	7418.28
SD (Anzahl)	1588.98	1282.74	2014.10	382.36	4049.67	823.35	1075.43
m (gen. Kont.) [ag]	34.00	42.82	39.99	8.37	174.20	13.64	7.60

#8	Actin	FUT 3	FUT 4	FUT 5	FUT 6	FUT 7	FUT 9
m (cDNA) [ag]	491.00	24.63	65.61	18.70	104.24	10.62	6.09
SD (m) [ag]	24.69	2.40	72.18	2.63	8.72	2.32	1.65
Anteil [%]		10.56	30.08	7.56	45.21	3.98	2.61
SD (Anteil) [%]		1.03	33.09	1.06	3.78	0.87	0.71
Anteil (Actin) [%]		5.18	14.76	3.71	22.19	1.95	1.28
SD (Anteil, Actin) [%]		0.51	16.24	0.52	1.86	0.43	0.35
Anzahl in 2.5 µg	104290.11	5407.25	15393.38	3868.94	23142.35	2035.10	1335.95
SD (Anzahl)	5244.30	527.23	16935.20	543.26	1934.94	443.76	361.10
m (gen. Kont.) [ag]	15.61	17.64	17.95	17.10	42.49	8.87	6.44

#9	Actin	FUT 3	FUT 4	FUT 5	FUT 6	FUT 7	FUT 9
m (cDNA) [ag]	579.60	0.60	2.32	2.89	2021.00	4.28	0.35
SD (m) [ag]	170.50	0.41	0.47	1.04	522.30	1.31	0.34
Anteil [%]		0.03	0.12	0.13	99.52	0.18	0.02
SD (Anteil) [%]		0.02	0.02	0.05	25.72	0.06	0.02
Anteil (Actin) [%]		0.11	0.44	0.48	364.47	0.67	0.06
SD (Anteil, Actin) [%]		0.07	0.09	0.17	94.19	0.20	0.06
Anzahl in 2.5 µg	123109.06	132.69	544.08	596.79	448697.17	820.54	75.76
SD (Anzahl)	36214.79	90.44	110.81	214.31	115959.69	251.09	73.81
m (gen. Kont.) [ag]	0.00	0.38	1.30	2.30	20.50	5.45	0.88

#10	Actin	FUT 3	FUT 4	FUT 5	FUT 6	FUT 7	FUT 9
m (cDNA) [ag]	15410	0.15	2.20	5.64	104.40	5.62	0.16
SD (m) [ag]	2366	0.03	0.40	1.08	7.86	1.45	0.12
Anteil [%]		0.13	1.99	4.49	89.12	4.14	0.14
SD (Anteil) [%]		0.02	0.36	0.86	6.71	1.07	0.10
Anteil (Actin) [%]		0.00	0.02	0.05	0.71	0.03	0.00
SD (Anteil, Actin) [%]		0.00	0.00	0.01	0.05	0.01	0.00
Anzahl in 2.5 µg	3273137.77	32.66	517.10	1166.68	23178.62	1077.96	35.77
SD (Anzahl)	502546.66	6.43	94.86	224.03	1745.72	278.31	25.42
m (gen. Kont.) [ag]	3.64	0.01	1.56	2.81	19.69	5.66	0.05

#11	Actin	FUT 3	FUT 4	FUT 5	FUT 6	FUT 7	FUT 9
m (cDNA) [ag]	3.25	6.80	11.05	3.24	5.31	0.93	0.16
SD (m) [ag]	0.42	0.73	0.90	0.53	0.50	0.10	0.14
Anteil [%]		24.27	42.18	10.90	19.17	2.89	0.58
SD (Anteil) [%]		2.59	3.44	1.79	1.80	0.32	0.51
Anteil (Actin) [%]		215.87	375.18	96.93	170.54	25.70	5.18
SD (Anteil, Actin) [%]		23.04	30.56	15.89	15.98	2.83	4.53
Anzahl in 2.5 µg	691.02	1491.71	2592.54	669.81	1178.47	177.58	35.77
SD (Anzahl)	89.90	159.21	211.17	109.82	110.45	19.56	31.32
m (gen. Kont.) [ag]	1.25	5.808	9.36	2.62	4.28	0.42	n.d.

#12	Actin	FUT 3	FUT 4	FUT 5	FUT 6	FUT 7	FUT 9
m (cDNA) [ag]	232.33	41.14	116.73	44.63	48.59	23.48	33.33
SD (m) [ag]	13.30	2.39	6.60	3.73	8.45	2.32	0.69
Anteil [%]		13.23	40.13	13.53	15.80	6.59	10.72
SD (Anteil) [%]		0.77	2.27	1.13	2.75	0.65	0.22
Anteil (Actin) [%]		18.30	55.50	18.71	21.86	9.12	14.82
SD (Anteil, Actin) [%]		1.07	3.14	1.56	3.80	0.90	0.31
Anzahl in 2.5 µg	49348.41	9031.35	27387.91	9231.40	10787.09	4500.44	7315.13
SD (Anzahl)	2825.07	525.68	1547.48	771.23	1875.76	444.33	152.16
m (gen. Kont.) [ag]	76.74	56.79	126.1	0.00	8.39	24.40	2.07

#13	Actin	FUT 3	FUT 4	FUT 5	FUT 6	FUT 7	FUT 9
m (cDNA) [ag]	1115.00	6.92	17.20	0.00	621.73	13.03	0.03
SD (m) [ag]	26.66	0.86	1.54	0.00	30.44	0.73	0.02
Anteil [%]		1.03	0.09	0.00	94.48	1.71	0.00
SD (Anteil) [%]		0.13	2.76	0.00	4.63	0.10	0.00
Anteil (Actin) [%]		0.64	1.70	0.00	58.28	1.05	0.00
SD (Anteil, Actin) [%]		0.08	0.15	0.00	2.85	0.06	0.00
Anzahl in 2.5 µg		1518.05	4035.45	0.00	138035.62	2498.11	6.78
SD (Anzahl)		189.59	360.19	0.00	6757.52	140.59	4.39
m (gen. Kont.) [ag]	0.40	3.17	2.79	4.18	57.25	59.29	0

#14	Actin	FUT 3	FUT 4	FUT 5	FUT 6	FUT 7	FUT 9
m (cDNA) [ag]	192.97	1.66	1.51	0.00	118.67	6.65	0.89
SD (m) [ag]	36.85	0.38	0.81	0.00	13.70	0.61	1.44
Anteil [%]		1.28	1.24	0.00	92.34	4.47	0.68
SD (Anteil) [%]		0.30	0.67	0.00	10.66	0.41	1.11
Anteil (Actin) [%]		0.89	0.86	0.00	64.28	3.11	0.47
SD (Anteil, Actin) [%]		0.21	0.47	0.00	7.42	0.29	0.77
Anzahl in 2.5 µg	40986.79	364.31	353.77	0.00	26346.07	1274.29	194.26
SD (Anzahl)	7826.26	84.37	190.67	0.00	3041.91	116.98	317.08
m (gen. Kont.) [ag]	0.02	1.49	2.14	0.96	22.45	5.637	n.d.

#15	Actin	FUT 3	FUT 4	FUT 5	FUT 6	FUT 7	FUT 9
m (cDNA) [ag]	41000	31.56	38.14	10.41	27.16	8.80	2.28
SD (m) [ag]	4684	2.86	4.02	0.13	9.23	2.66	1.19
Anteil [%]		26.39	34.09	8.20	22.97	6.42	1.91
SD (Anteil) [%]		2.39	3.59	0.10	7.81	1.94	0.99
Anteil (Actin) [%]		0.08	0.10	0.02	0.07	0.02	0.01
SD (Anteil, Actin) [%]		0.01	0.01	0.00	0.02	0.01	0.00
Anzahl in 2.5 µg	8708543.05	6927.72	8948.38	2153.40	6029.99	1686.13	500.84
SD (Anzahl)	994897.94	627.80	942.70	26.23	2049.44	509.85	260.74
m (gen. Kont.) [ag]	45.52	9.29	1.53	7.44	10.84	17.06	3.24

#16	Actin	FUT 3	FUT 4	FUT 5	FUT 6	FUT 7	FUT 9
m (cDNA) [ag]	69590	3.60	9.12	0.01	47.71	3.58	0.37
SD (m) [ag]	13240	2.14	0.78	0.00	9.67	0.40	0.29
Anteil [%]		5.52	14.98	0.01	74.11	4.80	0.57
SD (Anteil) [%]		3.29	1.27	0.00	15.02	0.53	0.45
Anteil (Actin) [%]		0.01	0.01	0.00	0.07	0.00	0.00
SD (Anteil, Actin) [%]		0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
Anzahl in 2.5 µg	14781158.80	789.58	2140.67	2.65	10592.45	685.80	81.71
SD (Anzahl)	2812222.19	470.41	182.09	0.00	2147.35	75.77	63.80
m (gen. Kont.) [ag]	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

17	Actin	FUT 3	FUT 4	FUT 5	FUT 6	FUT 7	FUT 9
m (cDNA) [ag]	26.3	9.44	5.91	7.26	33.24	28.38	7.18
SD (m) [ag]	1.63	2.18	1.95	0.36	7.05	4.54	0.85
Anteil [%]		10.71	7.16	7.75	38.13	28.10	8.15
S#D (Anteil) [%]		2.47	2.36	0.38	8.08	4.49	0.96
Anteil (Actin) [%]		37.09	24.82	26.87	132.11	97.38	28.23
SD (Anteil, Actin) [%]		8.57	8.18	1.32	28.00	15.57	3.33
Anzahl in 2.5 µg	5586.21	2072.17	1386.60	1500.76	7379.86	5439.63	1576.71
SD (Anzahl)	345.37	478.53	456.80	73.75	1564.33	870.00	185.74
m (gen. Kont.) [ag]	20.87	6.00	3.782	4.823	16.14	21.08	3.82

#18	Actin	FUT 3	FUT 4	FUT 5	FUT 6	FUT 7	FUT 9
m (cDNA) [ag]	436.23	23.36	16.4	11.36	39.82	4.76	0.04
SD (m) [ag]	39.49	3.22	2.06	0.86	4.18	0.95	0.03
Anteil [%]		24.32	18.25	11.15	41.93	4.32	0.04
SD (Anteil) [%]		3.36	2.29	0.84	4.40	0.87	0.03
Anteil (Actin) [%]		5.53	4.15	2.54	9.54	0.98	0.01
SD (Anteil, Actin) [%]		0.76	0.52	0.19	1.00	0.20	0.01
Anzahl in 2.5 µg	92657.48	5127.74	3847.76	2350.60	8841.47	911.46	7.70
SD (Anzahl)	8387.02	707.77	482.55	176.95	928.03	182.70	6.94
m (gen. Kont.) [ag]	0.00	50.62	22.76	22.74	119.0	7.09	n.d.

#19	Actin	FUT 3	FUT 4	FUT 5	FUT 6	FUT 7	FUT 9
m (cDNA) [ag]	1.51	0.02	0.01	0.00	0.00	0.13	0.00
SD (m) [ag]	0.50	0.02	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00
Anteil [%]		13.42	5.21	0.00	0.00	81.37	0.00
SD (Anteil) [%]		12.00	0.00	0.00	0.00	65.30	0.00
Anteil (Actin) [%]		1.28	0.50	0.00	0.00	7.76	0.00
SD (Anteil, Actin) [%]		1.14	0.00	0.00	0.00	6.23	0.00
Anzahl in 2.5 µg	321.02	4.11	1.60	0.00	0.00	24.91	0.00
SD (Anzahl)	106.77	3.67	0.00	0.00	0.00	19.99	0.00
m (gen. Kont.) [ag]	0.00	0.69	0.07	0.18	0.53	0.08	0.00

#20	Actin	FUT 3	FUT 4	FUT 5	FUT 6	FUT 7	FUT 9
m (cDNA) [ag]	3728.67	38.16	12.02	38.09	489.20	23.82	0.12
SD (m) [ag]	218.66	5.84	3.01	10.58	11.21	0.97	0.11
Anteil [%]		6.33	2.13	5.96	82.11	3.45	0.02
SD (Anteil) [%]		0.97	0.53	1.65	1.88	0.14	0.02
Anteil (Actin) [%]		1.06	0.36	0.99	13.71	0.58	0.00
SD (Anteil, Actin) [%]		0.16	0.09	0.28	0.31	0.02	0.00
Anzahl in 2.5 µg	791981.81	8375.75	2819.97	7879.93	108610.91	4564.97	26.53
SD (Anzahl)	46444.21	1281.95	706.45	2189.00	2489.27	186.47	24.19
m (gen. Kont.) [ag]	1.472	2.017	0.2771	2.449	7.77	1.98	0.00

9.3 R/S-Sätze der verwendeten Chemikalien

Stoff	Gefahren- symbole	R-Sätze	S-Sätze
Acrylamid	T	45-46-E20/21-E25- 36/38-43- E48/23/24/25-62	53-45
Tris(hydroxymethyl)amino- methan (Tris)	X _i	36/38	-
Ammoniumpersulfat (APS)	O, X _n	8-22-36/37/38-42/43	22-24-26-37
Borsäure	-	-	-
Chloroform	X _n	22-38-40-48/20/22	36/37
1,4-Dithiothreit (DTT)	X _n	22-36/38	-
Etylendiamintetraacetat, Natriumsalz (EDTA)	X _i	36-52/53	61
Eisessig	C	10-35	23.2-26-45
Ethanol	F	11	7-16
Ethanolamin	X _n	20-36/37/38	-
Ethidiumbromid	T+	22-26-36/37/38-68	26-28.2-36/37-45
Formamid	T	61	53-45
Mercaptoethanol	T, N	22-24-34-51/53	26-36/37/39-45- 61
Methanol	F, T	11-23/24/25- 39/23/24/25	7-16-36/37-45
N,N-Methylenbisacrylamid	X _n	22	-
Natriumdodecylsulfat (SDS)	X _n	22-36/38	-
Phenantrolin	-	-	22-24/25
Phenylmethansulfonyl-fluorid (PMSF)	C	34	26-36/37/39-45
N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin (TEMED)	F, C	11-20/22-34	16-26-36/37/39- 45

Posterpräsentationen

ICS 2000

Hamburg, 27. August –1. September 2000

Recombinant expression of HE5/CD52, a major component of the human sperm glycocalyx

O. Nagel, S. Schröter, C. Kirchhoff

Glyco XVI

Den Haag, Niederlande, 19.-24. August 2001

Engineering of human sperm membrane antigen HE5/CD52 N-linked glycans

O. Nagel, C. Larisch, C. Kirchhoff

GlycoT2002

Djurönäset, Stockholm, Schweden, 19.-22. September 2002

$\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase expression in the human male genital tract

O. Nagel, C. Mesecke-von Rheinbaben, C. Kirchhoff

In Vorbereitung ist eine Veröffentlichung:

α 1-3-Fucosyltransferases of the Human Male Genital Tract – Quantitative mRNA Analysis and Cloning of Novel FUT6 Splice Variants

O. Nagel, C. Mesecke v. Rheinbaben, C. Kirchhoff

Danksagung

Bei Frau Prof. Dr. Christiane Kirchhoff möchte ich mich herzlich bedanken für das interessante Thema, das sie vertrauensvoll in meine chemischen Hände legte und für viele fachlich anregende und konstruktive Gespräche, die den biologischen Hintergrund für mich Chemiker klarer erscheinen ließen. Herzlichen Dank auch für die Möglichkeit, das Fucosyltransferase-Thema mit der neuen Methode der Echtzeit-RT-PCR mit Hilfe des LightCyclers anders als ursprünglich angedacht bearbeiten zu können.

Großer Dank gebührt auch Herrn Prof. Dr. Bernd Meyer für die gewissenhafte und motivierte Betreuung dieser externen Doktorarbeit sowie für die sehr freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe.

Herzlich gedankt sei Herrn Prof. Dr. Freimut Leidenberger für die Möglichkeit, an seinem Institut diese Doktorarbeit anfertigen zu können.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an die beiden Arbeitsgruppen von Frau Prof. Dr. Kirchhoff und Herrn Prof. Dr. Meyer für ein tolles Arbeitsklima und einen großen Wohlfühlfaktor.

Und ein sehr großes Dankeschön meinen Eltern und meinen Freunden, die immer für mich da waren, vielen Dank!

Lebenslauf

Olaf Nagel, geboren am 6.4.1970 in Hamburg

Adresse: Kieler Str. 231, 22525 Hamburg

Schulbildung:

1976 – 1980 Grundschule Reppenstedt

1980 – 1982 Orientierungsstufe Oedeme

1982 – 1987 Gymnasium Herderschule, Lüneburg

1987 – 1989 Gymnasium Oedeme

Mai 1989 Abitur

Zivildienst 1989 – 1990

Studium der Chemie sowie Teilnahme an Lehrveranstaltungen und Erwerb von Leistungsnachweisen in den Fächern Anglistik und Pädagogik:

April 1991 – Mai 1998

Mai 1998 Diplom der Chemie

September 1998 - Januar 1999 Sachbearbeiter für Eingangskontrollen im Labor des H.S.T. Hamburg Sugar Terminal GmbH & Co KG

Mai 1999 – Dezember 2002 externe Doktorarbeit am Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.