

Aus dem Institut für Anatomie II – Experimentelle Morphologie  
des Zentrums für Experimentelle Medizin  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
unter der Leitung von Prof. Dr. Udo Schumacher

**Korreliert die Expression bestimmter Glykosyltransferasen  
mit der spontanen Metastasierung humaner Tumorzellen im  
Xenograftmodel?**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Anna-Lena Farwick geb. Meyer

aus Lüneburg

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 16.05.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. I. Moll

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: -

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

β-ACT 1/2	β-Actin 1/2
bp	Base pairs
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CSLEX-1	Anti-Sialyl-Le <sub>x</sub> monoclonal antibody
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
Cp	Crossing point
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dsDNA	double stranded Desoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GCNT3	β-1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase 3, mucin type, Core2GlcNAcT-M, Core2GlcNAcT-II, C2/4GntM EC2.4.1.102
HPA	Helix pomatia agglutinin
ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
MRE	mittlere relative Expression
mRNA	Messenger-Ribonucleic Acid
MUC-1	erstmals geklontes Glykoprotein mit hohem Molekulargewicht und hohem Grad an Glykosylierung (O-Glykan)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PSGL-I	P-Selectin Glycoprotein Ligand I
RE	relative Expression
RNA	Ribonucleic Acid
RT	Reverse Transkriptase
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
ssDNA	single stranded Desoxyribonucleic Acid
ST3O	β-Galactosid-α-2,3-Sialyltransferase, alpha 2,3 St, ST3GalA1, SIAT 4a, ST3Gal I EC2.4.99.4
ST3N	N-acetyllactosaminid-α-2,3-sialyltransferase= ST3 Gal III EC2.4.99.6
ST6N	β-Galactosid-α-2,6-Sialyltransferase, ST6Gal-I, alpha 2,6- Sialyltransferase, ST6 Gal 1, EC2.4.99.1

sLe <sup>x</sup>	sialyl Lewis x, NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4Fuc $\alpha$ 1,3GlcNAc
sLe <sup>a</sup>	sialyl Lewis a, NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3Fuc $\alpha$ 1,4GlcNAc
T <sub>m</sub>	Melting Temperature (DNA-Fragment-spezifische Schmelztemperatur)

<b>1</b>	<b><i>Arbeitshypothese und Fragestellung</i></b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b><i>Einleitung</i></b>	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Tumormetastasierung</b>	<b>9</b>
<b>2.2</b>	<b>Glykoproteine auf der Zelloberfläche</b>	<b>9</b>
2.2.1	O-Glykane	10
<b>2.3</b>	<b>Lektine/Selektine</b>	<b>10</b>
2.3.1	Sialyl-Lewis x und a (sLe <sup>x/a</sup> )	11
2.3.2	Helix Pomatia Agglutinin	12
<b>2.4</b>	<b>Glykosyltransferasen</b>	<b>13</b>
2.4.1	$\beta$ -1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase 3, mucin type (GCNT3)	13
2.4.2	Sialyltransferasen	14
2.4.2.1	$\beta$ -Galactosid- $\alpha$ -2,3-Sialyltransferase (ST3O)	15
2.4.2.2	N-Acetylglucosaminid- $\alpha$ -2,3-Sialyltransferase (ST3N)	15
2.4.2.3	$\beta$ -Galactosid- $\alpha$ -2,6-Sialyltransferase (ST6N)	16
<b>3</b>	<b><i>Material und Methoden</i></b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>21</b>
3.1.1	Zellkultur	21
3.1.2	Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Tumore	21
3.1.3	Zellen in Agar	21
3.1.4	Mausblut	21
3.1.5	Primer	22
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>25</b>
3.2.1	RNA-Isolation	25
3.2.1.1	RNA-Isolation aus Zelllinien	25
3.2.1.2	RNA-Isolation aus in Paraffin eingebetteten Tumoren	25
3.2.1.3	RNA-Isolation aus Mausblut	26
3.2.1.4	Konzentrationsbestimmung isolierter RNA	26
3.2.2	cDNA-Synthese	27
3.2.2.1	cDNA-Synthese aus RNA der Kulturzellen	27
3.2.2.2	cDNA-Synthese aus RNA der in Paraffin eingebetteten Tumor	28
3.2.3	Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction	29
3.2.3.1	Light Cycler Instrument	30
3.2.3.2	Detektion der PCR-Produkte	31
3.2.3.3	PCR-Produktkontrolle mittels Schmelzkurvenanalyse	31
3.2.3.4	PCR-Produktkontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese	31
3.2.3.5	Relative Quantifizierung	32

3.2.3.6	Effizienzkorrektur	32
3.2.3.7	Standardkurvenerstellung mittels Semi-Nested-PCR	33
3.2.3.8	Normalisierung mittels Kalibrator	34
3.2.3.9	Optimierungsverfahren der real-time PCR	35
3.2.3.10	Touchdown-PCR	35
3.2.3.11	Einsatzmenge der cDNA-Proben	36
3.2.3.12	Reaktionsgemische	36
3.2.3.13	Herstellung des Master Mix	36
3.2.3.14	Light Cyclers Protokolle	37
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Darstellung der PCR-Produkte</b>	<b>39</b>
<b>4.2</b>	<b>Effizienzen der Primerpaare</b>	<b>41</b>
<b>4.3</b>	<b><math>\beta</math>-Actin als Referenzgen</b>	<b>42</b>
4.3.1	$\beta$ -Actin-1-Expression in kultivierten Zellen	42
4.3.2	$\beta$ -Actin-2-Expression im Xenografttumor	43
4.3.2.1	$\beta$ -Actin-2-Expression in murinen Zellen	43
<b>4.4</b>	<b>Expressionen der Glykosyltransferasen</b>	<b>45</b>
4.4.1	Expressionen der Glykosyltransferasen in vitro	46
4.4.1.1	GCNT3-Expression in kultivierten Zellen	47
4.4.1.2	ST3O-Expression in kultivierten Zellen	48
4.4.1.3	ST3N-Expression in kultivierten Zellen	48
4.4.1.4	ST6N-Expression in kultivierten Zellen	49
4.4.2	Expression der Glykosyltransferasen im Xenografttumor	50
4.4.2.1	GCNT3-Expression im Xenografttumor	51
4.4.2.2	ST3O-Expression im Xenografttumor	52
4.4.2.3	ST3N-Expression im Xenografttumor	52
4.4.2.4	ST6N-Expression im Xenografttumor	53
4.4.3	Expression der Glykosyltransferasen in vivo versus in vitro	53
4.4.3.1	GCNT3-Expression in vivo versus in vitro	54
4.4.3.2	ST3O-Expression in vivo versus in vitro	55
4.4.3.3	ST3N-Expression in vivo versus in vitro	56
4.4.3.4	ST6N-Expression in vivo versus in vitro	57
4.4.4	Vergleich der Expressionsverhältnisse der Kulturzellen zu in Paraffin eingebetteten Kulturzellen in Agar	59
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
<b>5.1</b>	<b>Xenografttumor und Real-Time-Quantitative-PCR</b>	<b>62</b>

<b>5.2</b>	<b>Vergleich der Genexpressionen in vitro und in vivo</b>	<b>63</b>
<b>5.3</b>	<b>Expression der Glykosyltransferasen</b>	<b>64</b>
5.3.1	$\beta$ -1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase 3, mucin type (GCNT3)	64
5.3.2	$\beta$ -Galactosid- $\alpha$ -2,3-Sialyltransferase (ST3O)	66
5.3.3	N-Acetylglucosaminid- $\alpha$ -2,3-Sialyltransferase (ST3N)	68
5.3.4	$\beta$ -Galactosid- $\alpha$ -2,6-Sialyltransferase (ST6N)	70
<b>5.4</b>	<b>Expression der Glykosyltransferasen im Melanom, Kolon- und Mammakarzinom</b>	<b>73</b>
5.4.1	Glykosyltransferasen im Kolonkarzinom	73
5.4.2	Glykosyltransferasen im Mammakarzinom	75
5.4.3	Glykosyltransferasen im malignem Melanom	77
<b>5.5</b>	<b>Synthese von HPA- und Selektin-Liganden durch Glykosyltransferasen</b>	<b>79</b>
<b>5.6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>100</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>101</b>

# 1 ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Hintergrund der Untersuchung ist ein schon in anderen Arbeiten beschriebener Zusammenhang zwischen von Glykosyltransferasen übertragenen Zuckerresten auf Zelloberflächen und dem Metastasierungsverhalten von Tumoren. Gegenstand dieser Arbeit soll die Analyse der Expression von Glykosyltransferasen in Tumorzelllinien sein. Da ein Zusammenhang zwischen dem Metastasierungsverhalten von Tumoren und deren Expression der Glykosyltransferasen dargestellt werden soll, wurden verschiedene metastasierende und nicht- bzw. weniger metastasierende Zelllinien aus unterschiedlichen Tumorgeweben ausgewählt. Durch den direkten Vergleich von Zellen aus der Zellkultur und aus in SCID-Mäusen herangezüchteten Xenografttumoren soll eine Aussage zur Vergleichbarkeit der Expression der Gene im soliden Tumor (in vivo) und unter künstlichen Bedingungen (in vitro) gemacht werden.

Es sollen zwölf verschiedene Zelllinien in Kultur und die aus ihnen gewachsenen Primärtumore in immundefizienten Mäusen auf ihre relative Expression folgender vier Glykosyltransferasen hin untersucht werden.

$\beta$ -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase 3 (GCNT3)

$\beta$ -Galactosid- $\alpha$ -2,3-Sialyltransferase (ST3O)

N-Acetyllactosaminid- $\alpha$ -2,3-Sialyltransferase (ST3N)

$\beta$ -Galactosid- $\alpha$ -2,6-Sialyltransferase (ST6N)

Diese Glykosyltransferasen wurden in der Literatur mit einer schlechten Prognose bei Patienten mit Tumorerkrankungen und/oder erhöhtem metastatischem Potential von Tumorzellen in Verbindung gebracht. Eine ähnliche Eigenschaft ist für das Lektin der Weinbergschnecke (*Helix Pomatia* Agglutinin) in der Literatur beschrieben. Eine vermehrte Bindung von *Helix Pomatia* Agglutinin an Tumorzellen ist mit einem schlechteren outcome für Patienten assoziiert. Es soll deshalb weiterhin versucht werden, einen Zusammenhang zwischen der Expression der Glykosyltransferasen in Tumorzellen und ihrem HPA-Bindungsvermögen herzustellen.

## **2 EINLEITUNG**

### **2.1 Tumormetastasierung**

Für einen malignen Tumor sind verschiedenste Mechanismen notwendig, um eine Metastase abzusiedeln:

- I. Er muss zu einer bestimmten Größe heranwachsen.
- II. Einzelne Zellen müssen in der Lage sein, sich aus dem Zellverband des Tumors zu lösen.
- III. Losgelöste Zellen müssen in Blutgefäße eindringen.
- IV. Einmal in ein Blutgefäß eingedrungen, muss die Tumorzelle das Signal und die Möglichkeit erhalten über die Blutgefäßwand an den Ort der Metastasenabsiedlung zu gelangen.

Ein wichtiger Faktor für das hämatogene Metastasierungspotential einer Tumorzelle ist die Adhäsionsfähigkeit an Endothelzellen der Blutgefäße (Hakomori 2002). Wie auch bei Leukozyten geschieht dies über die Expression von Liganden an der Zelloberfläche, welche an E- oder P-Selektine der Endothelzellen binden (Lowe 2002, Barthel et al. 2007). In dieser Arbeit soll der Blick im Besonderen auf die Schritte II und IV gerichtet werden. Dabei werden die Fragen nach Expressionsveränderungen bestimmter Glykosyltransferasen in metastasierenden Zellen und weniger metastasierenden Zellen sowie Zellen im Zellverband eines Tumors und losgelöst vom Verband im Kulturmedium gestellt.

### **2.2 Glykoproteine auf der Zelloberfläche**

Die Funktionen der Glykoproteine auf Zelloberflächen hängen von der Art ihrer Glykosylierung ab. Änderungen im Glykosylierungsmuster wurden während der Transformation einer Zelle in eine maligne Zelle beobachtet. Auch in der Metastasenbildung von Tumoren wurde mehrfach eine Änderung des Glykosylierungsmusters der Zelloberflächenmarker beschrieben (Saint-Guirons et al. 2007). Insgesamt steigen mit dem Invasions- und Metastasierungspotential einer malignen Zelle und dem Tumorgrad die Anzahl der  $\beta$ -1,6-Verzweigungen der

Oligosaccharide sowie die Anzahl der sialyl-Lewis x und a Epitope (sLe<sup>x</sup> und sLe<sup>a</sup>) auf der Zelloberfläche an (Fukuda 1996).

### **2.2.1 O-Glykane**

Ist ein Glykan mit dem N-Acetylgalactosaminrest mit einer o-glykosidischen Bindung an Serin oder Threonin an ein Polypeptid gebunden, so nennt man es O-Glykan. O-Glykane werden aufgrund ihrer Kernstruktur klassifiziert (Core1-Core4). Seit den 1980er Jahren wurden die Core1- und Core2-basierten O-Glykane ausgiebig untersucht. Die Expression von auf Core2-basierenden (d.h. vermehrt  $\beta$ -1,6-verzweigten) O-Glykanen beruht auf einer gesteigerten Expression von Core2- $\beta$ -1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase (im Folgenden GCNT3 genannt). Ein vermehrtes Vorkommen von verzweigten O-Glykanen scheint ein wichtiges Merkmal in der Differenzierung von Zellen zu sein. Zum Beispiel haben aktivierte Lymphozyten eine höhere GCNT3-Aktivität, was zu einer vermehrten Expression von Core2-basierten O-Glykanen führt. Des Weiteren ist die gesteigerte Expression  $\beta$ -1,6-verzweigter O-Glykane auf Tumorzellen mit höherer Malignität und höherem invasiven Potential assoziiert (siehe Review Fukuda 2002). Die Expression von GCNT3-mRNA in malignen Zellen wird in dieser Arbeit eingehend untersucht.

### **2.3 Lektine/Selektine**

Lektine sind Proteine oder Glykoproteine, welche sich an spezifische Kohlenhydratstrukturen binden. Eine besondere Rolle spielen eine Unterklasse der Lektine, die Selektine, welche als Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen fungieren, um Leukozyten, die entsprechende Selektin-Liganden auf der Oberfläche tragen, eine Auswanderung ins perivasale Gewebe zu ermöglichen (Snapp et al. 2001).

So werden auf aktivierten Endothelzellen vermehrt E- und P-Selektine exprimiert, um sialyl-Lewis x (im Folgenden sLe<sup>x</sup>) und sialyl-Lewis a (im Folgenden sLe<sup>a</sup>) tragende Leukozyten zu binden. Diesen Prozess benutzen ebenso metastatische Tumorzellen zur Auswanderung aus dem Gefäß ins umliegende Gewebe (Lowe 2002). So wurden sLe<sup>x</sup> und sLe<sup>a</sup> ebenfalls als Tumor-assoziierte Antigene identifiziert, welche auf malignen Zellen die gleiche Funktion wie bei Leukozyten besitzen (Hakomori 2002).

### 2.3.1 Sialyl-Lewis x und a (sLex/a)

SLe<sup>x/a</sup> sind Tetrasaccharide aus Galaktose, N-Acetylglucosamin, Fucose und Sialinsäure (Brooks et al. 2002). Wie oben beschrieben, gelten sie als Leukozyten- und Tumorassoziierte Antigene mit der Bindungsfähigkeit an Selektine. Sie können als „Anker“ angesehen werden, welcher den Zellen dazu dient ins extravasale Gewebe zu gelangen (Kannagi et al. 1997). SLe<sup>x/a</sup> kommen sowohl an N-, als auch an O-Glykane gebunden vor. SLe<sup>x</sup> zeigt eine besonders hohe Affinität zum P-Selektin, wenn es auf core2-basierten O-Glykanketten vorkommt (Lowe 2002, Leppänen et al. 2003).

Die Biosynthese von sLe<sup>x/a</sup> passiert in zwei Schritten. Zuerst findet eine  $\alpha$ -2,3-Sialylierung eines terminalen Galactosemoleküls eines Typ I (Gal $\beta$ 1 – 3GlcNAc) oder Typ II (Gal $\beta$ 1 – 4GlcNAc) Diasaccharids statt. Darauf folgt eine Fucosylierung des GlcNAc-Restes. Liegt eine  $\beta$ -1,3-Bindung vor, entsteht sLe<sup>x</sup>. Besteht eine  $\beta$ -1,4-Bindung, entsteht sLe<sup>a</sup> (Recchi et al. 1998).

SLe<sup>x/a</sup> sind weiterhin für die Krebsforschung so interessant, weil die Expression von diesen Epitopen auf Tumorzellen mit stark gesteigerter Malignität, Invasivität und erhöhtem Metastasierungspotential des Tumors einhergehen (Hakomori 2002, Kannagi 1997, Nakamori et al. 1993). Der mittlerweile vielfach zur Diagnostik von pankreatischen oder biliären Tumoren verwendete Tumormarker CA19-9 besteht aus einer Kohlenhydratstruktur, die das Antigen sLe<sup>a</sup> beinhaltet, und kommt vermehrt im Serum von Patienten mit diesen Tumoren vor (Goonetilleke et al. 2007). Carvalho et al. (2010) konnten mittels Durchflusszytometrie im Vergleich zu Magenkarzinomzellen vermehrt sLe<sup>x/a</sup> auf der auch hier untersuchten Zelllinie HT29 nachweisen.

Eine  $\alpha$ -2,3-Sialyltransferase, welche mit der Synthese von sLe<sup>x/a</sup> in Verbindung gebracht wurde, sowie das für die Entstehung der Core2-Struktur nötige Enzym GCNT3, auf denen sLe<sup>x/a</sup> vermehrt gefunden wurde, werden in dieser Arbeit untersucht. Unter Hypoxie wurde eine vermehrte sLe<sup>x/a</sup>-Expression auf Tumorzellen beobachtet, was bedeutet, dass diese durch Veränderungen in der Zellumgebung beeinflusst wird (Koike et al. 2004). In dieser Arbeit soll die Expression der oben genannten Glykosyltransferasen dementsprechend unter In-Vitro- und In-Vivo-Bedingungen untersucht werden.

### 2.3.2 Helix Pomatia Agglutinin

Das Helix Pomatia Agglutinin (HPA) ist ein Lektin aus der Weinbergschnecke, welches in der Vergangenheit histochemisch als prognostischer Marker für Tumore verwendet worden ist. Es konnte gezeigt werden, dass für Brustkrebs, Darmkrebs, Prostatakrebs, Magenkarzinome, Melanome und Adenokarzinome der Lunge eine vermehrte Bindung von HPA als prognostisch ungünstig zu werten ist (Dwek et al. 2001, Kakeji et al. 1991, Laack et al. 2002, Leathem et al. 1987, Okuyama et al. 1998, Schumacher et al. 1994, Thies et al. 2001). Unklar bleibt bislang, an welche genauen Oligosaccharidstrukturen der Zelloberfläche HPA bindet. Es konnte ein monosialyliertes Tetrasaccharid isoliert werden (HPAgly1), welches mit vermehrter HPA-Bindung im Mammakarzinom assoziiert ist (Dwek et al. 2001). Es liegt nahe, das oben beschriebene sLe<sup>x/a</sup> bei gleicher Struktur als Bindungspartner von HPA zu betrachten. Saint-Gurions et al. (2007) konnten ebenfalls die vermehrte Bindung von HPA an die stark metastasierende Zelllinie HT29 im Vergleich zur nicht metastasierenden Zelllinie SW480 zeigen (beide Zelllinien werden vergleichend in dieser Arbeit untersucht). Des Weiteren konnte in dieser Untersuchung die Bindung von HPA an HT29 durch GlcNAc- und GalNAc-Reste sowie Sialylsäure unterbunden werden, was die bestehende Vermutung bestärkt, dass HPA an sialylierte Epitope bindet. Aufgrund dieser Erkenntnisse werden in dieser Arbeit Glykosyltransferasen untersucht, bei denen die Möglichkeit besteht, dass sie an der Synthese des HPA-Liganden beteiligt sein könnten. Dabei sollen metastasierende und nicht- bzw. weniger metastasierende Tumorzelllinien verglichen werden.

Bislang wurde nicht klar, ob der HPA-Bindungspartner gleichzeitig eine funktionelle Aufgabe im Prozess der Tumormetastasierung besitzt. So zeigte sich kein Unterschied im Metastasierungsverhalten von stark HPA-positiven Zellen der Melanomlinie LOX, welche an sich ein hohes Metastasierungspotential aufweist, wenn diese vor intravenöser Injektion in Mäuse mit HPA vorbehandelt wurde (Kjønniksen et al. 1994). Im Gegensatz dazu wiesen Mammakarzinomzellen, die mit HPA vorbehandelt waren, eine verminderte Adhäsivität gegen Endothelzellen auf, was einen funktionellen Zusammenhang vermuten ließ (Valentiner et al. 2005).

Im Gegensatz zur Expression von sLe<sup>x</sup> auf der Zelloberfläche, welche durch Hypoxie verstärkt wird (Koike et al. 2004), scheint es sich mit dem HPA-Liganden nicht

grundsätzlich ähnlich zu verhalten. Brooks et al. (2001) konnten zeigen, dass es sowohl im menschlichen Tumorzellverband (operativ gewonnen), als auch in etablierten Zelllinien in Kultur zu einem gleichen HPA-Bindungsmuster an eine heterogene Gruppe von Kohlenhydratstrukturen kommt. Wie es sich mit der Expression der Glykosyltransferasen im Tumorzellverband und in den in der Kultur gewachsenen Zellen verhält, soll ebenfalls Gegenstand dieser Untersuchung sein.

## 2.4 Glykosyltransferasen

### 2.4.1 $\beta$ -1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase 3, mucin type (GCNT3)

GCNT3 agiert an der Core1-Grundstruktur der O-Glykane und katalysiert eine  $\beta$ -1,6-Bindung zwischen GlcNAc und GalNAc. Es entsteht hierdurch die Core2-Struktur, welche die Grundlage für verzweigte O-Glykanketten bildet (siehe Abbildung 1). GCNT3 wird in Leukozyten und Zellen des Knochenmarks gebildet (in Literatur als C2Gnt-L bezeichnet) und hat hier lediglich eine Aktivität an Core2. Des Weiteren wird GCNT3 in mucinbildenden Zellen des Dün- und Dickdarms, Trachea und Magen synthetisiert (C2Gnt-M). In diesen Zellen wurde sowohl eine Core2-, als auch Core4-Aktivität beschrieben (Julien et al. 2007, Prorok-Hamon et al. 2005, Yeh et al. 1999). Core2-basierende O-Glykane sind die Grundstruktur von Selektinliganden auf Leukozyten (Lowe 2002).

Mittels des monoklonalen Antikörpers CHO 131, welcher Core-2-verzweigte O-Glykane mit sLe<sup>x</sup>-Terminierung erkennt, konnte ein vermehrter Nachweis dieser Strukturen in metastasierenden Kolonkarzinomen und deren Lebermetastasen erfolgen. An Kolonadenomen oder normaler Kolonmukosa fand keine vermehrte Bindung von CHO 131 statt. In der gleichen Untersuchung wurde eine 15-fach höhere GCNT3-Expression in Tumorzellen im Vergleich zu normaler Kolonmukosa festgestellt (St. Hill et al. 2009).

In 41 untersuchten Tumoren der Lunge, ungeachtet der histologischen Klassifizierung, konnte in dreiviertel der Tumore, im Vergleich zu normalem Lungengewebe, eine erhöhte GCNT3-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Im Adenokarzinom der Lunge wurde sogar eine positive Korrelation zwischen vaskulärer Invasion und

lymphatischer Metastasierung und der GCNT3-Expression gefunden. Es wird angenommen, dass die GCNT3 Expression in der Transformation einer Zelle in eine maligne Tumorzelle eine Rolle spielt (Machida et al. 2001).

Huang et al. (2006) verglichen die GCNT3-Expression in kolorektalen Karzinomzellen und Zellen aus normalem Kolongewebe. Überraschenderweise wurde eine Herabregulation von GCNT3 im Tumorgewebe festgestellt. In der gleichen Arbeit wurde gezeigt, dass GCNT3-transfizierte Kolonkarzinomzellen in vitro um bis zu 70% in ihrem Wachstum gehemmt werden.

Die GCNT3-mRNA-Expression wurde hier im Vergleich in metastasierenden und nicht oder wenig metastasierenden Karzinomzelllinien untersucht. Im direkten In-Vitro-In-Vivo-Vergleich soll festgestellt werden, ob die Enzymexpression durch eventuelle fehlende Einflüsse aus dem Zellverband beeinflusst wird.

#### **2.4.2 Sialyltransferasen**

Oligosaccharidketten, Glykoproteine und Glykolipide auf Zelloberflächen werden häufig mit Sialylsäure (N-Acetylneuraminsäure) beendet. Diese kann entweder durch  $\alpha$ -2,3- oder  $\alpha$ -2,6-Bindungen an Galactose (Gal), mit einer  $\alpha$ -2,6-Bindung an N-Acetylgalactosamin (GalNAc) oder N-Acetylglucosamin (GlcNAc) oder durch eine  $\alpha$ -2,8-Bindung an weitere Sialylsäurereste gebunden werden. Diese Bindungen werden durch verschiedene Sialyltransferasen katalysiert. Das Donorsubstrat ist stets CMP-Sialylsäure, jedoch sind die Strukturen, an denen die Sialyltransferasen agieren, unterschiedlich. Auf einer Tumorzelle scheint Sialylsäure verschiedene Aufgaben zu erfüllen:

- I. Zell-zu-Zell-Kontakte können durch ladungsabhängige Abstoßung inhibiert werden.
- II. Zell-zu-Zell-Kontakte können jedoch auch gefördert werden, da Sialylsäure ein häufiges Substrat für Selektine ist.
- III. Sialylsäure kann andere Zuckermoleküle maskieren und für Lektine „unsichtbar“ machen (Dall’Olio u. Chiricolo 2001).

Mehrfach konnte gezeigt werden, dass Sialylierung von Glycokonjugaten auf der Zelloberfläche, Aktivität von Sialyltransferasen und metastatisches Potential von

Tumorzellen in engem Zusammenhang stehen (Julien et al. 2007, Priatel et al. 2000, Schneider et al. 2001, Videira et al. 2009).

#### **2.4.2.1 *$\beta$ -Galactosid- $\alpha$ -2,3-Sialyltransferase (ST3O)***

Wie in Abbildung 1 dargestellt agiert ST3O, ebenso wie GCNT3, an Core1 und ist gekennzeichnet durch die Eigenschaft, Sialylsäure an O-Glykane zu binden (Gillespie et al. 1992, Julien et al. 2007). Im kolorektalen Karzinom fanden Ito et al. (1997) eine höhere ST3O-mRNA-Expression in malignen Zellen im Vergleich zu Zellen normaler kolorektaler Schleimhaut. Ähnliches gilt für Harnblasenkarzinome (Videira et al. 2009) und Mammakarzinome (Burchell et al. 1999). Schneider et al. (2001) vermuteten, dass eine vermehrte ST3O-mRNA-Expression einen Baustein der lymphatischen Metastasierung darstellt, da eine vermehrte Expression in derartig metastasierten kolorektalen Karzinomen gefunden wurde. In einem Mausmodell für Mammakarzinome konnte eine gesteigerte ST3O-Expression die Latenzzeit für auftretende Karzinome verkürzen, so dass angenommen wurde, dass ST3O eine für die Tumorgenese förderliche Funktion besitzt (Picco et al. 2010). Des Weiteren wurde eine vermehrte ST3O-Expression mit vermehrter lymphatischer Metastasierung von kolorektalen Karzinomen assoziiert (Julien et al. 2001).

ST3O und GCNT3 konkurrieren beide um das gleiche Substrat Core1 der O-Glykane. ST3O terminiert im Gegensatz zu GCNT3 die Zuckerkette, während GCNT3 unter Bildung von Core2 eine weitere Verzweigung zur Verlängerung der Zuckerkette schafft. GCNT3 kann nach Sialylierung jedoch nicht mehr an Core1 wirken. ST3O-knockout-Mäuse exprimieren dementsprechend vermehrt Core2-Strukturen, da die Core1-Struktur nicht mehr blockiert ist (Priatel et al. 2000, Julien et al. 2007). Die sialylierte Core1-Struktur nennt sich sialylT-Antigen. Dieses ist auf Karzinomzellen verstärkt exprimiert (Brockhausen 2006). Die GCNT3- und ST3O-mRNA-Expressionen wurden hier ebenfalls verglichen.

#### **2.4.2.2 *N-Acetylactosaminid- $\alpha$ -2,3-Sialyltransferase (ST3N)***

Unter den Sialyltransferasen, die an der Biosynthese des Antigens sLe<sup>x/a</sup> beteiligt sind (siehe Abbildung 1), befindet sich, neben ST3Gal IV und VI, auch ST3N (ST3Gal III). Sie agiert vorzugsweise an Typ1-Disacchariden (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc), welche das

Rückgrat von sLe<sup>a</sup> darstellen. Mit einer verminderten Effektivität wirkt sie auch an Typ2-Disacchariden (Galβ1-4GlcNAc), welche wiederum als Grundstruktur von sLe<sup>x</sup> zu sehen sind (Kitagawa and Paulson 1993, Wen et al. 1992). Ein Zusammenhang zwischen einem vermehrten Nachweis von ST3N-mRNA und einer gesteigerten sLe<sup>x/a</sup>-Expression auf der Zelloberfläche konnte hergestellt werden, was dafür spricht, dass ST3N an der Synthese von sLe<sup>x/a</sup> beteiligt ist (Carvalho et al. 2010). Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass die ST3N-Expression einer Tumorzelle mit Verstärkung der malignen Eigenschaften einhergeht.

So hatten Lungenkrebspatienten mit einer in den entnommenen Proben gesteigerten ST3N-Expression ein deutlich schlechteres outcome als Patienten mit einer minimalen oder gar keinen Expression von ST3N (Ogawa et al. 1997). In Zellen vom Adenokarzinom des Pankreas führte die ST3N-vermittelte Sialylierung von Oberflächenglykanen zu einer gesteigerten Adhäsionsfähigkeit an E-Selektin durch sLe<sup>x</sup>. Des Weiteren korrelierten Migrationsfähigkeit der Pankreaskarzinomzellen und ST3N-Expression positiv miteinander. ST3N überexprimierende Adenokarzinomzellen, die in athymische Mäuse injiziert wurden, führten zu einer verminderten Überlebensrate der Mäuse und einer gesteigerten Tumorentwicklung (Pérez-Garay et al. 2010). Verglichen mit gutartigen Gallengangstumoren hatten sich die ST3N-mRNA-Level im malignen Gallengangstumor als erhöht gezeigt (Xiao-Ling et al. 2004) und auch im Magenkarzinom ging eine erhöhte ST3N-mRNA-Expression mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeiten eines sekundären Wiederauftretens der Tumorerkrankung einher (Gretschel et al. 2003). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass in Tumoren mit hohem metastatischen Potential, im Vergleich zu Tumorzellen mit niedrigem metastatischen Potential, eine höhere ST3N-mRNA-Expression nachzuweisen ist. Dieser Frage wurde hier ebenfalls nachgegangen.

#### **2.4.2.3 *β-Galactosid-α-2,6-Sialyltransferase (ST6N)***

ST6N agiert wie auch ST3O und GCNT3 an der Core1-Struktur von O-Glykanen (siehe Abbildung 1) (Julien et al. 2007). Bereits in den 1980er Jahren wurde in Kolonkarzinomzellen eine höhere ST6N-Expression als im normalen Kolongewebe gefunden (Dall'Ollio et al. 1989).

Ikehara et al. (1999) konnten Zellkulturen der kolorektalen Karzinomzelllinie HCT15 mit dem hST6GalNAc I – Gen (= ST6N) transfizieren. Hieraufhin exprimierten diese

Zellen sialyliertes Tn-Antigen auf Mucinen. Das sialylTn-Antigen beruht auf einer  $\beta$ -2,6-Bindung von Sialylsäure (NeuAc) an den O-Glykanrest auf Mucinen (O-GalNAc). ST6N unterdrückt also die Expression von sLe<sup>x</sup> auf Zelloberflächen durch Unterdrückung weiterer  $\beta$ -1,6-Verzweigungen, synthetisiert aber selbst sialylTn-Antigen, welches ebenfalls wie sLe<sup>x</sup> mit einer schlechten Prognose bei Karzinomen assoziiert ist (Ikehara et al. 1999, Sewell et al. 2006, Werther et al. 1996). Ähnliches gilt für das T-Antigen (entspricht Core1). Einfach sialyliertes T-Antigen (durch ST3O) und zweifach sialyliertes T-Antigen (durch ST3O und ST6N) können nicht weiter zu mehr verzweigten O-Glykanen prozessiert werden. Mehrfach wurde gezeigt, dass auch das Vorkommen von T-Antigen, besonders von sialyliertem T-Antigen mit vermehrter Malignität assoziiert ist (Schneider et al. 2001).

Während in intestinalen Zellen das Expressionslevel von ST6N während der Transformation zu Malignität nicht mit sTn-Antigen-Expression korreliert und es auch im normalem gastrointestinalen Gewebe zu einer ST6N-Expression kommt, findet sich im normalem Brustgewebe im Gegensatz zu malignen Mammakarzinomzellen gar keine ST6N-Expression, weshalb hier die Vermutung besteht, dass im malignen Brustdrüsengewebe eine de-novo-ST6N-Synthese zum Tragen kommt (Sewell et al. 2006, Vazquez-Martin et al. 2004).

Auch ST6N und GCNT3 können als „Gegenspieler“ angesehen werden. Schneider et al. (2001) transfizierten SW480-Zellen mit ST6N und konnten zeigen, dass deutlich weniger Core2 auf deren Oberflächen exprimiert wurde. Die ST6N-mRNA-Expression korrelierte bei Kolonkarzinompatienten mit einem schlechten pT- und pN-Stadium. Werden diese Zellen mit ST6N-cDNA transfiziert, lässt sich sialylTn-Antigen auf deren Oberfläche nachweisen, was darauf schließen lässt, dass das Enzym für die Entstehung dieses Oberflächen-Antigens verantwortlich ist (Julien et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass ein vermehrter sialylTn-Antigen Nachweis auf kolorektalen Karzinomzellen mit einer schlechteren Prognose bei den Patienten korreliert (Itzkowitz et al. 1990).

ST6N agiert interessanterweise an  $\beta$ 1-Integrinen und sialyliert diese. ST6N transfizierte Kolonkarzinomzellen zeigten eine gesteigerte Adhäsionsfähigkeit an  $\beta$ -Integrin-Liganden, Kollagen I und Laminin (Seales et al. 2005). Zellen eines Adenokarzinoms des Ovars, welche forciert ST6N exprimierten, boten ebenfalls ein erhöhtes Adhäsionsvermögen an die Liganden und eine erhöhte Invasivität im Matrigel (Christie

et al. 2008). Zellen der Mammakarzinomzelllinie T47D, welche mit ST6N transfiziert wurden, waren vermehrt migrationsfähig, zeigten gleichzeitig jedoch ein vermindertes Tumorwachstum und eine reduzierte Adhäsionsfähigkeit an eine Vielzahl von Matrixproteinen (Julien et al. 2005). Sollte ST6N für die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen funktionell wichtig sein, ist eine unterschiedliche Expression im Zellverband und in „freien“ Zellen im Kulturmedium zu vermuten. Vergleichend wurden hier die Enzymexpressionen in Zellen im in vivo gewachsenen Tumor sowie in Zellen aus dem Kulturmedium bestimmt.

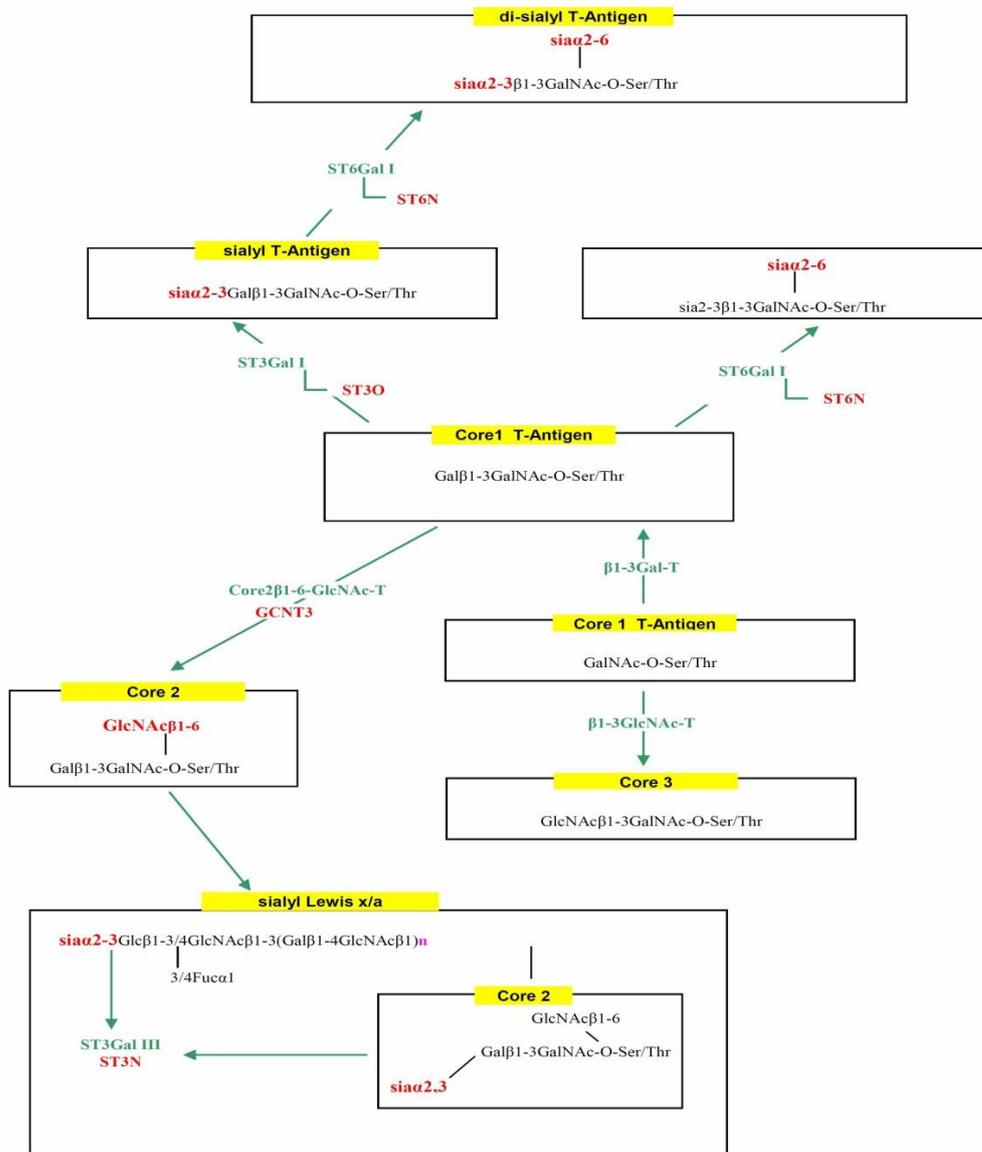


Abbildung 1 Ausschnittartige Darstellung der Wirkweise der in dieser Arbeit untersuchten Glykosyltransferasen (rot) an O-Glykanen. Synthese der  $\beta$ -1,6-verzweigten O-Glykane durch **GCNT3** (Core 1 zu Core 2). Sialylierung von Core 1 zum T-Antigen durch **ST3O** und **ST6N**. Sialylierung von sLe<sup>x/a</sup> durch **ST3N**. Gal – Galactose, GalNAc – N-Acetylgalactosamin, Glc – Glucose, GlcNAc – N-Acetylglucosamin, Ser – Serin, Thr – Threonin (Vorlage für diese Abbildung aus Brockhausen 1998 und 2006 und Fukuda 2002).

### 3 MATERIAL UND METHODEN

Folgende Zelllinien wurden untersucht:

Tabelle 1 Herkunft der Zelllinien (Primärtumor, Metastase, Erguss), HPA-Bindungscharakteristik (negativ, schwach, mäßig und stark positiv) sowie Anzahl der SCID-Mäuse, die Metastasen bilden, nachdem ihnen die entsprechende Zelllinie intravenös injiziert wurde.

§ Anzahl der Scid-Mäuse, die nach Injektion dieser Zelllinie Metastasen gebildet haben.

\* De Fromentel et al. 1985, # Thies et al. 2007, § Schumacher u. Adam 1997, <sup>B</sup> Dwek et al. 2001, <sup>+</sup> Soule et al. 1973, & HT29mdr-Zellen zeigten in Voruntersuchungen ein verändertes Lektinbindungsverhalten im Vergleich zu HT29 sowie ein verlangsamtes Tumorwachstum im Xenograftmodell (Lorke et al. 2002, Valentiner et al. 2002).

Zelllinien		HPA-Bindung	Anzahl der Tiere mit Metastasen <sup>§</sup>
<b>HT29</b>	Kolorektales Adenokarzinom	stark positiv <sup>§</sup>	9/9 <sup>§</sup>
<b>HT29mdr</b>	Multi-Drug-Resistenter Phenotyp des kolorektalen Adenokarzinom HT29 <sup>&amp;</sup>		
<b>CaCo2</b>	Kolorektales Adenokarzinom	negativ <sup>§</sup>	2/8 <sup>§</sup>
<b>SW480</b>	Kolorektales Adenokarzinom aus Primärtumor isoliert	negativ <sup>§</sup>	0/7 <sup>§</sup>
<b>MCF7</b>	Aus Pleuraerguss isoliertes duktales Mammakarzinom <sup>+</sup>	stark positiv <sup>§</sup>	6/8 <sup>§</sup>
<b>T47D</b>	Adenokarzinom der Mamma	stark positiv <sup>§</sup>	6/6 <sup>§</sup>
<b>HBL100</b>	Epithelzellen isoliert aus Muttermilch einer scheinbar gesunden Frau, zeigt sich in vitro als immortal und geeignet, um die Progression einer Epithelzelle zur Karzinomzelle zu untersuchen <sup>*</sup>	negativ <sup>B</sup>	0/4 <sup>§</sup>
<b>LOX</b>	Malignes Melanom, isoliert aus Lymphknotenmetastase <sup>#</sup>	stark positiv <sup>#</sup>	8/8 <sup>#</sup>
<b>FEMX-I</b>	Malignes Melanom, isoliert aus Lymphknotenmetastase <sup>#</sup>	schwach-mäßig positiv <sup>#</sup>	7/10 <sup>#</sup>
<b>MeWo</b>	Malignes Melanom, isoliert aus Lymphknotenmetastase	negativ-schwach positiv <sup>#</sup>	8/10 <sup>#</sup>
<b>Mel-6</b>	Primärtumor malignes Melanom <sup>#</sup>	schwach positiv <sup>#</sup>	10/10 <sup>#</sup>
<b>MV3</b>	Isoliert aus Lymphknotenmetastase eines malignen Melanoms	negativ-schwach positiv <sup>#</sup>	8/10 <sup>#</sup>

## **3.1 Material**

### **3.1.1 Zellkultur**

Die menschlichen Zelllinien wurden standardmäßig in RPMI 1640 medium (L-Glutamin und 2g Glucose/L, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) mit 10% fetalem Kalbserum (FCS, Invitrogen), 100 U/ml Penicillin und 10000 µl/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur RNA-Isolierung wurden die Zellen mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS; 50mM Phosphat, 150 mM NaCl; pH 7.4) gewaschen und trypsinisiert. Die Reaktion wurde mit RPMI 1640 Medium und Trypsin gestoppt und zur Bildung eines Zellpellets wurde bei 1500 Upm für 3 Minuten zentrifugiert.

### **3.1.2 Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Tumore**

Zum In-Vivo-Vergleich wurde aus in SCID (severe combined immunodeficiency) Mäusen herangewachsenen Tumoren der oben genannten Zelllinien RNA isoliert. 5 x 10<sup>6</sup> kultivierte Zellen wurden in 1 ml Zellkulturmedium gelöst. 200 µl dieser Lösung wurde den Mäusen zwischen die Schulterblätter injiziert. Nach Erreichen einer Größe, die mind. 10% des Mausgewichtes entsprach, wurden die Tumore entnommen, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

### **3.1.3 Zellen in Agar**

Die in Kultur gewachsenen Zellen wurden in Agar zentrifugiert und in Paraffin eingebettet. RNA wurde wie unten beschrieben isoliert. Zuvor wurde die richtige Zellschicht im Agarkegel durch wiederholtes Schneiden des Paraffinblockes am Microtom und Entparaffinierung sowie Hämalaunfärbung mikroskopisch bestimmt.

### **3.1.4 Mausblut**

Es wurden jeweils fünf Tiere pro Käfig gehalten und mit sterilem Futter und Wasser *ad libitum* versorgt. Drei 12-14 Monate alte SCID-Mäuse mussten nach den bestehenden

Richtlinien geopfert werden. Es wurden 200- 800 µl Blut pro Maus gewonnen und in EDTA-Röhrchen gesammelt.

### 3.1.5 Primer

Sämtliche verwendete Primer sind auf der Gendatenbank „Nucleotide“ der Internetseite des National Center for Biotechnology Information ([www.Roche.com](http://www.Roche.com) Universal Probe Library) eigens ausgesucht und geplant worden. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sie intronüberschreitend liegen. Ein weiteres Auswahlkriterium waren dicht beieinander liegende Schmelzpunkte eines Primerpaares. Die 5´-3´Primer wurden Vorwärts-b-Primer genannt, die entgegen gesetzten Rückwärts-Primer. In der semi-nested-PCR wurde der Vorwärts-b-Primer durch den sogenannten Vorwärts-a-Primer ausgetauscht, um ein längeres Amplifikat zu erhalten. Der Rückwärts-Primer blieb der gleiche. Synthetisiert wurden alle Primer bei MWG Biotech, Ebersberg. Sie wurden stets in einer Konzentration von 100 pmol/µl eingesetzt.

Tabelle 2 Primer β-Actin 1 mit Schmelzpunkt (T<sub>m</sub>) und Länge des PCR-Produktes in base pairs (bp).

		<b>Primer</b>	<b>T<sub>m</sub></b>	<b>bp</b>
<b>β-Actin 1</b>	Vorwärts-a	5´-ttc gag caa gag atg gcc ac-3´	59,4°C	156
	Vorwärts-b	5´-att ggc aat gag cgg ttc-3´	53,7°C	76
	Rückwärts	5´-gga tgc cac agg act cca t-3´	58,8°C	-

Tabelle 3 Primer β-Actin 2 mit Schmelzpunkt (T<sub>m</sub>) und Länge des PCR-Produktes in base pairs (bp).

		<b>Primer</b>	<b>T<sub>m</sub></b>	<b>bp</b>
<b>β-Actin 2</b>	Vorwärts-a	5´-aga aaa tet ggc acc aca cc-3´	57,3°C	190
	Vorwärts-b	5´-cca acc gcg aga aga tga-3´	56,0°C	97
	Rückwärts	5´-cca gag gcg tac agg gat ag-3´	61,4°C	-

Tabelle 4 Primer GCNT3 mit Schmelzpunkt ( $T_m$ ) und Länge des PCR-Produktes in base pairs (bp).EC – Enzymklassennummer.

		<b>Primer</b>	$T_m$	<i>bp</i>
<b>GCNT3</b>	Vorwärts-a	5'-att tgc tgc cac gga aca cc-3'	59,4°C	185
<b>EC 2.4.1.102</b>	Vorwärts-b	5'-act tgg aaa cag aat cac gc-3'	55,3°C	165
	Rückwärts	5'-cca caa gta atg cag ctg gc-3'	59,4°C	-

Tabelle 5 Primer ST3O mit Schmelzpunkt ( $T_m$ ) und Länge des PCR-Produktes in base pairs (bp).EC – Enzymklassennummer.

		<b>Primer</b>	$T_m$	<i>bp</i>
<b>ST3O</b>	Vorwärts-a	5'-cct tca tgc cca aat ccc g-3'	58,8°C	74
<b>EC 2.4.99.4</b>	Vorwärts-b	5'-caa atc ccg gaa act cca g-3'	56,7°C	64
	Rückwärts	5'-agg aag atg aaa tct gaa aat ggt-3'	55,9°C	-

Tabelle 6 Primer ST3N mit Schmelzpunkt ( $T_m$ ) und Länge des PCR-Produktes in base pairs (bp).EC – Enzymklassennummer.

		<b>Primer</b>	$T_m$	<i>bp</i>
<b>ST3N</b>	Vorwärts-a	5'-gaa tta gcc acc aag tac gc-3'	57,3°C	155
<b>EC 2.4.99.6</b>	Vorwärts-b	5'-aag cct ggc tat gct tca gc-3'	59,4°C	113
	Rückwärts	5'-acg aac tcc cgg att cta gc-3'	59,4°C	-

Tabelle 7 Primer ST6N mit Schmelzpunkt ( $T_m$ ) und Länge des PCR-Produktes in base pairs (bp). EC – Enzymklassennummer.

	<i>Primer</i>	$T_m$	<i>bp</i>
<b>ST6N</b>	Vorwärts-a 5'-tag tgc taa ttc ctg agg acc-3'	57,9°C	102
<b>EC 2.4.99.1</b>	Vorwärts-b 5'-ctg ggg gat tag cca gaa g-3'	58.8°C	64
	Rückwärts 5'-tgt gtt cag gga agt cat ttt g-3'	58.4°C	-

Die Primerpaare des  $\beta$ -Actin 2 und der Glykosyltransferasen wurden alle an Maus-cDNA getestet und gegenkontrolliert (siehe auch Kap. 5.3.2.1).

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 RNA-Isolation**

Um RNA sowohl aus in der Kultur gewachsenen Zelllinien, als auch aus in Paraffin eingebetteten Tumoren zu isolieren, kamen zwei verschiedene Isolations-Kits von Qiagen (Hilden, Deutschland) zum Einsatz: der „RNeasy Midi Kit“ für die Zelllinien und der „RNeasy FFPE Kit“ für die Tumore. Letzterer beinhaltet zusätzlich zum ersten Kit Schritte zur Entparaffinierung der in Paraffin eingebetteten Tumorproben. Die Isolationsprinzipien beider Kits sind ähnlich. In mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten mit verschiedenen Puffern in verschiedenen Trenn- und Bindungssäulen mit unterschiedlichen Silica-Gelmembranen kann aus dem Zelllysat bzw. aus Paraffinschnitten RNA isoliert werden. Hier wurde stets bei Raumtemperatur gearbeitet, daher mussten alle Vorgänge zügig durchgeführt werden.

#### ***3.2.1.1 RNA-Isolation aus Zelllinien***

Im „RNeasy Midi-Kit“ kann ein Ausgangsmaterial von einer Minimalanzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen verwendet werden. Insgesamt können die RNeasy Midi-Säulen maximal 1 mg RNA binden, welche eine Mindestlänge von 200 Basen haben muss. Alle Ribonukleinsäuren, die kleiner als 200 Basen sind (rRNA, tRNA, 5sRNA), werden ausgewaschen. Die Zellen wurden bei  $3000 \times g$  abzentrifugiert und der Überstand aspiriert. Im Folgenden wurde gemäß den Herstellerangaben weiter verfahren. Je nach zu erwartender RNA-Menge wurden am Ende 150-250 µl RNase freies Wasser zur Elution der RNA aus der Säule benutzt. Es wurde zweimalig eluiert (zunächst mit 250 µl und folgend mit 100 µl RNase freiem Wasser), um eine höhere Ausbeute an RNA, jedoch mit geringerer Konzentration zu erzielen. So lagen am Ende RNA-Konzentrationen zwischen 57,5 ng/µl und 639,8 ng/µl vor.

#### ***3.2.1.2 RNA-Isolation aus in Paraffin eingebetteten Tumoren***

Als Ausgangsmaterial für die RNA-Isolation wurden frisch geschnittene, 10 µm dicke Paraffinschnitte eines Tumors verwendet. Aus  $3 \times 8$  Schnitten à 10 µm wurde die RNA gewonnen. Pro Tumor wurden drei Isolationsvorgänge parallel vollzogen.

Überschüssiges Paraffin wurde mit einem „RNase away“ (Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA) gesäuberten Skalpell entfernt und der Paraffinblock in ein Mikrotom eingespannt. Die Schneideklinge wurde ebenso mit „RNase away“ gereinigt.

Die ersten 8-10 Schnitte wurden verworfen. Die folgenden acht Schnitte wurden in RNase freie 1,5 oder 2 ml Tubes platziert und sofort geschlossen. Um das Paraffin zu lösen, wurde zunächst 1 ml Xylol-Ersatz auf die Schnitte pipettiert und für 10 Sekunden gevortext. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei höchster Geschwindigkeit für 2 Minuten, damit das Xylol vom entstandenen Pellet abpipettiert werden konnte. Diese und alle weiteren Zentrifugationsschritte erfolgten bei 20-25°C. Als nächstes wurde 1 ml 100 % Ethanol hinzu gegeben, welches den letzten Rest Xylol extrahierte. Zur Trennung der festen Bestandteile von dem Ethanol wurde wie oben zentrifugiert. Die folgenden Waschschrte wurden gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Zur Elution gebundener RNA wurde RNase freies Wasser genutzt. Eluiert wurde wieder in zwei Schritten, d.h. zweimal wurden vorsichtig je 15 µl direkt auf die Membran pipettiert, und je 1 Minute bei höchstmöglicher Geschwindigkeit zentrifugiert. Die drei Lösungen wurden zusammen geführt, so dass stets eine Ausbeute von ca. 90 µl RNA-Lösung vorlag.

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

Zwei Mäusen wurde nach entsprechender Sedierung entweder direkt aus dem Herzen oder retroorbital Blut entnommen. Dieses wurde gemäß den Beschreibungen des Herstellers des Isolations Kits „QIAmp RNA Blood Mini Kit“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) eingesetzt und die RNA aus den Leukozyten nach vorheriger Lyse der Erythrozyten isoliert. Die cDNA-Synthese erfolgte wie bei aus Zelllinien isolierter RNA. Alle RNA-Proben wurden bei -20°C gelagert und während der Weiterverarbeitung auf Eis gestellt.

### ***3.2.1.4 Konzentrationsbestimmung isolierter RNA***

Die Konzentration der RNA wurde spectrophotometrisch bestimmt. Die Photometerzelle (Quartz Photospectrometer Cell; BioRad, Hercules, CA, USA) wurde mit 100 µl RNA-Lösung gefüllt (1:10 mit H<sub>2</sub>O). Das Photospectrometer „Smart Spec

2000™<sup>cc</sup> (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) wurde vor der Messung mit destilliertem Wasser geeicht.

### 3.2.2 cDNA-Synthese

#### 3.2.2.1 cDNA-Synthese aus RNA der Kulturzellen

Für die cDNA-Synthese mit dem „First Strand Transcriptor cDNA Synthesis Kit“ (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) wurden aus kultivierten Zellen 1500 ng RNA eingesetzt. Um die benötigte Menge an RNA-Lösung zu erhalten, wurde die ermittelte RNA Konzentration in ng/µl durch 1500 dividiert, um die einzusetzende Menge in µl zu bestimmen.

Zur cDNA-Synthese aus RNA wurden Anchored-oligo(dT)18-Primer eingesetzt. Um eventuelle sekundäre RNA-Strukturen zu denaturieren und den Primern eine Bindungsmöglichkeit zu geben, wurde das RNA-Primer-Gemisch nun für 10 Minuten bei 65°C in einem Thermocycler (Personal Cycler, Biometra, Göttingen, Deutschland) inkubiert.

Die restlichen Ingredienzien wurden je nach Anzahl der Proben in einem Mastermix, entsprechend den Herstellerangaben, wie folgt gepoolt:

Tabelle 8 Pipettierschema Master Mix 1 aus RNA-Lösung, Wasser und Anchored-oligo(dT)18-Primern zur cDNA-Synthese aus RNA der kultivierten Zellen.

	RNA-Lösung	
	+ H <sub>2</sub> O	
<b>Master Mix 1</b>		12 µl
	+ Anchored-oligo(dT)18-Primer	1 µl
		13 µl

Tabelle 9 Pipettierschema Master Mix 2 aus Reaktionspuffer, RNase-Inhibitor, Desoxynukleotiden und Reverser Transkriptase zur cDNA-Synthese aus RNA der kultivierten Zellen.

<b>Master Mix 2</b>	Reaktionspuffer	4 $\mu$ l
	RNase-Inhibitor	0,5 $\mu$ l
	Desoxynukleotide	2 $\mu$ l
	Reverse Transkriptase	0,5 $\mu$ l
		7 $\mu$ l

Der Master Mix 2 wurde dem RNA-Primer-Gemisch (Master Mix 1) hinzugefügt und es folgte eine Inkubation bei 50°C für 1 Stunde mit anschließender Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 85°C für 5 Minuten.

### ***3.2.2.2 cDNA-Synthese aus RNA der in Paraffin eingebetteten Tumor***

Da aus Tumoren isolierte RNA aufgrund der Fixierung des Materials und etwaiger Nekrosen im Tumor degradierter vorlag als aus den Kulturzellen, musste die Transkription abgewandelt erfolgen, um die Ausbeute an cDNA zu erhöhen. Zunächst wurde stets die Höchstmenge an RNA-Lösung (11  $\mu$ l) eingesetzt. Es wurden Random-Hexamer-Primer verwendet, die an sämtliche Stellen der RNA binden und in keiner Weise spezifisch, jedoch aber auch unabhängig von dem Poly-A-Schwanz sind, der möglicherweise nach Degradation nicht mehr vorhanden war. Die Spezifität wurde später durch die PCR-Primer gegeben. Hier ging es darum, auch die kleinsten vorhandenen Mengen an RNA „aufzufangen“ und in cDNA umzuschreiben, um über der Nachweisgrenze für die spätere Real-Time-PCR zu bleiben. Die Vorgehensweise blieb annähernd gleich. Das anfängliche RNA-Primer-Gemisch (Master Mix 1) musste laut Hersteller jedoch 10 Minuten bei 25°C bzw. Raumtemperatur stehen bevor es bei 65°C für 10 Minuten inkubieren konnte.

Tabelle 10 Pipettierschema Master Mix 1 aus RNA-Lösung und Random-Hexamer-Primern zur cDNA-Synthese aus RNA der FFPE-Tumoren.

<b>Master Mix 1</b>	RNA-Lösung	11 $\mu$ l
	Random-Hexamer-Primer	2 $\mu$ l
		13 $\mu$ l

Tabelle 11 Pipettierschema Master Mix 2 aus Reaktionspuffer, RNase-Inhibitor, Desoxynukleotiden und Reverser Transkriptase zur cDNA-Synthese aus RNA der FFPE-Tumoren.

<b>Master Mix 2</b>	Reaktionspuffer	4 $\mu$ l
	RNase Inhibitor	0,5 $\mu$ l
	Desoxynukleotide	2 $\mu$ l
	Reverse Transkriptase	0,5 $\mu$ l
		7 $\mu$ l

Anschließend erfolgte, wie oben beschrieben, die Inkubation für eine Stunde mit folgender Inaktivierung der Reversen Transkriptase.

### 3.2.3 Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction

Die Methode der Real-Time-Quantitative-PCR umgeht das Problem der sich ändernden äußerlichen Einflüsse, indem bereits während der einzelnen Zyklen die Anzahl an amplifizierten Kopien bestimmt wird. Dies ist vor allem besonders aussagekräftig in der Phase, in der sich die DNA logarithmisch vermehrt bzw. an dem Punkt an dem diese Phase beginnt. Liegen initial viele Kopien vor, so beginnt sie nach weniger Zyklen, als würden nur wenige Kopien vorliegen.

Mittels des fluoreszierenden Farbstoffes SYBR Green®, der unspezifisch an Doppelstrang-DNA bindet, kann anhand der abgegebenen Fluoreszenz nach jedem Zyklus die vorliegende Anzahl an DNA-Kopien quantifiziert werden. Nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen entstehen so viele PCR-Produkte, dass ihre Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Dies ist der sogenannte Cp-Wert (crossing point). Der Cp-Wert benennt also den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz des PCR-

Produkts die Hintergrundfluoreszenz übersteigt und korreliert umgekehrt proportional mit der Ausgangszahl der DNA-Kopien (Bernard et al. 2002).

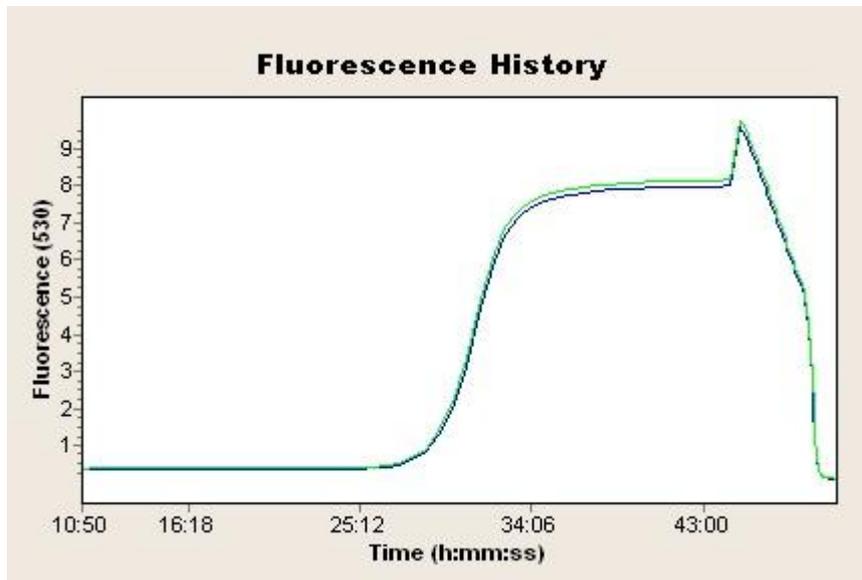


Abbildung 2 Beispieldarstellung einer Real-Time-Quantitative-PCR. Es ist die Fluoreszenzentwicklung eines PCR-Produktes ( $n=2$ ) gegen die Zeit dargestellt. Die Grafik wird während des PCR-Laufs in Echtzeit wiedergegeben.

### 3.2.3.1 *Light Cycler Instrument*

Das Light Cycler Gerät (LightCycler 2.0 Instrument, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland), in dem die Real-Time-PCR durchgeführt wurde, ist ein Thermocycler kombiniert mit einer Fluorimetroptik, der in der Lage ist, Fluoreszenzen verschiedener Wellenlängen zu bestimmen. Mittels zirkulierender Umgebungsluft ist ein schneller Wechsel der Temperaturen im Light Cycler gegeben. Als Reaktionsgefäße dienen Glaskapillaren (LightCycler Capillaries, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland), die ein Volumen von 20 bzw. 100  $\mu\text{l}$  fassen können. Der LightCycler ist an einen PC angeschlossen, über den die „LightCycler Software 4.0“ läuft, welche die während der PCR erfassten Daten (Fluoreszenz vs. Zyklenzahl) in Echtzeit wiedergibt und nach jedem Lauf analysiert („The Light Cycler“ – Roche Applied Sciences 1998).

### **3.2.3.2 Detektion der PCR-Produkte**

Als markierender Farbstoff für die PCR-Produkte wurde in dieser Arbeit Sybr Green® verwendet. Es interkaliert mit Doppelstrang-DNA, was zu einer Steigerung seiner eigenen Fluoreszenz führt, die im Light Cycler Gerät bei 530 nm bestimmt wird. Dies geschieht nach jeder Elongationsphase der PCR.

Ein Nachteil des SYBR Green® kann in seiner unspezifischen Bindung an dsDNA gesehen werden. Es bindet ebenfalls an Primerdimeren, was sich bei der Detektion von sehr geringen initialen Mengen an DNA als Problem erweist (Rasmussen et al. 1999). Aufgrund dessen wurden Schmelzkurvenanalysen und Gelelektrophoresen zur Reinheitskontrolle der Produkte durchgeführt. Aus Kostengründen und aufgrund seiner variablen Einsetzbarkeit wurde in dieser Arbeit SYBR Green® der Vorzug gegenüber spezifisch bindenden und fluoreszierenden Sonden gegeben.

### **3.2.3.3 PCR-Produktkontrolle mittels Schmelzkurvenanalyse**

Die Schmelzkurve ( $T_m$ ) eines PCR-Produktes ermittelt der Light Cycler nach jeder durchlaufenen PCR. Von 65°C an aufsteigend bis zur Denaturierungstemperatur von 95°C (0.1°C/s) wird im Light Cycler Fluorometer die Fluoreszenz bestimmt. Bei einer für sie spezifischen Temperatur fängt die gebildete dsDNA an in ssDNA zu zerfallen, was als Fluoreszenzabfall des Farbstoffes gemessen wird. Dies bildet die Light Cycler Software als erste negative Ableitung ab. Das Maximum der Kurve stellt die spezifische Schmelztemperatur eines Amplifikats dar (Ririe et al. 1997). Entstehen während der PCR Nebenprodukte (z.B. Primerdimere) oder ist das zu amplifizierende Gen heterozygot, so stellen sich verbreiterte oder mehrere 'peaks' dar.

### **3.2.3.4 PCR-Produktkontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese**

Nach jeder vorgenommenen PCR am Thermocycler, nach jeder Etablierung eines PCR-Protokolls für jedes Primerpaar (sowohl am LightCycler, als auch am Thermocycler), nach Einsatz zuvor noch nicht verwendeter cDNA Proben, sowie bei Unsicherheiten in der Schmelzkurvenanalyse am LightCycler (etwaige Verbreiterung der Schmelzkurve oder bei Vermutung von Nebenprodukten) wurde zur Kontrolle der PCR-Produkte eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Hierzu wurden 1,5 g Seakem LE Agarose

(Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) mit 50 ml TBE-Puffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), bzw. 3 g und 100 ml, in der Mikrowelle ca. 2 Minuten erhitzt. Nach Abkühlung und vor Erhärtung des Gels wurden 2 µl Ethidiumbromid (Promega, Wallisellen, Deutschland) zugegeben und gut vermengt. Pro Kammer wurden 3 µl PCR-Produkt (bei schwacher Darstellung Wiederholung mit 10 µl), 2 µl Loading-Puffer sowie 7 µl destilliertes Wasser eingesetzt. Beim Einsatz von 10 µl PCR-Produkt entfiel das Wasser. Die erste und letzte Kammer wurden mit 5 µl einer DNA-Leiter (HyperLadder V, Bionline, Taunton, MA, USA) von 5bp-500bp beladen. Anschließend wurde das Gel für 45-60 Minuten einer Spannung von 135V ausgesetzt (Consort Electrophoresis Power Supply, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Im Gel-Bildgebungssystem „Universal Hood White Light Transilluminator“ (BioRad, Segrate, Italien) wurde das Gel daraufhin unter UV-Licht (302 nm) fotografiert und mit der Quantity One 1-D Software (BioRad) am PC dargestellt (Lepecq et al. 1967).

### ***3.2.3.5 Relative Quantifizierung***

Um die initiale Menge an eingesetzter DNA anhand der Real-Time-PCR zu quantifizieren, wurde in dieser Arbeit die Methode der relativen Quantifizierung benutzt. Sie vermag Aussagen über das Expressionslevel eines zu untersuchenden Gens und dessen Veränderungen im Verhältnis zu einem Referenzgen zu treffen. Alle ermittelten Werte sind folglich Verhältnisaussagen über die zu untersuchende mRNA-Expression im Vergleich zu einem immer gleich exprimierten sogenannten Housekeeping-Gen. In jeder cDNA-Probe wurde jeweils zu dem untersuchenden Gen auch das Referenzgen bestimmt und die Probe somit normalisiert.

### ***3.2.3.6 Effizienzkorrektur***

Ein weiterer Fehler in der Quantifizierung der PCR-Produkte kann durch verschiedene PCR-Effizienzen in verschiedenen Proben erfolgen. Kontamination der Proben mit die PCR hemmenden Substanzen, RNA-Anteilen in DNA-Proben oder DNA-Fragmentierung können die Effizienz einer PCR negativ beeinflussen (Meijerink et al. 2001). Eine fehlerfrei reagierende PCR sollte eine Effizienz von 2 aufweisen, d.h. mit jedem Zyklus sollten zwei Amplifikate entstehen.

### 3.2.3.7 Standardkurvenerstellung mittels Semi-Nested-PCR

Für die Effizienzbestimmung der Primerpaare wurde eine Standardkurve erstellt. Im Thermocycler wurde durch den eingesetzten Vorwärts-a-Primer ein längeres DNA-Stück als Target-Gen amplifiziert. Im Sinne einer Semi-Nested-PCR wurde anschließend das PCR-Produkt in einer Verdünnungsreihe von  $10^{-3}$ - $10^{-11}$  mit den entsprechenden Vorwärts-b- und Rückwärts-Primern im LightCycler eingesetzt. Stets wurde cDNA aus den Zellkulturen von HT29 oder FEMX-I verwendet.

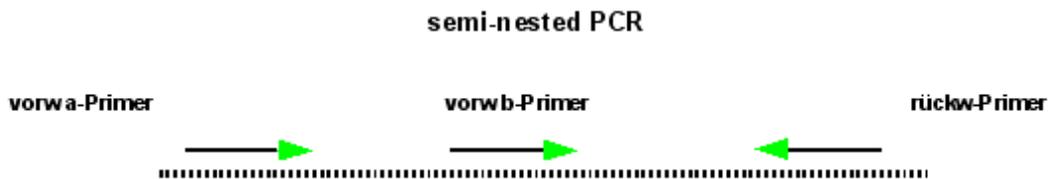


Abbildung 3 Schematische Darstellung der Semi-Nested-PCR. Abgebildet ist die Lage der Primer am DNA-Strang. Initial werden Vorwärts-a- (vorw a-Primer) und Rückwärts-Primer (rückw-Primer) eingesetzt und in einer zweiten PCR dann der Vorwärts-b-Primer (vorw b-Primer) mit dem Rückwärts-Primer.

Jede Verdünnungsstufe wurde doppelt bestimmt und jede PCR lief unter dem für die eingesetzten Primer optimalen PCR-Protokoll. Anhand der Verdünnungskoeffizienten und der  $C_p$ -Werte ermittelt die Light Cycler Software die jeweilige PCR-Effizienz für ein Primerpaar. Der so ermittelte Wert wurde bei jeder relativen Quantifizierung miteinbezogen, so dass diese als Effizienz-korrigiert gilt. Alle Reagenzien entstammen dem „Taq PCR Core Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) und wurden entsprechend den Herstellerangaben wie folgt pipettiert:

Tabelle 12 Pipettierschema der Semi-Nested-PCR mit Einsatz von Vorwärts-a- und Rückwärts-Primern und cDNA aus HT29 oder FEMX-I.

PCR-Puffer (enthält 15mM MgCl <sub>2</sub> )	2,0 µl
Vorwärts-a-Primer	0,1 µl
Rückwärts-Primer	0,1 µl
dNTPs (10mM)	0,4 µl
Taq Polymerase	0,1 µl
PCR-grade H <sub>2</sub> O	15,3 µl
	18,0 µl
eingesetzte cDNA-Lösung	2,0 µl
	20,0 µl

Sämtliche Semi-Nested-PCR liefen unter folgendem Programm:

- initiale Aktivierung der Taq-Polymerase: 6 min 40 Sek. bei 94°C
- 40 Zyklen je:
  - I. Denaturierung: 30 Sek. bei 94°C
  - II. Primer Annealing: 30 Sek. bei 52-55°C (je nach Primerpaar)
  - III. Amplifikation: 60 Sek. bei 72°C

### 3.2.3.8 Normalisierung mittels Kalibrator

Um einen Eichpunkt bei jedem PCR-Lauf zu haben, der immer konstant bleiben sollte, wurde bei jeder PCR ein Kalibrator genutzt. Dieser Kalibrator entstammte aus einer aus der Verdünnungsreihe der Semi-Nested-PCR entnommenen Positivkontrolle des zu amplifizierenden Target-Gens. Die Wahl fiel auf die Probe, die bei einem Cp-Wert erschien, der dem zu erwartenden Cp-Werten der zu untersuchenden Proben entsprach (d.h. bei etwa Cp=20). Dies traf für die Verdünnungsstufen 10<sup>-7</sup> oder 10<sup>-8</sup> zu. Von Variablen in Cp-Werten der Referenz- und Target-Gene musste aufgrund verschiedener PCR-Effizienzen ausgegangen werden. Im Zusammenspiel mit möglichen unterschiedlichen Bindungseffizienzen des Fluoreszenzfarbstoffs waren Unterschiede in der Detektion des Referenz- und des Target-Gens zu erwarten. Um ein normalisiertes Verhältnis zwischen Referenz- und Target-Gen zu erhalten (Normalized Ratio), wurde

das Verhältnis von Referenz- zu Target-Gen der untersuchten Proben durch das Verhältnis des Referenz- und Target-Gens der Kalibratoren geteilt (Technical Note – Light Cycler, 13/2001).

### ***3.2.3.9 Optimierungsverfahren der real-time PCR***

Für jedes Primerpaar wurde am LightCycler ein PCR-Programm etabliert, unter dem keine Nebenprodukte entstanden und die PCR am besten reproduzierbar war. Zur Vermeidung der Entstehung von Nebenprodukten stand der Light Cycler stets in einem separaten Raum, um die ständig bestehende Gefahr der Kontamination der Reagenzien mit DNA-Templates zu vermeiden. Ständiges Reinigen der Gebrauchsinstrumente und der Arbeitsflächen mit 70%igem Ethanol sollte ebenfalls eine Kontamination verhindern. Für den Fall, dass Nebenprodukte aus Primerdimeren bestanden, wurde in manchen Fällen die Primermenge halbiert bzw. geviertelt. Bei nicht effizienten PCR wurde eine Temperaturoptimierung vorgenommen, bis eine Effizienz von mindestens  $E = 1,8$  in der Standardkurve erreicht war, woraus verschiedene Annealing-Temperaturen für die verschiedenen Primerpaare resultierten.

### ***3.2.3.10 Touchdown-PCR***

Bei drei Primerpaaren kam hierbei eine sogenannte Touchdown-PCR zum Einsatz, bei welcher die Primer-Annealing-Temperatur schrittweise erniedrigt wurde. Dies sollte Fehlanlagerungen von Primern innerhalb oder außerhalb der zu amplifizierenden Nukleinsäure vermeiden. Dies geschieht häufig, wenn nur sehr wenig DNA-Template vorgelegt wird. Ist die Annealing-Temperatur zu Anfang der PCR relativ hoch, so geht man davon aus, dass hier die „wahren“ Primerbindungen suffizienter sind als die Fehlbindungen (Don et al. 1991). Wird die Temperatur schrittweise bis zur erwarteten Annealing-Temperatur runterreguliert, so liegt bei dem Zyklus, bei dem sie erreicht wird, wahrscheinlich schon weitaus mehr amplifiziertes Template vor, so dass die Primer nun bei ihrer richtigen Annealing-Temperatur mit weniger Fehlanlagerungen mit der eingesetzten cDNA interagieren.

### ***3.2.3.11 Einsatzmenge der cDNA-Proben***

Alle Reaktionen, bei denen cDNA-Proben aus den Zelllinien verwendet wurden, liefen in 20 µl Glaskapillaren ab. Es wurden 2 µl unverdünnte cDNA und 18 µl Reaktionsgemisch eingesetzt. Die cDNA Proben der in Paraffin-eingebetteten Tumore mussten grundsätzlich 1:10 verdünnt werden, um Nebenprodukte zu verringern. Aufgrund von nun sehr geringen Mengen an Template in der Probe wurden hier 100 µl Kapillaren benutzt, in denen 10 µl verdünnte cDNA und 40 µl Reaktionsgemisch (50 µl Ansatz) eingesetzt wurden.

### ***3.2.3.12 Reaktionsgemische***

Zur Herstellung des PCR-Reaktionsgemisches wurde der „LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green®“-Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) verwendet. Dieser enthielt FastStart Taq-DNA-Polymerase, Nukleotidmix, MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 1 mM) und Sybr Green I®. Der Vorteil der FastStart Taq-Polymerase besteht darin, dass sie mit Aminosäureresten versehen ist, die sie bei Raumtemperatur funktionsunfähig macht. Inkubiert man das PCR-Gemisch vor der eigentlichen Reaktion 5-10 Minuten bei 95°C, werden diese blockierenden Anteile entfernt und die Taq Polymerase aktiviert. Dies verhindert Fehlelongation nach Zugabe der Primer und des Templates noch bei Raumtemperatur. Dem Reaktionsgemisch mussten lediglich noch DNA-Template und Primer zugefügt werden.

### ***3.2.3.13 Herstellung des Master Mix***

Um Pipettierfehler zwischen den Proben zu vermeiden, wurde vor jedem LightCycler-Lauf ein Mastermix aus Primern, „FastStart DNA Master Sybr Green I“ und Wasser hergestellt.

Tabelle 13 Pipettierschema zur Real-Time-PCR am Light Cycler im 20 µl Ansatz (cDNA aus kultivierten Zellen) und 50 µl Ansatz (cDNA aus FFPE-Tumoren).

	<b>20 µl Ansatz</b>	<b>50 µl Ansatz</b>
Vorwärts-b- Primer	0,4 µl	1 µl
Rückwärts-Primer	0,4 µl	1 µl
FastStart DNA Master Sybr Green® I	4,0 µl	10 µl
H <sub>2</sub> O PCR-Grade	13,2 µl	28 µl
	18,0 µl	40 µl
cDNA-Lösung	2,0 µl	10 µl (1:10)

Wurde die Primermenge verändert, wurde dies mit der Menge an zugegebenem PCR-Grade Wasser ausgeglichen. Vom Mastermix wurden 18 bzw. 40 µl in die jeweilige Glaskapillare pipettiert und die cDNA Probe zugefügt. Jedem PCR-Lauf wurde eine Negativkontrolle am Ende hinzugefügt, d.h. in den letzten beiden Kapillaren kam anstelle der cDNA-Probe Wasser (H<sub>2</sub>O PCR-grade) zum Einsatz. Als interne Kontrolle liefen jede Probe, der Kalibrator und die Negativkontrolle als Doppelbestimmungen.

#### ***3.2.3.14 Light Cycler Protokolle***

Alle LightCycler PCR-Läufe begannen mit einer 10-minütigen Denaturierungsphase bei 95°C zur Aktivierung der Taq-Polymerase. Fast jede PCR umfasste eine Zyklenzahl von 50, welche geringfügig um 10 erhöht wurde, sobald zu erkennen war, dass die logarithmische Phase der Amplifikation am Ende der 50 Zyklen nicht beendet werden konnte. Zur Auswertung der Real-Time-PCR, besonders zur Ermittlung des Cp-Wertes musste jede Probe ihr „Plateau“ in der Amplifikation erreicht haben.

Tabelle 14 Light Cycler PCR-Protokolle. Die Zeiten der einzelnen Zyklusphasen wurden je nach Ansatzmenge variiert, die Temperaturen blieben gleich.

	<b>20 µl Ansatz</b>	<b>50 µl Ansatz</b>
<b>Polymerase-Aktivierung</b>		
10 Min. bei 95°C		
<b>Zyklus</b>		
Denaturation	5 Sek. bei 95°C	10-15 Sek. bei 95°C
Primer-Annealing	5 Sek. bei 62-68°C	10-15 Sek. bei 62-68°C
Amplifikation	12 Sek. bei 72°C	24-25 Sek. bei 72°C

Tabelle 15 Annealing-Temperaturen der eingesetzten Primer im 20 µl oder 50 µl Ansatz und Besonderheiten im Einsatz der einzelnen Primerpaare.

<b>Primer</b>	<b>Annealing-Temperatur und Besonderheiten beim Einsatz der Primer</b>
β-Actin 1 und GCNT3 (20 µl)	62°C
β-Actin 2 und GCNT3 (50 µl)	62°C Denaturierung 15 Sek. Annealing 15 Sek. Amplifikation 25 Sek. Primermenge wurde auf ein Viertel reduziert.
ST3O, ST3N und ST6N (20 µl)	Touchdown-PCR 68-62°C
ST3O und ST3N (50 µl)	Touchdown-PCR 68-62°C Denaturierung 15 Sek. Annealing 15 Sek. Amplifikation 25 Sek. Primermenge wurde halbiert
ST6N (50µl)	Touchdown-PCR 68-62°C Denaturierung 10 Sek. Annealing 10 Sek. Amplifikation 24 Sek. Primermenge wurde halbiert.

## 4 ERGEBNISSE

Von den 11 ausgewählten Zelllinien und deren Tumoren konnten alle für die In-vitro-Untersuchung verwendet werden. Bei den dazugehörigen Xenografttumoren hatte sich in manchen Proben eine unzureichende RNA-Qualität dargestellt, so dass in vivo nur acht von elf Zelllinien untersucht werden konnten. Für die Bestimmung der relativen Expression der Glykosyltransferasen in den Zelllinien und den zugehörigen Xenografttumoren wurde ein PCR-Verfahren und ein Programm für das Light-Cycler-System von Roche für jedes Primerpaar entwickelt. Ein abschließender in In-Vitro-In-Vivo-Vergleich wurde bei insgesamt sechs Zelllinien durchgeführt. Diese sechs Zelllinien ließen bei den Voruntersuchungen die größten Expressionsunterschiede in vivo und in vitro vermuten. Die Ergebnisse dieser Arbeit ergeben sich aus den Quantifizierungen der PCR-Produkte. Zum Ausschluss von Kontaminationen in den einzelnen Versuchsaufbauten wurden Negativproben verwendet. Abschließend wurden alle PCR-Produkte sequenziert, um einen definitiven Nachweis der Richtigkeit der Produkte zu haben.

### 4.1 Darstellung der PCR-Produkte

Die Funktionalität der Primerpaare Vorwärts-a und Rückwärts sowie Vorwärts-b und Rückwärts der jeweiligen Glykosyltransferasen wurde zunächst mit einer PCR im Thermocycler mit von HT29 und HT29mdr eingesetzter cDNA überprüft und in der Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (siehe Abbildung 4).

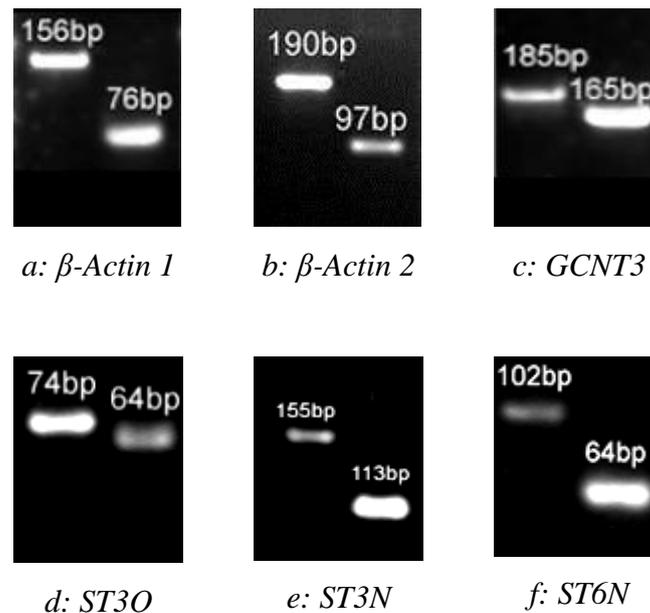


Abbildung 4 a-f Darstellung der PCR-Produkte aller untersuchten Glykosyltransferasen und der Housekeeping-Gene  $\beta$ -Actin 1 und 2 im Agarose-Gel. Die Zahlenangabe beschreibt die Amplifikatlänge in „basepairs“. Die linke Bande ist das längere PCR-Produkt aus den Vorwärts-a und Rückwärts. Die rechte Bande stellt das kürzere Amplifikat aus Primer Vorwärts-b und Primer Rückwärts dar. Das jeweils rechte PCR-Produkt wurde mittels Real-Time-PCR im Vergleich zum Housekeeping-Gen relativ quantifiziert. Das linke PCR-Produkt diente zur Erstellung der Standardkurven und als Positivkontrolle für die Real-Time-PCR mit den Primern Vorwärts-b und Rückwärts. a: PCR-Produkte  $\beta$ -Actin 1, links Vorwärts-a und Rückwärts-Primer (156 basepairs), rechts Amplifikat aus Semi-Nested-PCR (76 basepairs). b: PCR-Produkte  $\beta$ -Actin 2, links Vorwärts-a und Rückwärts-Primer (190 basepairs), rechts Amplifikat aus Semi-Nested-PCR (97 basepairs). c: PCR-Produkte GCNT3, links Vorwärts-a- und Rückwärts-Primer (185 basepairs), rechts Amplifikat aus Semi-Nested-PCR (165 basepairs). d: PCR-Produkte ST3O, links Vorwärts-a- und Rückwärts-Primer (74 basepairs), rechts Amplifikat aus Semi-Nested-PCR (64 basepairs). e: PCR-Produkte ST3N, links Vorwärts-a- und Rückwärts-Primer (155 basepairs), rechts Amplifikat aus Semi-Nested-PCR (113 basepairs). f: PCR-Produkte ST6N, links Vorwärts-a- und Rückwärts-Primer (102 basepairs), rechts Amplifikat aus Semi-Nested-PCR (64 basepairs).

In jeder ersten PCR mit einem neuen Primerpaar wurde eine Negativkontrolle aus der cDNA-Synthese (fehlende Reverse Transkriptase im Reaktionsansatz) mitgeführt. So konnte sicher gegangen werden, dass keine genomische DNA, sondern nur das in cDNA umgeschriebene mRNA-Level amplifiziert wurde.

## 4.2 Effizienzen der Primerpaare

Für jedes Primerpaar wurde durch die Standardkurvenerstellung eine Amplifikationseffizienz und ein Amplifikationsfehler ermittelt. Diese werden in Tabelle 16 dargestellt. Aus jeder Verdünnungsreihe wurde die Verdünnungsstufe ausgewählt, deren Cp-Wert, bei Einsatz in erneuter Real-Time-PCR mit dem Primerpaar Vorwärts-b und Rückwärts, bei etwa  $C_p = 25$  lag, um diese als Positiv- und Lauf-zu-Lauf-Kontrolle (Kalibrator) zu verwenden.

Tabelle 16 Primereffizienzen und Fehler aller Primerpaare Vorwärts-b und Rückwärts im 20  $\mu$ l und 50  $\mu$ l Ansatz ermittelt im Zuge der Standardkurvendarstellung.  
\*Kalibrator: Für jedes Primerpaar wurde eine Verdünnungsstufe festgelegt, welche in den folgenden Real-Time-PCR mit dem Primerpaar Vorwärts-b und Rückwärts als Kalibrator und Positivkontrolle diene.

	<b><math>\beta</math>-Actin 1/2</b>		<b>GCNT3</b>		<b>ST3O</b>		<b>ST3N</b>		<b>ST6N</b>	
	20 $\mu$ l	50 $\mu$ l	20 $\mu$ l	50 $\mu$ l	20 $\mu$ l	50 $\mu$ l	20 $\mu$ l	50 $\mu$ l	20 $\mu$ l	50 $\mu$ l
<b>Effizienz</b>	1.91	1.93	2.26	1.88	1.80	1.88	1.86	1.92	1.90	1.94
<b>Fehler</b>	0.029	0.012	0.014	0.036	0.047	0.019	0.020	0.009	0.004	0.020
<b>Kalib.*</b>	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-8}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$

### **4.3 $\beta$ -Actin als Referenzgen**

Bei Referenz- oder Housekeeping-Genen kann davon ausgegangen werden, dass sie in jeder Zelle, unabhängig des Zellzyklus gleich exprimiert werden, da sie zur Erhaltung der Grundfunktion der Zelle benötigt werden. Das in dieser Arbeit genutzte Referenzgen  $\beta$ -Actin ist für die Aufrechterhaltung und Kinetik des Zytoskeletts von Bedeutung (Thellin et al. 1999).

Housekeeping-Gene dienen bei der Quantifizierung der Real-Time-PCR-Produkte der Normierung. Das heißt, alle Variablen, die eine PCR beeinflussen (Gewebequalität, RNA-Variabilität, Reverse Transkriptase und PCR Effizienzen, Pipettierfehler etc.), schlagen sich sowohl auf das Referenz-Gen, als auch auf das Target-Gen nieder. Das Verhältnis beider zueinander bleibt jedoch gleich. Zudem können Housekeeping-Gene als Positivkontrolle genutzt werden, da sie stets hohe Expressionslevel aufweisen (Huggett et al. 2005).

Für die verschiedenen Ausgangsmaterialien (Zellen aus Kulturmedium und paraffinierte Tumore) sind zwei verschiedene Primerpaare für  $\beta$ -Actin zum Einsatz gekommen. Das Primerpaar  $\beta$ -Actin 1 wurde nur als Referenz in den Untersuchungen zu den kultivierten Zelllinien eingesetzt. Das Primerpaar  $\beta$ -Actin 2 wurde als Referenz für die Amplifizierung der Gene aus den Xenografttumorproben ausgewählt. Zelllinien und Tumore, in denen keine Actinexpression nachgewiesen werden konnte, mussten so wegen mangelnder Vergleichbarkeit von Folgeuntersuchungen ausgeklammert werden.

#### **4.3.1 $\beta$ -Actin-1-Expression in kultivierten Zellen**

In den Kulturzellen konnte in allen Zelllinien eine hohe  $\beta$ -Actin-1-Expression nachgewiesen werden. Es zeigte sich kontinuierlich ein gleich bleibendes Expressionslevel mit Cp-Werten von Cp = 11-16.

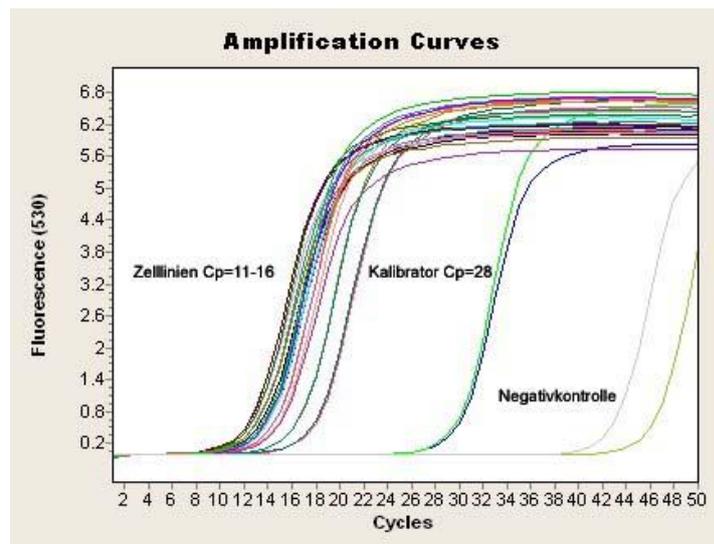


Abbildung 5 Real-Time-PCR mit Darstellung der  $\beta$ -Actin-1-Expression in kultivierten Zellen. Die cDNA-Proben der Zelllinien erreichten die Nachweis-Schwelle bei Zyklus 11-16. Der Kalibrator beginnt, gut davon zu differenzieren, bei Zyklus 28 die logarithmische Amplifikationsphase. Auch in der Negativkontrolle scheint verspätet eine Amplifikation statt zu finden. In der anschließenden Schmelzkurvenanalyse zeigten sich jedoch abweichende  $T_m$ -Werte ( $\beta$ -Actin 1  $T_m=87^\circ\text{C}$ ), so dass nicht davon auszugehen ist, dass hier die Amplifikation des PCR-Produkts  $\beta$ -Actin 1 die Kurven ansteigen lässt.

### 4.3.2 $\beta$ -Actin-2-Expression im Xenografttumor

Als Referenzgen für die in vivo gewachsenen Zelllinien wurde  $\beta$ -Actin 2 verwendet. Durch die Heterogenität des in Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Tumorgewebes ergab sich ein uneinheitlicheres Bild im  $\beta$ -Actin-2-Expressionslevel. Hier variierten die Cp-Werte der verschiedenen Proben bei Cp=25-31. Stets zeigte sich ein einheitliches Produkt in der Schmelzkurvenanalyse bei  $T_m=86^\circ\text{C}$ .

#### 4.3.2.1 $\beta$ -Actin-2-Expression in murinen Zellen

Eine  $\beta$ -Actin-2-Expression konnte im Kontrollversuch auch in murinen Leukozyten nachgewiesen werden. Zum Vergleich der  $\beta$ -Actin-2-Expression im humanem

Tumorgewebe und im Mausblut wurden von jeder Probe die gleiche Menge an RNA (25 ng x 11µl) in cDNA umgeschrieben und 1:10 verdünnt im 50µl Ansatz erneut in der LightCycler-PCR eingesetzt. Hier lagen die Cp-Werte beider Proben derart weit auseinander (> 22 Zyklen), dass eine etwaige Amplifikation von  $\beta$ -Actin 2 aus Maus-DNA bei der späteren relativen Quantifizierung außer Acht gelassen werden konnte (s. Tabelle 17). Eine Expression der untersuchten Glykosyltransferasen wurde in den murinen Zellen nicht nachgewiesen.

Tabelle 17  $\beta$ -Actin-2-Expression in Maus-RNA und humaner RNA im Vergleich. Die Ausgangsmenge an in cDNA umgeschriebener RNA war gleich, jedoch war aus Maus-Leukozyten nur eine außer Acht zu lassende Menge an  $\beta$ -Actin 2 zu amplifizieren.

<b>Probe</b>	<b>Cp-Wert</b>
Kalibrator $\beta$ -Actin 2	27.70
MCF7 275ng RNA $\beta$ -Actin 2	11.42
CaCo 275 ng RNA $\beta$ -Actin 2	11.35
Maus 275ng RNA $\beta$ -Actin 2	34.66
MCF7 275ng RNA $\beta$ -Actin 2 1:10 (50µl)	16.15
CaCo 275 ng RNA $\beta$ -Actin 2 1:10 (50µl)	14.72
Maus 275ng RNA $\beta$ -Actin 2 1:10 (50µl)	38.45
Negativkontrolle	-

#### **4.4 Expressionen der Glykosyltransferasen**

Kultivierte Zellen und Xenografttumore aller untersuchten Zelllinien wurden auf die Expression der Glykosyltransferasen hin untersucht. An drei verschiedenen Tagen wurde RNA aus den Kulturzellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. In allen Proben wurde in Doppelbestimmung (n=6 pro Zelllinie) die Expression der Glykosyltransferasen bestimmt und relativ quantifiziert. Dabei wurden in allen Zelllinien Expressionen mindestens einer Glykosyltransferase gezeigt.

Bezüglich der Xenografttumore wurde aus drei verschiedenen Tumoren einer Zelllinie RNA isoliert und ebenfalls in Doppelbestimmung (n=6) die Expression der Glykosyltransferasen bestimmt. Die Expressionen in kultivierten Zellen und Tumoren wurden in unterschiedlichen Real-Time-PCR-Läufen untersucht. Ein direkter Vergleich konnte so nicht sicher gezogen werden, da es zu Schwankungen der concentration ratios zwischen den einzelnen Läufen kam.

Zum direkten In-Vitro-In-Vivo-Vergleich der Expressionen wurden die cDNA-Proben ausgesuchter Zelllinien als kultivierte Zellen und Xenografttumore in einer gemeinsamen Real-Time-PCR eingesetzt. Die Wahl fiel auf Zelllinien, die in den Voruntersuchungen einen Unterschied der Expression einer Glykosyltransferase in kultivierten Zellen und im Xenografttumor vermuten ließen.

#### 4.4.1 Expressionen der Glykosyltransferasen in vitro

Folgend wird die relative Expression aller untersuchten Glykosyltransferasen in allen Zelllinien tabellarisch gezeigt.

+++	bedeutet hierbei eine im Vergleich <i>starke</i> Expression.
++	bedeutet zwar eine eindeutige, aber nur <i>moderate</i> Expression.
+	beschreibt eine erkennbare, aber im Vergleich zu anderen positiven Werten <i>schwache</i> Expression.
-	kennzeichnet Proben ohne Expression der jeweiligen Glykosyltransferase.

Die im folgenden Teil angegebenen relativen Expressionswerte (RE und MRE) sind nur innerhalb der Messungen an einer Glykosyltransferase vergleichbar. Aussagen zu Expressionsunterschieden unter den einzelnen Glykosyltransferasen zueinander können, aufgrund von Divergenzen zwischen den einzelnen PCR-Messungen, nicht sicher getroffen werden.

Tabelle 18 Relative Expression der Glykosyltransferasen in allen kultivierten Zelllinien (in vitro). In Klammern hinter der Zelllinie die Anzahl der SCID-Mäuse, die nach i.v.-Injektion der Zelllinie Metastasen ausbilden.

Zelllinien	Relative Expression der Glykosyltransferasen				
	$\beta$ -Actin 1	GCNT3	ST3O	ST3N	ST6N
HT29 (9/9)		+++	+++	++	++
HT29 mdr		++	++	++	++
CaCo2 (2/8)		+	+	++	++
SW480 (0/8)		-	+	++	+
T47D (6/6)		-	++	++	++
MCF7 (6/8)	+++	-	++	++	-
HBL100 (0/4)		-	++	++	+
LOX (8/8)		-	++	+++	-
FEMX-I (7/10)		-	++	+++	+++
MeWo (6/10)		-	-	++	-
MV3 (8/10)		-	++	+++	+++

#### 4.4.1.1 GCNT3-Expression in kultivierten Zellen

Eine GCNT3-Expression in den Zelllinien konnte ausschließlich in den Zellen mit Ursprung im Kolongewebe nachgewiesen werden. In den Zelllinien HT29, HT29mdr, CaCo-2 und SW480 zeigte sich in der Schmelzkurvenanalyse ein Amplifikat bei  $T_m=85.5^\circ\text{C}$  gleich der Positivkontrolle. In den restlichen Zelllinien konnte kein einheitliches Produkt amplifiziert werden.

In der relativen Quantifizierung überragte die GCNT3-Expression in HT29 mit einer Mittleren relativen Expression von  $\text{MRE} = 7776.7$  deutlich die Expression in HT29mdr, CaCo2 und SW480.

Es zeigte sich eine etwa 15fach höhere Expression von GCNT3 in HT29 als in der weniger metastasierenden „Schwesterzelllinie“ HT29mdr ( $\text{MRE} = 533$ ). Im Vergleich zu der schwach metastasierenden Zelllinie CaCo-2 war die Expression in HT29 um das

30fache erhöht. Eine Expression in SW480 war ebenfalls eindeutig nachzuweisen. Die Werte der relativen Quantifizierung mit  $MRE = 2.69$  waren im Vergleich niedrig. Alle gemessenen Unterschiede waren mit  $p < 0.05$  signifikant.

#### **4.4.1.2 ST3O-Expression in kultivierten Zellen**

Eine ST3O-Expression ließ sich reproduzierbar in allen Zelllinien nachweisen. Der  $T_m$ -Wert der PCR-Produkte lag bei  $81^\circ\text{C}$ . Auch hier zeigte sich im Vergleich aller Zelllinien eine sehr starke relative Expression in der Kolonkarzinomlinie HT29.

Im Vergleich der Kolonkarzinomzelllinien HT29, HT29mdr, CaCo2 und SW480, war eine deutlich vermehrte ST3O-Expression in der stark metastasierenden Zelllinie HT29 festzustellen. Die relative Expression lag bei  $MRE=542.5$ , wobei in den restlichen Zelllinien kaum ein Unterschied zu beobachten war. Hier lagen alle relativen Expressionswerte bei  $MRE < 10$ . Es lag, verglichen mit den restlichen untersuchten Kolonkarzinomzellen, eine um mindestens das 50fache erhöhte ST3O-Expression in HT29-Zellen vor.

Eine ähnlich starke ST3O-Expression in einer einzelnen Zelllinie, wie in HT29 in den Kolonkarzinomzellen, ließ sich in den Mammakarzinomzelllinien nicht nachweisen. Hier lagen alle relativen Expressionswerte in ähnlichen Bereichen ( $RE = 8.2-39.2$ ), jedoch mit einer erhöhten Expression in MCF7 ( $MRE = 34.2$ ) und T47D ( $MRE = 25.0$ ) im Vergleich zu HBL100 ( $MRE = 8.7$ ).

In den Melanomzelllinien ließ sich ebenfalls keine deutlich vermehrte Expression in einer bestimmten Zelllinie nachweisen. Im Vergleich zu den Mammakarzinomzellen zeigt sich jedoch eine höhere ST3O-Expression in den Melanomzellen ( $RE = 22.9-63.9$ ). Das Expressionslevel in HT29 wurde aber auch hier nicht erreicht. Einzig in der Zelllinie MeWo konnte keine ST3O-Expression nachgewiesen werden. Alle gemessenen Unterschiede in den relativen Expressionen waren signifikant ( $p < 0.05$ ).

#### **4.4.1.3 ST3N-Expression in kultivierten Zellen**

Die ST3N-Expression zeigte in den kultivierten Zellen ein einheitliches Level. In allen untersuchten Zelllinien war eine Expression reproduzierbar festzustellen. Das PCR-Produkt hatte in der Schmelzkurvenanalyse eine Zerfallstemperatur von  $T_m = 87^\circ\text{C}$ . Im

Vergleich aller Zelllinien zeigten die Melanomazellen das höchste Expressionslevel. Eine Zelllinie, in der deutlich vermehrt ST3N exprimiert wurde, hob sich hier nicht hervor.

In den Kolonkarzinomzelllinien war ein stetiges ST3N-Expressionslevel von RE = 0.1–1.0 festzustellen. Gleich den Kolonkarzinomzelllinien konnte in den Mammakarzinomzellen kein signifikanter Unterschied der ST3N-Expression zwischen den metastasierenden und nicht-metastasierenden Zelllinien gezeigt werden. Alle Expressionen lagen bei RE = 0.1–0.66.

Die ST3N-Expression war in den Melanomzelllinien im Vergleich zu den restlichen Zelllinien um etwa das 10fache gesteigert. Hier lagen die Expressionen bei RE = 2.1–4.6. Innerhalb der Melanomzellen zeigte sich eine vermehrte Expression in der metastasierenden Zelllinie FEMX-I (MRE = 4.3). Die stark metastasierende Zelllinie LOX zeigte eine etwas geringere, aber dennoch hohe ST3N-Expression (MRE = 2.9). MV3 exprimierte ST3N auf ähnlichem Level wie LOX (MRE = 2.6). MeWo zeigte im Vergleich geringe Expressionswerte (MRE = 0.2). Insgesamt war die im Vergleich stark erhöhte ST3N-Expression in den Melanomzellen signifikant ( $p < 0.05$ ).

#### ***4.4.1.4 ST6N-Expression in kultivierten Zellen***

Eine ST6N-Expression ließ sich nicht durchgängig in allen Zelllinien nachweisen, z.B. nicht in LOX, MeWo (Melanome) und MCF7 (Mammakarzinom). In den restlichen Zelllinien zeigte sich in der Schmelzkurvenanalyse ein einheitliches Produkt bei  $T_m = 82^\circ\text{C}$ .

In allen Kolonkarzinomzelllinien war eine ST6N-Expression zu verzeichnen. Diese lag im Vergleich zu den Melanomzelllinien auf einem ähnlichen Level mit relativen Expressionswerten von RE = 0.1–2.0. Signifikant erhöhte Expressionswerte einer bestimmten Zelllinie waren nicht festzustellen.

Dem gegenüber zeigte sich die ST6N-Expression in den Melanomzellen mit Expressionswerten von RE = 1.4–28.8 erhöht. Eine signifikant verstärkte Expression war in FEMX-I (MRE = 7.2) zu messen. Auch zeigte MV3 hohe Expressionswerte (MRE = 16.2) wenn auch zu einer vermehrten ST6N-Expression durch eine große Streuung (relative Expressionswerte von RE = 4.2–28.8) keine signifikante Aussage zu treffen war. MeWo zeigte reproduzierbar eine ST6N-Expression. Mit relativen

Expressionswerten von  $RE < 0.1$  richtete sich diese jedoch gegen Null. In LOX konnte in keiner Messung ST6N-mRNA nachgewiesen werden.

In den Mammakarzinomen wurde ST6N im Vergleich zu MCF7 und HBL100 im stark metastasierenden T47D ( $MRE = 2.1$ ) am meisten exprimiert. Mit  $p > 0.05$  war hierüber jedoch keine signifikante Aussage zu treffen. In MCF7 konnte in keiner Messung ST6N-mRNA nachgewiesen werden. In HBL100 war in zwei von drei Messungen ST6N mRNA zu amplifizieren ( $MRE = 0.2$ ), jedoch in etwa 10fach geringerer Menge als in T47D in der gleichen PCR. Insgesamt war das Expressionslevel ähnlich dem der Kolonkarzinomzellen.

#### 4.4.2 Expression der Glykosyltransferasen im Xenografttumor

Wie in Kap. 3.2.1.2 beschrieben, wurde RNA aus im Xenograftmodell gewachsenen Tumoren isoliert. Zur exemplarischen Darstellung wurden ein HT29-Tumor, ein HT29mdr-Tumor und ein MCF7-Tumor im Paraffinblock zuvor geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt.

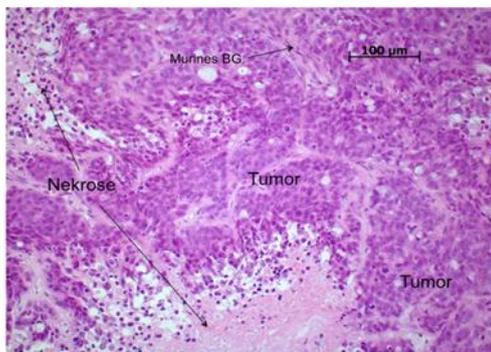


Abbildung 6 a

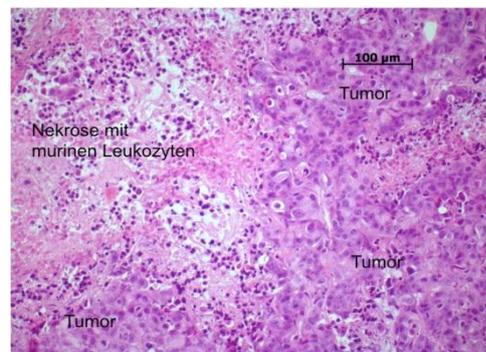


Abbildung 6 b

Abbildung 6 a und b. a - HT29 (Kolon-Ca) Xenografttumor in SCID-Maus gewachsen in HE-Färbung. b - MCF-7 (Mamma-Ca) Xenografttumor in SCID-Maus gewachsen in HE-Färbung. Erkennbar sind solides Tumorgewebe und anteilige Nekrosen in allen Tumoren. Die Darstellung verdeutlicht, dass durch anteilige Nekrosen im Tumor, wahrscheinlich auch stets Anteile degradierter RNA vorliegen, was zum Teil zum Ausschluss mancher Xenografttumoren von Zelllinien führte.

Es stellte sich heterogenes Gewebe (Tumorgewebe, murines Bindegewebe und Leukozyten und Nekrosen) dar, weshalb alle Primer der Glykosyltransferasen an muriner cDNA getestet wurden (s. Kap. 4.3.2.1).

Die Expression der Glykosyltransferasen im Xenografttumor ist tabellarisch dargestellt. Wie in Kap. 4.4.1 beschrieben, sind die Expressionen mit + + +, + +, + und – gekennzeichnet. Nicht alle Zelllinien, die als Kulturzellen untersucht wurden, konnten auch als Xenografttumor untersucht werden. Aufgrund der großen Heterogenität der Xenografttumore war die Qualität der isolierten RNA in manchen Fällen unzulänglich, so dass in den Zelllinien CaCo2, T47D, MeWo und LOX keine reproduzierbaren Ergebnisse bereits bei der  $\beta$ -Actin-2-Expression möglich waren.

Tabelle 19 Relative Expression der Glykosyltransferasen und  $\beta$ -Actin 2 im Xenografttumor gewachsen in SCID-Mäusen. In Klammern dahinter die Anzahl an SCID-Mäusen die nach i.v.-Injektion der Zelllinie Metastasen gebildet haben.

Zelllinien	Relative Expression der Glykosyltransferasen				
	$\beta$ -Actin 2	GCNT3	ST3O	ST3N	ST6N
HT29 (9/9)		+++	+++	+	
HT29 mdr		-	+	+	+++
SW480 (0/8)		-	+	-	-
MCF7 (6/8)	+++	-	-	++	++
HBL100 (0/4)		-	-	+	+
FEMX-I (7/10)		-	+	++	+
MV3 (8/10)		-	+	+	-
MeWo (6/10)		-	-	-	+

#### 4.4.2.1 GCNT3-Expression im Xenografttumor

In den Xenografttumoren konnte ausschließlich eine GCNT3-Expression in HT29 nachgewiesen werden. Ein Produkt gleichen  $T_m$ -Wertes ließ sich zwar auch aus HT29mdr amplifizieren, jedoch war dies stets mit Nebenprodukten verunreinigt, so dass

sich hier eine GCNT3-Expression vermuten ließ, aber nicht sicher quantifiziert werden konnte. Da bei der Untersuchung der Kulturzellen nur in Kolonkarzinomzellen eine Expression gefunden wurde, wurden hier nur exemplarisch zwei Melanomlinien mit vermessen, in denen sich jedoch weiterhin keine GCNT3-Expression verzeichnen ließ.

#### ***4.4.2.2 ST3O-Expression im Xenografttumor***

Im Xenografttumor konnte die im Vergleich hohe ST3O-Expression in HT29 (MRE = 2122.0), die bereits in den kultivierten Zellen zu verzeichnen war, wiederholt gezeigt werden. Deutliche, aber im Vergleich zu HT29 nur mäßige Expressionen waren auch in HT29mdr (MRE = 58.1), FEMX-I (MRE = 50.9), MV3 (MRE = 13.3) und SW480 (MRE = 22.0) festzustellen. In den Xenografttumoren aus MCF7 und HBL100 konnte keine ST3O-mRNA nachgewiesen werden. Alle Aussagen waren mit  $p < 0.05$  signifikant.

#### ***4.4.2.3 ST3N-Expression im Xenografttumor***

In der Messung zur ST3N-Expression im Xenografttumor zeigte sich eine deutlich gesteigerte Expression im Tumor der Zelllinie MCF7 (MRE = 217.0). Im Vergleich mit HBL100 (MRE = 22.0) war hier die ST3N-Expression in MCF7 signifikant ( $p < 0.05$ ) gesteigert. Das Expressionslevel in den Kolonkarzinomen HT29 (MRE = 19.1) und HT29mdr (MRE = 12.0) zeigte keine deutlichen Veränderungen. In SW480 konnte keine ST3N-mRNA nachgewiesen werden. Verglichen mit den kultivierten Zellen der Zelllinie MCF7 ließ sich eine gesteigerte ST3N-Expression im Xenografttumor vermuten. In den Melanoma-Xenografttumoren konnte die vermehrte Expression in FEMX-I (MRE = 232.4), die bereits in den Kulturzellen auffiel, bestätigt werden. Eine mäßige Expression (MRE = 40.7) ließ sich im MV3-Xenografttumor feststellen. Entsprechend den Messungen mit Kulturzellen exprimierte auch im Xenografttumor FEMX-I mehr der ST3N als MV3 ( $p < 0.05$ ). Eine ST3N-Expression in MeWo konnte hier nicht mehr festgestellt werden.

#### **4.4.2.4 ST6N-Expression im Xenografttumor**

Eine signifikant ( $p < 0.05$ ) gesteigerte ST6N-Expression stellte sich im HT29mdr-Xenografttumor (MRE = 11.0E4) dar. Die Expressionslevel in HT29 (MRE = 912.6), HBL100 (MRE = 175.9), MCF7 (MRE = 491.2), MeWo (MRE = 88.1) und FEMX-I (MRE = 104.3) blieben deutlich unter dem von HT29mdr. In SW480 und MV3 ließ sich keine ST6N-mRNA nachweisen. Verglichen mit den Ergebnissen der ST6N-Expression in den kultivierten Zellen, konnte hier eine gesteigerte Expression im HT29mdr Tumor vermutet werden. Im FEMX-I- und MV3-Tumor war im Vergleich zu den Expressionswerten in den kultivierten Zellen von einer verminderten ST6N-Expression auszugehen.

#### **4.4.3 Expression der Glykosyltransferasen in vivo versus in vitro**

Um die Expression der Glykosyltransferasen im Xenografttumor und in Kulturzellen einer Zelllinie direkt vergleichen zu können, wurden die Proben erneut untersucht, die in den Voruntersuchungen eine unterschiedliche Expression in Kulturzellen und im Xenografttumor vermuten ließen. Hier wurden die In-Vitro- und In-Vivo-Proben in einem gemeinsamen PCR-Lauf untersucht. So wurde ausgeschlossen, dass gemessene Expressionsunterschiede nicht durch Lauf-zu-Lauf-Abweichungen verursacht waren. Zwar wurden jedem Lauf Kalibratoren beigefügt, die eine Lauf-zu-Lauf-Kontrolle bieten sollten, jedoch zeigten diese vermehrt unterschiedliche Cp-Werte. Hieraus resultierten unterschiedliche concentration ratios in den verschiedenen PCR-Analysen zur Expression einer Glykosyltransferase, so dass diese nicht mehr direkt vergleichbar waren. Es wurden wiederholt zwei Chargen aus Kulturzellen in Doppelbestimmung zusammen mit Proben aus drei Xenografttumoren in Doppelbestimmung zu einer Glykosyltransferase untersucht, was einen direkten Vergleich bieten sollte.

In Tabelle 19 sind die Zelllinien dargestellt, in denen unterschiedliche Expressionen in vivo und in vitro zu vermuten waren. Ebenso wurden solche Zelllinien im direkten Vergleich gemessen, in denen sich bereits in vitro im Vergleich zu den anderen Zelllinien eine deutlich vermehrte Expression erkennen ließ. Über eine ähnlich gesteigerte Expression in vivo sollte so eine Aussage getroffen werden.

Tabelle 20 Vergleichsdarstellung der Expressionen der Glykosyltransferasen in Kulturzellen und im Xenografttumor ausgewählter Zelllinien. Gelb hinterlegt ist die Kombination aus Kulturzellen und Xenografttumoren, in denen die entsprechende Expression der Glykosyltransferase in einem gemeinsamen PCR-Lauf gemessen wurde und so direkt vergleichbar war.

	<b>GCNT3</b>		<b>ST3O</b>		<b>ST3N</b>		<b>ST6N</b>	
	Kultur	Tumor	Kultur	Tumor	Kultur	Tumor	Kultur	Tumor
HT29	+++	+++	+++	+++	++	+	++	++
HT29 mdr	++	-	++	+	++	+	++	+++
MCF7	-	-	++	+	+	+++	-	++
FEMX-I	-	-	++	+	+++	+++	+++	+
MV3	-	-	++	+	+++	++	+++	-

#### 4.4.3.1 GCNT3-Expression in vivo versus in vitro

Für den direkten Vergleich der GCNT3-Expression wurden die Zelllinien HT29 und HT29mdr gewählt. In diesen war eine Expression im Xenografttumor zu verzeichnen. In HT29 war zwar keine Umregulierung der GCNT3-Expression in vivo und in vitro zu vermuten, doch sollte diese Messung als Kontrolle dienen bei zuvor stark erhöhter Expression im Vergleich zu anderen Zelllinien. Diese Messung zeigte wiederholt eine deutlich vermehrte GCNT3-Expression in HT29 im Vergleich zu HT29mdr, sowohl in vivo als auch in vitro. Betrachtet man die Expression in HT29 in Kulturzellen (RE Charge1/Charge2 = 306.0/305.0) und im Tumor, so lässt sich eine verminderte GCNT3-Expression im Tumor feststellen (RE Charge1/Charge2 = 43.0/2.9). In den HT29mdr-Kulturzellen war erneut eine Expression zu quantifizieren (RE Charge1/Charge2 = 6.2/33.0). Im Tumor konnte hier keine Expression mehr gezeigt werden. Diese Aussagen waren mit  $p < 0.0001$  signifikant.

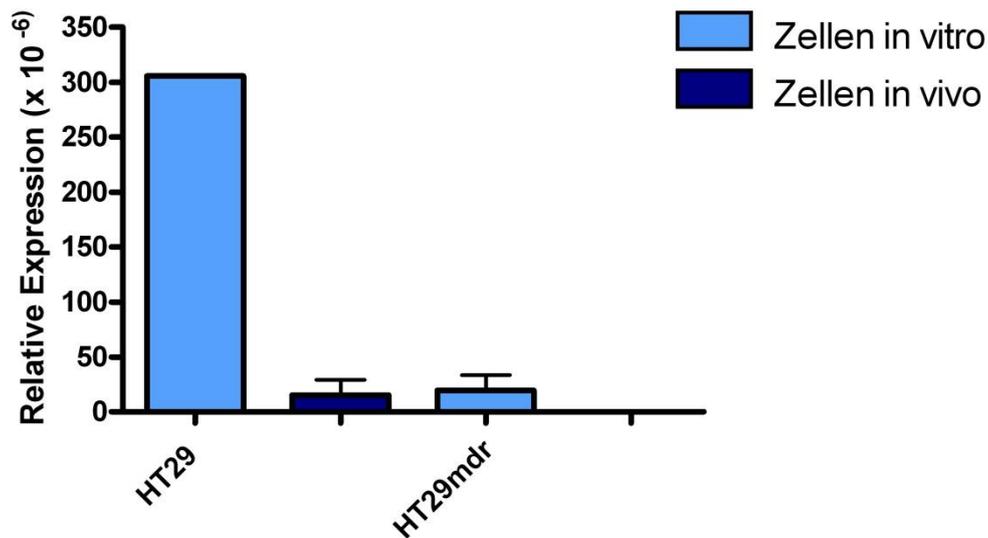


Abbildung 7 Direktvergleich GCNT3-Expression in HT29 und HT29mdr in vivo und in vitro ( $p < 0.0001$ ). Deutlich wurde die ausgeprägte Expression in den HT29 Kulturzellen im Vergleich zu den in vivo gewachsenen Zellen. Weiter auffällig war der Expressionsunterschied zwischen der stark metastasierenden Zelllinie HT29 und der weniger metastasierenden Zelllinie HT29mdr in vitro.

#### 4.4.3.2 ST3O-Expression in vivo versus in vitro

Auch hier wurden als Kontrollversuch HT29 und HT29mdr im direkten Vergleich zur ST3O-Expression untersucht. Die vermehrte Expression in HT29 in der Untersuchung der Kulturzellen ließ sich auch im Xenografttumor vermuten. Die bereits in den Voruntersuchungen zu Kulturzellen und Tumor ermittelte erhöhte ST3O-Expression in HT29 im Vergleich zu HT29mdr konnte bestätigt werden. In der direkten Vergleichsmessung zeigten sich Unterschiede in der Expression in den Kulturzellen und im Tumor. So wurde ersichtlich, dass die ST3O-Expression im HT29-Xenografttumor (RE Charge1/Charge2 = 29500.0/6320.0) deutlich höher reguliert ist als in den HT29-Kulturzellen (RE Charge1/Charge2 = 1870/1030). ST3O-mRNA ließ sich auch in den HT29mdr-Kulturzellen eindeutig nachweisen und quantifizieren, jedoch auf derart niedrigem Niveau, dass es in der Grafik nicht zur Darstellung kam (RE Charge1/Charge2 = 7.4/7.1). Im Vergleich war auch hier eine verstärkte ST3O-Expression in den in vivo gewachsenen HT29mdr-Zellen ersichtlich (RE

Charge1/Charge2 = 279.0/712.0). Alle Aussagen zu unterschiedlichen Expressionen waren mit  $p < 0.05$  signifikant.

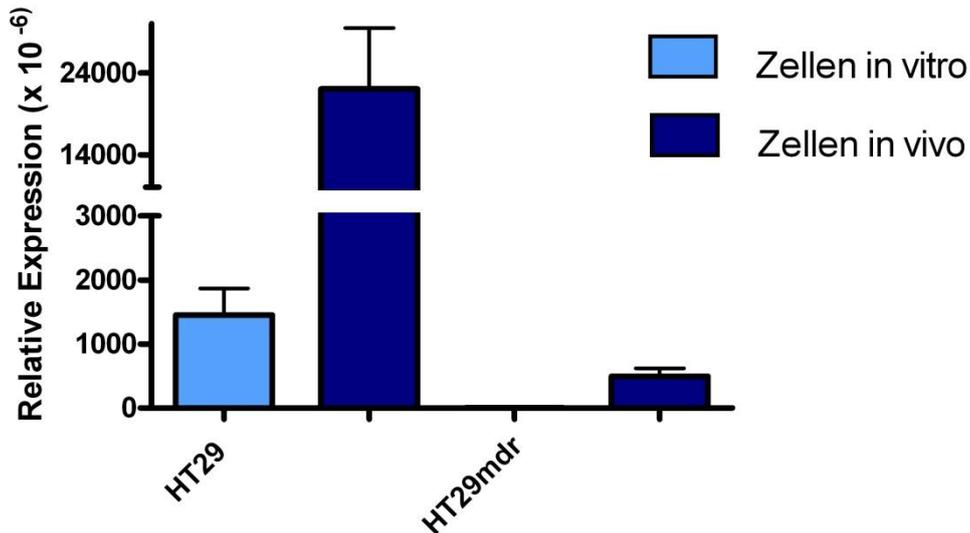


Abbildung 8 Direktvergleich ST3O-Expression in HT29 und HT29mdr in vivo und in vitro ( $p < 0.05$ ). Sowohl in HT29 als auch in HT29mdr war eine höhere Expression in vivo im Vergleich zu in vitro auffällig. Die stärker metastasierende Zelllinie HT29 (9 von 9 SCID-Mäusen bilden Metastasen aus) wies in vivo und in vitro eine höhere Expression auf als die weniger Metastasen bildende Zelllinie HT29mdr.

#### 4.4.3.3 ST3N-Expression in vivo versus in vitro

Für den Direktvergleich der ST3N-Expression wurden die Zelllinien MCF7, FEMX-I und MV3 gewählt. Die Messungen zu den Xenografttumoren ließen eine vermehrte ST3N-Expression im In-Vivo-Modell vermuten. Weiterhin zeigten sich gleiche ST3N-Expressionsverhältnisse in den Kulturzellen von MCF7, FEMX-1 und MV3 (s. Tabelle 18). Erneut ließ sich im Vergleich eine höhere ST3N-Expression in den Melanomzelllinien (FEMX-I: RE Charge1/Charge2 = 26.9/110, MV3 RE Charge1/Charge2 = 67.1/40.0) als in der Mammakarzinomzelllinie MCF7 in vitro (RE Charge1/Charge2 = 6.6/5.9) zeigen. Eine vermehrte Expression im MCF7-Xenografttumor im Vergleich zu den Kulturzellen konnte bestätigt werden (RE Charge1/Charge2 = 250.0/267.0). Auch hier wurde eine deutlich erhöhte Expression in

vivo im Vergleich zu in vitro ersichtlich ( $p < 0.01$ ). In dieser Vergleichsmessung ließ sich in den FEMX-I und im MV3 Tumorproben keine ST3N-cDNA nachweisen. Somit konnte eine vermutete Heraufregulierung der ST3N-Expression im Tumor von FEMX-I und MV3 im Vergleich zur Zellkultur nicht reproduziert werden.

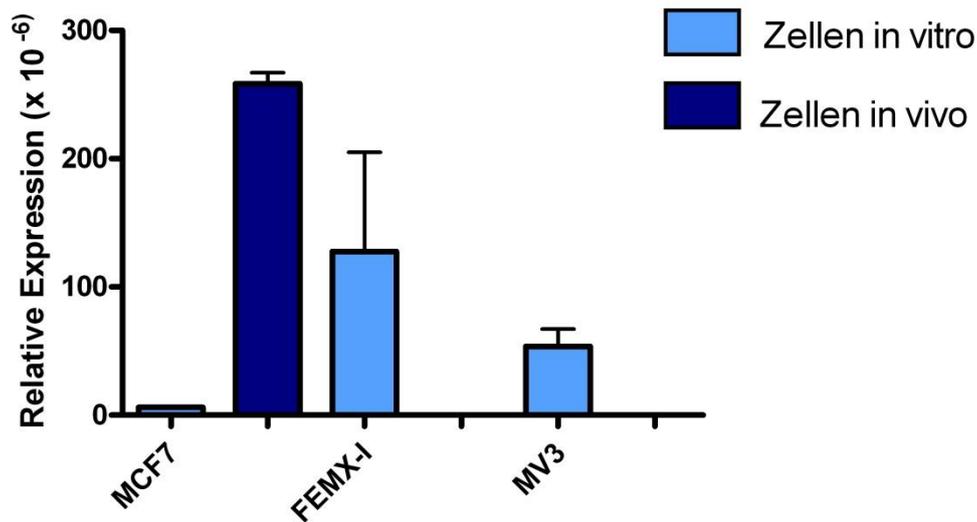


Abbildung 9 Direktvergleich ST3N-Expression in MCF7, FEMX-I und MV3 in vitro und in vivo ( $p < 0.01$ ). Die stark erhöhte ST3N-Expression der Mammakarzinomzelllinie MCF7 mit relativ hohem metastatischem Potential (6 von 8 SCID-Mäusen bilden Metastasen aus) in den im Xenograftmodell gewachsenen Tumorzellen wird deutlich. Die beiden Melanomzelllinien, die ein etwa gleich hohes metastatisches Potential besitzen (FEMX-I: 7 von 10 SCID-Mäusen bilden Metastasen aus; MV3: 8 von 10 SCID-Mäusen bilden Metastasen aus) zeigen lediglich in vitro eine Expression von ST3N. In vivo war hier keine Expression nachzuweisen.

#### 4.4.3.4 ST6N-Expression in vivo versus in vitro

Für die Gegenüberstellung der ST6N-Expression in Zellkultur und Tumor wurden die Zelllinien HT29mdr, FEMX-I und MV3 ausgewählt. Eine im Vergleich hohe ST6N-Expression in HT29mdr in den Tumormessungen ließ eine Heraufregulierung in vivo vermuten. Die deutliche Expression in den FEMX-I und MV3 Kulturzellen konnte im Xenografttumor nicht nachvollzogen werden. Abbildung 10 zeigt den Direktvergleich.

Die ST6N-Expressionsverhältnisse der Kulturzellen HT29 mdr, FEMX-I und MV3 bestätigten sich. Die Melanomzellen FEMX-I (RE Charge1/Charge2 = 73.1/133) und MV3 (RE Charge1/Charge2 = 69.0/95.3) wiesen in vitro eine erhöhte Expression als HT29mdr (RE Charge1/Charge2 = 1.3/2.4) ( $p < 0.01$ ) auf. Eine Heraufregulierung der ST6N-Expression im HT29mdr-Xenografttumor konnte hier nicht gezeigt werden. Die Expressionslevel blieben in vitro (RE s.o.) und in vivo (RE Charge1/Charge2 = 1.7/2.1) annähernd gleich. In den FEMX-I- und MV3-Tumorproben bestätigte sich die Herabregulierung der ST6N-Expression im Vergleich zur Zellkultur ( $p < 0.01$ ).

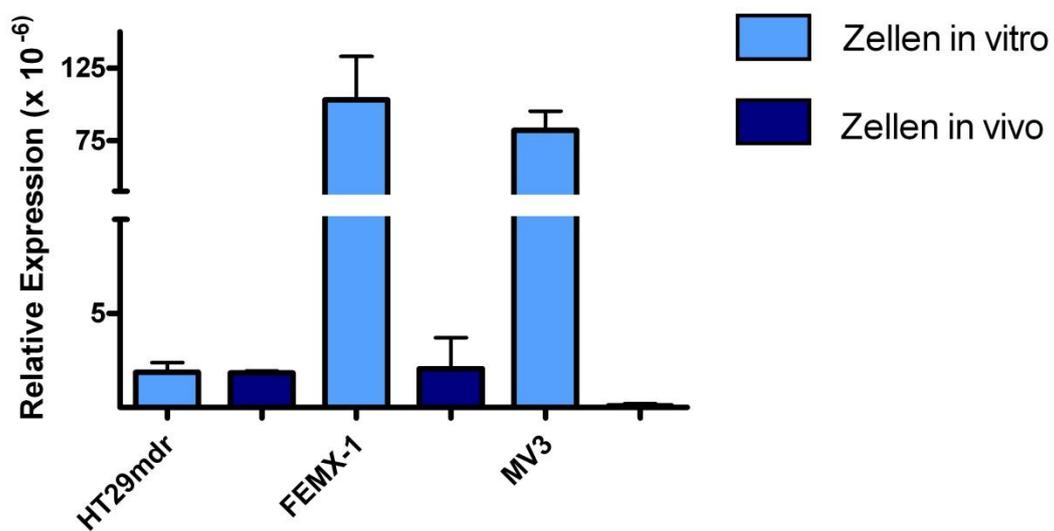


Abbildung 10 Direktvergleich ST6N-Expression in HT29mdr, FEMX-I und MV3 in vivo und in vitro ( $p < 0.01$ ). Hier wurde eine gleichbleibende ST6N-Expression in vivo und in vitro in HT29mdr auffällig. Des Weiteren war auch hier eine im Vergleich zum Xenograftmodell erhöhte Expression in den Melanomzelllinien FEMX-I und MV3 in vitro zu verzeichnen (FEMX: 7 von 10 SCID-Mäusen bilden Metastasen aus; MV3: 8 von 10 SCID-Mäusen bilden Metastasen aus).

#### **4.4.4 Vergleich der Expressionsverhältnisse der Kulturzellen zu in Paraffin eingebetteten Kulturzellen in Agar**

Um sicher zu gehen, dass die Formalinfixierung keinen Einfluss auf die Messergebnisse hatte, wurden von einer metastasierenden und einer weniger metastasierenden Zelllinie in Paraffin eingebettete Kulturzellen in Agar exemplarisch auf die Genexpressionen von GCNT3 hin untersucht. Zum Vergleich wurden HT29 als metastasierende und HT29mdr als weniger metastasierende Zelllinien gewählt. Die in Kultur gewachsenen Zellen wurden in Agar zentrifugiert und in Paraffin eingebettet. RNA wurde, wie in Kap. 3.2.1.2 beschrieben, in gleicher Weise isoliert, wie auch aus dem in Paraffin eingebetteten Tumorgewebe. Zuvor wurde die richtige Zellschicht im Agarkegel durch mehrmaliges Schneiden des Blockes am Microtom und durch anschließende Entparaffinierung und Hämalaun-Färbung des Schnittes ermittelt. Untersucht wurde jeweils eine Probe in Doppelbestimmung (n=2).

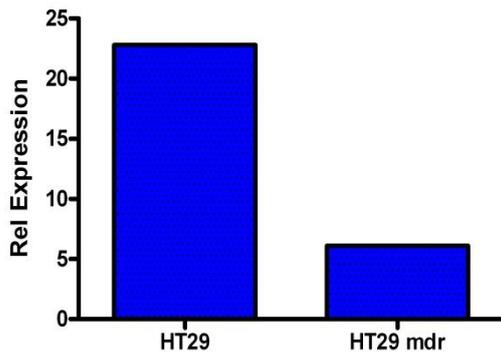


Abbildung 11 a

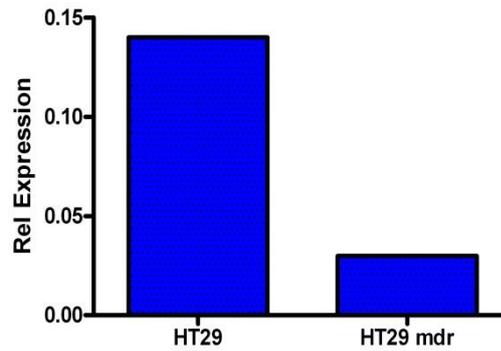


Abbildung 11 b

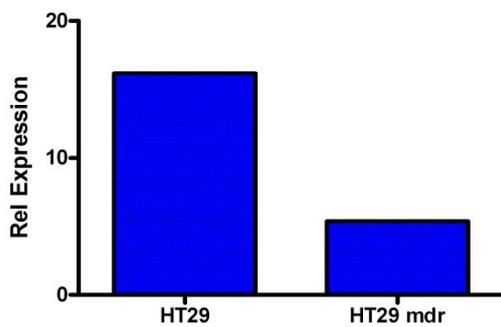


Abbildung 11 c

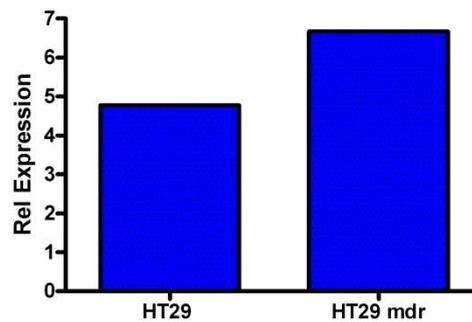


Abbildung 11 d

Abbildung 11a – d. a - GCNT3-Expression in HT29- und HT29mdr-Zellen in Agar, welche in Paraffin eingebettet wurden. Es blieb ein gleiches GCNT3-Expressionsverhältnis zwischen HT29 und HT29mdr bestehen, wie es sich auch zuvor in den kultivierten Zellen gefunden hatte. Die GCNT3-Expression in HT29 blieb gegenüber HT29mdr weiterhin deutlich erhöht. b - ST3O-Expression in HT29- und HT29mdr-Zellen in Agar, die anschließend in Paraffin eingebettet wurden. Durch die veränderte Behandlung der Zellen blieb das ST3O-Expressionsverhältnis zwischen HT29 und HT29mdr bestehen. Auch in den einfach kultivierten Zellen war die ST3O-Expression in HT29 höher. c ST3N-Expression in HT29- und HT29mdr-Zellen in Agar, die anschließend in Paraffin eingebettet wurden. Die in den kultivierten Zellen zuvor bestimmte ST3N-Expression hatte in zwei von drei Proben eine dezent höhere Expression in HT29, wie auch hier gezeigt. Insgesamt befand sich die ST3N-Expression in den kultivierten Zellen jedoch auf einem ähnlichen Level ohne erwähnenswerte Unterschiede. d - ST6N-Expression in HT29- und HT29mdr-Zellen in Agar mit anschließender Einbettung in Paraffin. Die ST6N-Expression in den Zellen in Agar ergab ein ähnliches Bild, wie die in den Kulturzellen. Auch hier exprimierte HT29mdr geringfügig mehr ST6N als HT29.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Expressionsverhältnisse zwischen HT29- und HT29mdr-Zellen in Agar gleich zu denen der allein in Kultur gewachsenen Zellen blieben. Auch wenn die zahlenmäßigen Verhältnisse der relativen Quantifizierung nicht genau reproduzierbar waren, so war doch davon auszugehen, dass die Fixierung in Formalin und Einbettung in Paraffin keine entscheidenden Auswirkungen auf die Expressionsverhältnisse zwischen metastasierenden und weniger metastasierenden Zellen hat. Die hier ermittelten Verhältnisse konnten jedoch mit einer Probenanzahl von  $n=2$  nur als Anhalt zur methodische Kontrolle dienen. Signifikante Aussagen waren hier nicht zu treffen.

## 5 DISKUSSION

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Expressionsanalyse verschiedener Glykosyltransferasen in Karzinomzellen zu betrachten. Weiterhin soll untersucht werden, ob sich ein Zusammenhang mit dem Metastasierungsverhalten einer Zelllinie, ihrem HPA-Bindungsverhalten und den Expressionen der Glykosyltransferasen erkennen lässt und ob Unterschiede zwischen den verschiedenen Tumorentitäten gefunden werden können.

Ein weiterer zu betrachtender Punkt soll der Vergleich zwischen den Genexpressionen im In-Vitro- und In-Vivo-Modell einer Zelllinie sein. Die Expressionen der vier Glykosyltransferasen wurden auf dem Level der messenger-RNA bestimmt. Ob diese jedoch tatsächlich zu einem Enzym synthetisiert wird und auch aktiv ist, lässt sich mit dieser Methodik jedoch nicht feststellen. Es soll jedoch in der Diskussion davon ausgegangen werden, dass eine gesteigerte mRNA-Synthese zu einer erhöhten Enzymkonzentration in der Zelle führt und somit auch zu einer sich verändernden Oberflächenexpression von Glykoproteinen.

### 5.1 Xenografttumor und Real-Time-Quantitative-PCR

Das Xenograftmodell, in dem menschliche Krebszellen in SCID-Mäuse verpflanzt werden und Tumore ausbilden, wird in der Krebsforschung seit den 1970er Jahren zu In-Vivo-Untersuchungen genutzt (Sharkey et al. 1984). Thies et al. (2007) konnten anhand dieses Modells eine Analyse zum Metastasierungspotential verschiedener Zelllinien erstellen, welche in dieser Arbeit eine wichtige Grundlage zur Betrachtung der Ergebnisse bildet. Auch im Hinblick auf Untersuchungen zu Zell-zu-Zell-Interaktionen ist dieses Modell von großem Nutzen.

Um diese Xenografttumore zu archivieren, werden sie größtenteils in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE – formalin fixed paraffin embedded). Die Expressionsanalyse von Genen aus diesem Material verlief in der Vergangenheit jedoch nicht ohne Probleme. Extrahierte RNA ist oft von schlechter Qualität, da sie, bevor die Formalinfixierung abgeschlossen ist, zum Teil degeneriert (Mizuno et al. 1998, Specht

et al. 2002). Da FFPE-Tumoren aber ein großes Archiv für retrospektive Studien darstellen, gibt es Untersuchungen zur RNA-Extraktion aus diesem Material und deren Nachweis und Quantifizierung mittels Real-Time-RT-PCR. So zeigten Specht et al. (2002), dass mit der richtigen RNA-Extraktionsmethodik (Verwendung von Proteinkinase K und Inkubation bei 60-70°C) der Anteil an degenerierter RNA reduziert werden kann. Der in dieser Arbeit verwendete RNA-Extraktionskit berücksichtigt diese Methodik. Macabeo-Ong et al. (2002) konnten bei einer Formalinfixierung nach > 48h einen nachteiligen Effekt auf die Ergebnisse der folgenden Real-Time-RT-PCR feststellen. Wurde diese Zeit nicht überschritten, konnten, verglichen mit frischen Tumorproben, gleiche mRNA-Level reproduzierbar nachgewiesen werden. Nicht alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien konnten auch als Xenografttumor untersucht werden, da sich die aus den FFPE-Tumoren isolierte RNA als nicht für die Real-Time-RT-PCR geeignet erwies. So konnte in diesen Fällen noch nicht einmal ein Expressionslevel für  $\beta$ -Actin 2 ermittelt werden. Dies kann vermutlich vermehrter RNA-Degradierung nach Formalinfixierung zugeschrieben werden.

## **5.2 Vergleich der Genexpressionen in vitro und in vivo**

In der Expressionsanalyse der Glykosyltransferasen soll auch dem Vergleich zwischen kultivierten Zellen und Zellen aus dem Xenograftmodell Aufmerksamkeit zukommen. In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass es zu Abweichungen in der Genexpression von Zellen kommt, sobald sie nicht mehr zweidimensional im Medium der Kulturflasche, sondern im dreidimensionalen Zellverband wachsen. Thijssen et al. (2004) erstellten mittels quantitativer Real-Time-PCR ein Genexpressionsprofil von Angiogenesefaktoren im Xenograftmodell im Vergleich zu vaskulären Zellen, um die Zell-zu-Zell-Interaktion zwischen Tumor- und Nichttumorzellen zu untersuchen. Es wurde gezeigt, dass die quantitative Real-Time-PCR im Zusammenhang mit dem Xenograftmodell als sensitive Methode zur Betrachtung von Zell-zu-Zell-Interaktionen verwendet werden kann.

Auch Montel et al. (2005a) konnten einen induktiven Effekt der Mikroumgebung auf das Genexpressionsprofil von Mammakarzinomzellen nachweisen. Umgekehrt konnten sie ebenso einen Effekt des Tumors auf die Genexpression der Zellen des Wirtes deutlich machen (Montel et al. 2005b).

Auf dieser Grundlage führten wir nach der Erstellung der Expressionsmuster der Glykosyltransferasen in kultivierten Zellen und in Tumorzellen einen direkten In-Vitro-In-Vivo-Vergleich durch. Passend zu den Voruntersuchungen konnte auch hier in den Zelllinien eine Veränderung der Genexpressionsmuster im In-Vitro-In-Vivo-Vergleich nachgewiesen werden.

## **5.3 Expression der Glykosyltransferasen**

### **5.3.1 $\beta$ -1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase 3, mucin type (GCNT3)**

Von den drei Arten der  $\beta$ -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase (L-Typ, M-Typ und I-branching-Typ) wurde in dieser Arbeit der M-Typ (mucin type; EC 2.4.1.102) untersucht. Erstmals beschrieben wurde das Enzym von Schwientek et al. (1998). Sie zeigten, dass es unter den Core2- und Core4-synthetisierenden Enzymen eines gibt, welches sowohl Core2, Core4 als auch das I Antigen synthetisiert.

Die Bildung der O-Glykangrundstrukturen Core2 und Core4 bzw. des I Antigens geschieht durch eine Anheftung von GlcNac an den GalNac-Rest der Core1- bzw. Core3-Struktur in einer  $\beta$ -1,6-Verbindung (Brockhausen et al. 1999, Huan et al. 2006, Schwientek et al. 1999). Hohe Expressionslevel wurden in mucin-produzierenden Zellen gefunden, und besonders in der Kolonkarzinomzelllinie HT29 (Schwientek et al. 1999). Dies konnten wir bestätigen. Die Zelllinie HT29 wies auch in dieser Arbeit sowohl in vitro als auch in vivo die höchsten GCNT3-Expressionen auf.

In der Vergangenheit zeigten mehrere Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen der GCNT3-Expression in Tumorzellen und deren Metastasierungspotential. Es wurde berichtet, dass die Core2-Struktur bzw. die Anwesenheit von GCNT3 u.a. zur Oberflächenexpression von sLe<sup>x/a</sup> notwendig ist, welches wiederum als Ligand für Selektine gilt. Die Expression von GCNT3 könnte also als limitierender Faktor für die Anheftung von malignen Zellen an aktiviertes Endothel gelten (Brockhausen 1999, Fukuda 1996, Nakamura et al. 1998). Auch wurde gezeigt, dass eine Bindung von PSGL-I (P-selectin glycoprotein ligand-I) an P- und L-Selektin nur unter Anwesenheit einer Core2- synthetisierenden  $\beta$ -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase stattfinden kann, nicht aber an E-Selektin (Kumar et al. 1996, Li et al. 1996). GCNT3 scheint also für die

Erkennung des PSGL-I durch P- und L-Selektin und somit für das Anheften von Tumorzellen an aktiviertes Endothel notwendig zu sein.

Hollingsworth und Swanson (2004) beschrieben, dass Mucine, welche vermehrt auf Adenokarzinomzellen exprimiert werden, im Zuge der Entdifferenzierung zu malignen Zellen stärker o-glykosyliert sind als ihr Gegenpart auf normalen epithelialen Zellen. Durch die Expression vieler verschiedener glykosylierter Mucine entstehen potentielle Liganden, die auf dem Wege der natürlichen Selektion mit Rezeptoren auf Zelloberflächen interagieren können. Als Grundlage dieser gesteigerten O-Glykosylierung scheint eine vermehrte GCNT3-Expression zur Synthese der Grundstruktur der O-Glykane (Core2 und Core4) unabdinglich zu sein.

Auch in T-Lymphozyten wurde eine vermehrte Core2-Expression mit einem anti-adhäsivem Effekt in Verbindung gebracht. Tsuboi et al. (1997) untersuchten T-Lymphozyten mit transfiziertem C2Gnt-Gen und fanden eine reduzierte Adhäsionsfähigkeit der T-Zellen an ICAM-1 und Fibronectin.

Ob nun eine vermehrte Core2-Expression zu einem anti-adhäsivem Effekt führt oder ob es durch die Aufhebung des Zellverbandes zu vermehrter Expression von Core2 kommt, ist nicht geklärt. Ein Versuch zur Klärung dieser Frage sollte in dieser Arbeit die Messung der GCNT3-Expression in vivo und in vitro sein. Hierbei sollte angenommen werden, dass das Expressionsverhalten von Zellen aus dem Kulturmedium ein ähnliches ist wie bei Zellen im Blutgefäß. Um das Expressionsverhalten im Zellverband zu beurteilen, wurden die in Paraffin eingebetteten Tumore auf ihre GCNT3-Expression hin untersucht.

Die GCNT3-Expression im Zellverband konnte deutlich in HT29 nachgewiesen werden. In HT29mdr ließ sich GCNT3-mRNA in geringem Maße nachweisen, konnte aber aufgrund von Nebenprodukten in der PCR nicht sicher quantifiziert werden. Ob dies an der eventuell schlechteren RNA-Qualität der in Paraffin-eingebetteten Tumore liegt oder tatsächlich an veränderten Enzymexpressionen, ist unklar.

Im direkten In-Vitro-In-Vivo-Vergleich nahm die GCNT3-Expression in HT29 in vivo ab. Im Zellverband des Tumors scheint GCNT3 also weniger exprimiert zu werden als in Zellkultur, so dass ein Einfluss des Zell-zu-Zell-Kontaktes auf die Regulierung der GCNT3-Expression angenommen werden kann. Eine Vermutung ist, dass die GCNT3 Expression im Zellverband unterdrückt wird. Sobald eine Tumorzelle keine Signale aus

dem Zell-zu-Zell-Kontakt erhält, also als einzelne metastatische Zelle, könnte es dann wieder zur GCNT3-Expression und zur Ausbildung von Lektinliganden kommen.

Diese Aussagen konnten nur für die Kolonkarzinomzelllinien getroffen werden. In den untersuchten Melanom- und Mammakarzinomzelllinien war keinerlei GCNT3-Expression nachzuweisen. Hier müssen also andere Mechanismen im Metastasierungsprozess zum Tragen kommen.

### 5.3.2 $\beta$ -Galactosid- $\alpha$ -2,3-Sialyltransferase (ST3O)

Im Gegensatz zu GCNT3-mRNA konnte ST3O-mRNA in nahezu allen untersuchten Zelllinien in der Kultur gewachsenen Zellen nachgewiesen werden. Eine massiv gesteigerte Expression war auch hier in der stark metastasierenden Zelllinie HT29 zu verzeichnen. Keine der anderen Zelllinien wies eine derart hohe Expression auf. Auch im Xenografttumor waren gesteigerte Expressionslevel in HT29 nachzuweisen. Im direkten Vergleich zwischen den Zellen *in vitro* und *in vivo* ergab sich sogar eine höhere ST3O-Expression im Xenografttumor (*in vivo*) als in den Kulturzellen. Die größten Level an ST3O-mRNA konnten also in Kolonkarzinomzellen mit hohem Metastasierungspotential gefunden werden, welche sich zudem im Zellverband des Tumors befanden.

Vermeehrt konnten die Oberflächenoligosaccharide  $sLe^{x/a}$  auf Zellen der Kolonkarzinomzelllinie SW480, welche auch in dieser Arbeit untersucht wurde, nachgewiesen werden, die unter Hypoxie (1%  $O_2$ ) wuchsen. Unter Zufuhr von Sauerstoff kam es zu einem Rückgang der  $sLe^{x/a}$ -Expression. Passend dazu konnte sich in den gleichen Zellen eine vermehrte Expression von ST3O unter Hypoxie finden lassen (Koike et al. 2004). Das lässt vermuten, dass auch die in dieser Arbeit vermehrte nachgewiesene ST3O-mRNA-Expression im Zellverband durch Hypoxie induziert sein könnte. Da in der Literatur ST3O eher im Zusammenhang mit der Terminierung von Core1-Strukturen beschrieben wurde als mit der Synthese von  $sLe^{x/a}$  (Julien et al. 2007, Priatel et al. 2000), bleibt unklar, ob ein direkter Zusammenhang zwischen ST3O-Expression und vermehrtem Auftreten  $sLe^{x/a}$  auf der Zelloberfläche besteht.

Videira et al. (2009) untersuchten die ST3O-Expression im Urothelkarzinom. Hier zeigte sich mit zunehmender maligner Transformation der Tumorzellen (normales Urothel – nicht-invasives Urothel-Ca – invasives Urothel-Ca) eine vermehrte

Expression. Ebenso schien die Wahrscheinlichkeit eines Rezidives eines Blasenkarzinoms mit erhöhter ST3O-Expression zu steigen.

Picco et al. (2010) kreuzten ST3O-transgene Mäuse, die eine gesteigerte ST3O-Expression in Brustdrüsen, Magen, Lungen und Intestinum zeigten, mit Mäusen einer Linie, welche dazu neigen, multifokale Mammatumore zu entwickeln (MMTV-PyMT Mäuse). Im Vergleich mit den „normalen“ PyMT-Mäusen kam es bei denjenigen mit der gesteigerten ST3O-Expression zu einer weitaus schnelleren Tumorentwicklung, was die Untersucher veranlasste, ST3O als Promoter in der Tumorgenese, zumindest in einem derartigen Tumormodell, zu sehen. Wir konnten diese Hypothese der untersuchten Kolonkarzinomzelllinien bestätigen. Hier hatte sich mit zunehmendem Metastasierungspotential eine zunehmende ST3O-Expression dargestellt. Im Mammakarzinom und im Melanom konnte sich keine derartige Korrelation darstellen lassen. Hier war eine durchgängig mittelgradige Expression auffällig ohne Abhängigkeit des Metastasierungspotentials der Zellen.

Julien et al. (2007) untersuchten Monozyten und dendritische Zellen auf die Expression von Glykosyltransferasen und fanden, dass es mit zunehmender Differenzierung zu einer Herabregulation der GCNT3-Expression kam. Gleichzeitig stieg die Expression von ST3O und ST6N an, was zu einem vermehrten Vorkommen von Core1-Strukturen auf der Zelloberfläche führte. In unseren untersuchten Karzinomzellen fand sich in den Kolonkarzinomzellen in den Einzeluntersuchungen eine in der Tendenz gleiche Expression von GCNT3 und ST3O in vivo und in vitro. Im direkten In-Vitro-In-Vivo-Vergleich stellte sich dann in HT29 eine höhere ST3O-Expression in vivo und eine vermehrte GCNT3-Expression in vitro dar. Im Vergleich zu Karzinomzellen mit niedrigem Metastasierungspotential ist in denjenigen Zellen mit hohem Metastasierungspotential sowohl eine vermehrte GCNT3-Expression als auch eine gesteigerte ST3O-Expression zu verzeichnen. So scheinen sowohl verzweigte, auf der Core2-Struktur basierende Glykane als auch kurze, terminierte Core1-Strukturen ihre Aufgabe im Metastasierungsweg zu haben. Vermuten lässt sich, dass eine durch Hypoxie im Zellverband induzierte gesteigerte ST3O-Expression zu verkürzten Core1-basierenden Oberflächenglykanen führt und hiermit die Loslösung aus dem Zellverband und die Metastasierung initiiert werden. Sobald die Zelle aus dem Zellverband losgelöst ist, bewirkt eventuell eine fehlende Zell-zu-Zell-Interaktion eine Steigerung der

GCNT3-Expression, was wiederum zu mehr verzweigten Oberflächenglykanen führt und die Bildung von Adhäsionsmolekülen möglich macht.

### **5.3.3 N-Acetyllactosaminid- $\alpha$ -2,3-Sialyltransferase (ST3N)**

In den Kulturzellen ließ sich durchgängig eine mindestens mittelgradige Expression von ST3N nachweisen. In den stark metastasierenden Melanomzellen FEMX-I, LOX und MV3 ergab sich im Vergleich noch eine etwas höhere Expression. In vivo war ST3N-mRNA nicht mehr so stabil nachzuweisen und wurde zudem in niedrigeren Levels exprimiert. Des Weiteren konnte in vivo die gesteigerte Expression in den oben genannten Melanomzellen nicht nachgewiesen werden. Es wurde eine deutlich vermehrte ST3N-Expression in den Melanomzellen in vitro im In-Vitro-In-Vivo-Vergleich deutlich.

Ähnlich dem Ergebnis in dieser Arbeit konnten auch Ito et al. (1997) in normalen humanen kolorektalen Mukosaprobe und in Kolonkarzinomgewebeprobe ähnliche Expressionen von ST3N-mRNA feststellen, jedoch ohne Unterschiede zwischen den malignen und den nichtmalignen Gewebeprobe. Auch wir konnten keine wesentlichen Expressionsunterschiede zwischen stark oder weniger metastasierenden Zellen feststellen.

Montel et al. (2005a) untersuchten Genregulationen in Tumoren in vivo und in vitro sowie metastatischen vs. nicht-metastasierenden Tumoren und fanden, dass ST3N im nicht-metastasierenden Tumor im Vergleich zur Lungenmetastase heraufreguliert war. Eine etwaige höhere Expression im nicht- oder weniger metastasierenden Tumor konnte hier jedoch nicht nachgewiesen werden.

Mit zunehmender Zellkonfluenz wurde in den Zellen der Magenkarzinomzelllinie MKN45 eine gesteigerte ST3N-Expression zusammen mit vermehrtem Nachweis von sLe<sup>x/a</sup> auf den Zelloberflächen nachgewiesen (Carvalho et al. 2010). Wir konnten dies dementsprechend in der Mammakarzinomzelllinie MCF7 zeigen, welche im Zellverband in vivo deutlich höhere ST3N-mRNA-Level aufzeigte als in vitro. In den untersuchten Melanomzellen konnte Ähnliches, wie oben beschrieben, nicht nachgewiesen werden. So ist zumindest anzunehmen, dass im Mammakarzinom eine Heraufregulierung der ST3N-Expression mit zunehmender Hypoxie zusammenhängen

könnte, ähnlich wie es bereits für ST3O postuliert wurde, um etwa den „Ausbruch“ aus dem Zellverband zu initiieren.

Dimitroff et al. (1999) transfizierten humane Kolonkarzinomzellen (SW480) mit ST3N-cDNA und fanden, dass, im Vergleich zum Wildtyp, hierdurch eine weitaus bessere Bindungskapazität der Zellen an nicht aktivierte Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen bestand. Auf den selben Zellen konnte jedoch, entgegen den Erwartungen, keine vermehrte Expression von sLe<sup>x/a</sup> gefunden werden. Es wurden jedoch vermehrt N-Acetylneuraminsäure- $\alpha$ -2,3-Galactosid-Bindungen auf den Zelloberflächen gefunden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass nicht zwingend sLe<sup>x/a</sup> für die Zelladhäsion notwendig sind, sondern noch anderweitige sialylierte Reste diese Aufgabe erfüllen können.

In Adenokarzinomzelllinien des Pankreas korrelierte eine vermehrte ST3N-Expression ebenfalls mit einer vermehrten Adhäsionsfähigkeit an E-Selektin. Jedoch wurde hier gleichzeitig vermehrt sLe<sup>x</sup> auf der Zelloberfläche gefunden. In der selben Untersuchung wurden ST3N-überexprimierende Zelllinien in athymische Mäuse injiziert. Dies resultierte in einer verminderten Überlebensrate und gesteigerte Tumorgenese (Pérez-Garay et al. 2010). In extrahepatischen Gallengangskarzinomen wurde ebenfalls eine gesteigerte ST3N-Expression nachgewiesen, was mit vermehrter Invasivität der Karzinomzellen einherging (Jin et al. 2004). Dass bei uns in den Melanomzellen in vitro im Vergleich zu den Zellen im Zellverband vermehrt ST3N-mRNA nachgewiesen werden konnte, könnte dazu passen, dass in dem Moment, in dem Tumorzellen vom Zellverband gelöst in die Blutbahn treten eine vermehrte Adhäsionsfähigkeit an Endothelzellen notwendig ist, um ins extravasale Gewebe überzutreten.

Ausgehend von diesen Voruntersuchungen scheint eine vermehrte ST3N-Expression eindeutig mit erhöhter Invasivität und Adhäsionsfähigkeit von Tumorzellen zu korrelieren. In den hier untersuchten Melanomzellen stellte sich im Direktvergleich eine in vitro, also außerhalb des Zellverbandes, gesteigerte Expression dar. In der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 verhielt es sich genau umgekehrt. Hier war die ST3N-Expression im Zellverband deutlich erhöht im Vergleich zu den Zellen aus dem Kulturmedium. Wesentliche Unterschiede zwischen stark oder weniger metastasierenden Tumoren konnten nicht gefunden werden. Anhand unserer Untersuchungen bleibt unklar in welchem Tumorstadium es zu einer vermehrten ST3N-mRNA-Expression kommt. Eine Abhängigkeit vom Metastasierungspotential konnten

wir nicht zeigen. Gegebenenfalls wirkt ST3N im Mammakarzinom und im Melanom an verschiedenen Substraten. Es ist vorstellbar, dass ST3N im Melanom an der sLe<sup>x</sup>-Synthese beteiligt ist und somit den vom Zellverband losgelösten Zellen eine Ausbildung von Lektinliganden ermöglicht. Da es sich im Mammakarzinom anders verhielt, wäre es möglich, dass ST3N hier eine ähnliche Aufgabe wie ST3O zukommt bzw. am gleichen Substrat wirkt wie ST3O.

#### **5.3.4 $\beta$ -Galactosid- $\alpha$ -2,6-Sialyltransferase (ST6N)**

Insgesamt war die ST6N-mRNA-Expression in den untersuchten Zelllinien *in vitro* in dieser Untersuchung uneinheitlich. Durchgängig konnte ST6N auf ähnlichen Leveln in den Kolonkarzinomzelllinien nachgewiesen werden. In der Zelllinie SW480, welche nicht metastasierte, wurde im Vergleich zu den anderen Kolonkarzinomzelllinien die geringste Expression gefunden. Um einen Zusammenhang zwischen dem Metastasierungspotential der Kolonkarzinomzelllinien und ihrer ST6N-Expression herzustellen, lagen die Expressionen jedoch zu nah beieinander. Vorbeschrieben sind allerdings Korrelationen von ST6N-Expression und metastatischen Eigenschaften von malignen Zellen. So zeigten zum Beispiel mit ST6N-RNA transfizierte Mammakarzinomzellen eine gesteigerte Zell-Migration mit gesteigerter Affinität zu Kollagen IV und eine verminderte Zell-Adhäsionsfähigkeit (Lin et al. 2002). In Ovarialkarzinomzelllinien konnte mit vermehrter ST6N-Expression eine verstärkte Adhäsionsfähigkeit und verstärkte Migrationsfähigkeit nachgewiesen werden. Ähnliches konnte an Kolonkarzinomzellen gezeigt werden (Christie et al. 2008). Gegebenenfalls ist die leicht erhöhte ST6N-Expression in den stärker Metastasen bildenden Kolonkarzinomzellen im Vergleich zu SW480 als Hinweis für eine Abhängigkeit des Metastasierungsverhaltens von Zellen zu sehen. Die Unterschiede der ST6N-Expression in dieser Untersuchung scheinen jedoch nicht ausgeprägt genug zu sein, um die zuvor beschriebenen Aussagen zu bestätigen. Die Untersuchungen von Christie et al. (2008) und Lin et al. (2002) ließen weiter einen vermehrten ST6N-mRNA-Nachweis in den *in vitro* gewachsenen Zellen erwarten. Im Direktvergleich wurden diesbezüglich die Zelllinien FEMX-I und MV3 (Melanome mit hohem metastatischem Potential) untersucht. Die Vermutung konnte bestätigt werden, denn in

beiden Zelllinien hat sich eine, im Vergleich zu im Zellverband wachsenden Zellen, deutlich gesteigerte Expression gezeigt. Gleichzeitig wurde die Zelllinie HT29mdr untersucht. Hier waren keine Unterschiede in der ST6N-Expression in vitro und in vivo zu verzeichnen.

In anderen Untersuchungen wurde ST6N in normaler Kolonmukosa gar nicht oder nur wenig nachgewiesen, jedoch vermehrt in Kolonkarzinomzellen (Dall'Ollio et al. 1989). Insgesamt konnte sich bei uns ein etwaiger Zusammenhang zwischen erhöhtem Metastasierungspotential und vermehrter ST6N-Expression, wie bereits oben verdeutlicht, nicht eindeutig bestätigen. In vitro hatte sich ergänzend eine starke ST6N-Expression in der Mammakarzinomzelllinie T47D (starkes Metastasierungspotential) im Vergleich zu HBL100 (kein Metastasierungspotential) gezeigt. Eine bestätigende starke Expression in MCF7 (starkes Metastasierungspotential) war jedoch nicht zu verzeichnen. Hier konnte ST6N sogar gar nicht nachgewiesen werden. Sowohl in vitro als auch in vivo war auch keine vermehrte Expression in HT29 (stärkstes Metastasierungspotential der untersuchten Kolonkarzinomzelllinien) im Vergleich zu den anderen Kolonkarzinomzelllinien zu erkennen. Ähnlich Uneinheitliches galt für die Melanomzellen. Ein starker Nachweis gelang in zwei von vier Zelllinien, beide mit starkem Metastasierungspotential. Jedoch wiesen die Zelllinien, in denen ST6N nicht nachgewiesen werden konnte, ebenfalls ein starkes Metastasierungspotential auf.

Jin et al. (2004) vermuteten, dass ST6N unabhängig vom Tumorstadium exprimiert wird, da sie, gleich zu ST3N, im Gallengangskarzinom in allen Tumorstadien eine durchgehend gleiche, vermehrte Expression von ST6N nachweisen konnten. Dies deuteten auch Untersuchungen an Magenkarzinomzellen an, wo sowohl in den Tumorzellen als auch in benachbarter normaler Mukosa eine gesteigerte ST6N- (und auch ST3N-) Expression gefunden wurde (Gretschel et al. 2003). Sollte dem so sein, würde man eine gleiche Expression sowohl in vivo als auch in vitro erwarten. Dem war in der Kolonkarzinomzelllinie HT29mdr so, jedoch nicht in den Melanomzellen FEMX-I und MV3. Das lässt sich also annehmen, dass die ST6N-Expression in gastrointestinalen Karzinomen unabhängig vom Tumorstadium ist, dies jedoch nicht in Melanomzellen so ist.

Exprimieren Ovarialzellen von chinesischen Hamstern vermehrt ST6N, scheinen die terminierenden NeuAc- $\alpha$ -2,3-Bindungen zurückzugehen, was vermuten lässt, dass

ST6N und ST3N und/oder ST3O miteinander um Substrate konkurrieren. Selbst in Zellen, die vermehrt GCNT3 exprimieren, wie CHO (chinese hamster ovary) Zellen, überwiegt die sTn-Expression, sobald ST6N exprimiert wird. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die ST6N-Funktion überwiegt (Lee et al. 1989). Eine ähnlich starke Heraufregulation der ST6N-Expression in der stark Metastasen bildenden Zelllinie HT29, wie sie bei GCNT3 und ST3O vorkommt, konnte nicht verzeichnet werden, obwohl auch ST6N als „Konkurrent“ zu GCNT3 beschrieben worden ist (Julien et al. 2001, Schneider et al. 2001).

Insgesamt stellte sich die ST6N-Expression als uneinheitlich dar. Ein wesentlicher Zusammenhang zwischen Metastasierungspotential von Tumorzellen und deren ST6N-Expression konnte nicht dargestellt werden. Zumindest in Melanomzellen hatte sich die ST6N-Expression als abhängig von der Umgebung der Zelle erwiesen. Für die Kolonkarzinomzelllinie HT29mdr galt dies jedoch nicht.

## **5.4 Expression der Glykosyltransferasen im Melanom, Kolon- und Mammakarzinom**

### **5.4.1 Glykosyltransferasen im Kolonkarzinom**

Huang et al. (2006) beschrieben, dass GCNT3 in der Mehrheit der Kolorektalen- bzw. der Kolonkarzinome exprimiert wird. Auch unsere Untersuchung ergab, dass in allen untersuchten Tumorentitäten allein die Kolonkarzinomlinien GCNT3 exprimierten. Gleich zu Huang et al. (2006) konnten auch wir eine deutliche relative Expression in der Zelllinie HT29 zeigen und keine relevante Expression in SW480.

Shimodaira et al. (1997) untersuchten den Zusammenhang zwischen der Expression einer C2/4Gnt (=GCNT3) und Tumorprogression. Sie konnten in 63 Prozent kolorektaler Tumorproben von Patienten eine Expression von C2/4Gnt nachweisen, jedoch in keiner der normalen kolorektalen Mucosaproben von den gleichen Patienten. Sie nahmen an, dass O-Glykane mit der Core-2-Grundstruktur eine wichtige Rolle in der Tumorprogression spielen könnten. Außerdem hatten die Patienten, deren Proben GCNT3 exprimierten, eine ungünstigere Prognose als diejenigen, bei denen keine Expression nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren war die lymphatische und venöse Tumorzellinvasion bei GCNT3-exprimierenden Tumoren signifikant erhöht.

Eine Korrelation der GCNT3-Expression zum Metastasierungspotential einer Karzinomzelllinie konnte auch in dieser Arbeit deutlich gemacht werden. Die GCNT3-Expression wurde in verschiedenen Karzinomzelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungspotential untersucht. Eine deutlich gesteigerte Expression zeigte sich in der Zelllinie HT29, welche, in Mäuse injiziert, in neun von neun Mäusen zur Metastasenbildung führte (Schumacher und Adam, 1997). Ihr metastatisches Potential gilt als äußerst hoch (Mitchell et al. 1998). Eine geringere relative Expression von GCNT3 wurde in HT29mdr nachgewiesen, der schwach metastasierenden, multi-drug-resistenten Variante von HT29. In CaCo-2, einer Zelllinie, die als mäßig metastasierend gilt, zeigte sich zwar eine deutliche Expression, jedoch von weitaus geringerem Ausmaß als im Vergleich zu HT29. In der nicht-metastasenbildenden Zelllinie SW480 konnte keine signifikante Expression von GCNT3 nachgewiesen werden. Hier korreliert also das metastatische Potential der untersuchten Zelllinien proportional mit ihrer GCNT3-

Expression. So ist zumindest bei den Kolonkarzinomzelllinien auf eine Abhängigkeit des Metastasierungspotentials zur Core2- oder Core4-Grundstruktur der O-Glykane zu schließen.

Da in keiner der untersuchten Mammakarzinom- oder Melanomzelllinien GCNT3 nachgewiesen werden konnte, muss man davon ausgehen, dass die Core2- oder Core4-Grundstrukturen bei deren Metastasierungsweg keine wesentliche Rolle spielen.

Ito et al. (1997) fanden eine vermehrte ST3O-Expression in kolorektalem Karzinomgewebe mittels Northern-Blot und RT-PCR im Vergleich zu normaler menschlicher kolorektaler Mukosa. Beobachtete man die ST3O-Expression in Kolonkarzinomzellen unter Hypoxie, so stieg sie hierunter signifikant an (Koike et al. 2004).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten sowohl eine in vitro als auch in vivo stark vermehrte Expression in der metastasierenden Kolonkarzinomzelllinie HT29. Hier waren auch Unterschiede zwischen metastasierenden und nicht-metastasierenden Zellen auffällig. Obwohl GCNT3 und ST3O als „Gegenspieler“ anzusehen sind, zeigte sich in unserer Untersuchung eine vermehrte Expression beider im metastasierenden Kolonkarzinom. Dies bestätigt, was in der Vergangenheit gezeigt wurde: Beide Arten der Glykosylierung, also sowohl die vermehrte Expression von sialylierten als auch von stark verzweigten Glykanen, scheinen in der Tumormalignität eine große Rolle zu spielen (Shimodaira et al. 1997).

Zur Expression von ST3N im kolorektalen Karzinom gibt es wohl bislang keine genaueren Untersuchungen. Letztendlich sahen wir in den Kolonkarzinomzellen eine durchgängig nachzuweisende mittlere Expression ohne Abhängigkeit zum Metastasierungspotential der Zellen. ST3N scheint also benötigt zu werden, jedoch wohl keine nachzuweisende Funktion im Metastasierungsprozess von Kolonkarzinomzellen zu haben.

Es wurde beschrieben, dass nicht nur ST3O und GCNT3 im kolorektalen Karzinom um Substrate konkurrieren, sondern auch  $\alpha$ -2,6-Sialyltransferasen und GCNT3. Dies wurde in der Zelllinie SW480 untersucht (Schneider et al. 2001). Eine wie bei GCNT3 und ST3O in der Tendenz gleich erhöhte Expression von GCNT3 und ST6N konnte in dieser Untersuchung nicht gefunden werden. In SW480 war das Expressionslevel leicht erniedrigt im Vergleich zu den Zellen mit höherem metastatischem Potential. Mit

zunehmender Metastasierungsfähigkeit stieg die ST6N-Expression jedoch nicht wesentlich an. Ein konkurrierendes Verhalten zwischen GCNT3 und ST6N kann anhand der Daten dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da man eine in der Tendenz gleiche Heraufregulation der Enzyme mit zunehmenden Metastasierungspotential der Zellen, wie bei GCNT3 und ST3O gesehen, erwartet hätte.

Zusammenfassend kann man über das Expressionsmuster der hier untersuchten Glykosyltransferasen in kolorektalen Karzinomzellen sagen, dass GCNT3 und ST3O eine Funktion im Metastasierungsprozess haben und wahrscheinlich um gleiche Substrate konkurrieren. ST3N liegt in allen Zellen auf ähnlichem Expressionslevel vor und scheint somit eine Funktion zu haben, welche jedoch unabhängig vom Metastasierungsprozeß zu sein scheint. Eine metastasierungsabhängige Expression von ST6N ist angedeutet, jedoch scheint es keine Konkurrenz zwischen diesem Enzym und GCNT3 zu geben, was anderen Untersuchungen widerspricht.

#### **5.4.2 Glykosyltransferasen im Mammakarzinom**

Recchi et al. (1998) untersuchten bereits die Expression von Sialyltransferasen in Brustkrebszellen. Die meisten der operativ entfernten und untersuchten Tumore von Patienten exprimierten ST3N. Die Expression von ST3N korrelierte mit der von ST3O und ST6N. Die ST3N-Expression ging mit metastatischem Potential der Tumore sowie einer schlechteren Überlebensrate der Patienten einher. Gleiches galt für ST6N. In vitro konnten wir keine Abhängigkeit vom metastatischen Potential und der Expression von ST3O, ST3N und ST6N ausmachen. Die ST3O- und die ST3N-Expression korrelierten im Mammakarzinom miteinander, was jedoch nicht auf ST6N zutraf.

In der Vergangenheit konnten in kultivierten Mammakarzinomzellen, im Vergleich zu normalem Brustdrüsengewebe, verkürzte, sialylierte und wenig komplexe Core1-O-Glykanketten gefunden werden und passend dazu eine vermehrte ST3O-Expression (Brockhausen et al. 1995, Burchell et al. 1999). In allen untersuchten Mammakarzinomzellen konnten wir in vitro ein mittleres Expressionslevel von ST3O feststellen. Gleichzeitig sahen wir in vitro eine mittlere Expression von ST3N.

Im In-Vitro-In-Vivo-Vergleich konnte in MCF7-Zellen eine deutlich gesteigerte ST3N-Expression im Zellverband nachgewiesen werden. Brown et al. (2003) beschrieben, dass auf MCF7 trotz seines metastatischen Potentials keine sLe<sup>x</sup> nachzuweisen ist.

Das in dieser Untersuchung im Zellverband nachgewiesene hohe ST3N-Expressionslevel in MCF7 ist also womöglich nicht mit der Synthese von sLe<sup>x</sup> in Verbindung zu bringen. Welche Aufgabe der ST3N im Zellverband zuzuschreiben ist, bleibt unklar. Die vermehrte Bildung von Adhäsionsmolekülen für aktiviertes Endothel wäre im Zellverband nicht sehr nützlich. Gegebenenfalls sind der ST3N noch weitere Aufgaben neben der Bildung von sLe<sup>x</sup> in Tumorzellen zuzuschreiben. Zu überlegen wäre ebenfalls, ob ST3N hier nicht die gleiche Aufgabe wie ST3O übernimmt und Core-Strukturen mittels Sialylierung terminiert. Zu beachten ist, dass in der Untersuchung von Brown et al. (2003) Zellen *in vitro* auf ihre Expression von sLe<sup>x</sup> hin untersucht wurden. *In vitro* hatte MCF-7 nur eine mäßige Expression gezeigt. Eventuell wäre auf den im Xenografttumor gewachsenen Zellen mittels CSLEX-1 sLe<sup>x</sup> nachzuweisen gewesen.

Lloyd et al. (1996) untersuchten das Glykosylierungsmuster von MUC-1 in normalen Brustepithelien im Vergleich zu Mammakarzinomzellen. Hierbei zeigte sich, dass MCF-7 im Glykosylierungsmuster am meisten den normalen Epithelzellen glich und am differenziertesten hinsichtlich der Polarität des MUC-1 erschien. T47D exprimierte im Vergleich dazu einfache, neutrale Mono- und Disaccharide sowie Monosialooligosaccharide. Des Weiteren konnte dort gezeigt werden, dass T47D-Zellen, im Vergleich zu normalen Brustepithelien, in ihren Mucinen keine Core2-Strukturen enthielten. Im normalen Mammapithel wurde die MUC1-Struktur als stark verzweigt und auf Core2-basierend beschrieben, während die Karzinomzellen Core1-basierende kurze MUC-1 Strukturen aufzeigten.

Auch Untersuchungen von Hull et al. (1998) erbrachten, dass in der Mammakarzinomzelllinie BT20 mittels des Antikörpers DF3 keine Core2-Strukturen nachzuweisen waren. Brockhausen et al. (1995) beschrieben ebenfalls ein Fehlen von Core2-Strukturen in den Karzinomzelllinien T47D und BT-20. Passend dazu konnte kein mRNA-Transkript von GCNT3 in T47D und BT20 gefunden werden. Wir konnten ebenfalls in allen untersuchten Mammakarzinomzelllinien keine GCNT3-Expression nachweisen. Dass stetig in allen Mammakarzinomzellen ausgeprägte Expressionslevel von ST3O scheint die Funktion zu haben, diese verkürzten Core1-Strukturen mittels Terminierung durch Sialylreste zu produzieren. Auch ST6N terminiert Core1-Strukturen und es kommt zur Ausbildung von sialyliertem Tn-Antigen (Julien et al. 2001). Die ST6N-Expression war verglichen mit ST3O nicht in allen

Mammakarzinomzellen so kontinuierlich nachweisbar und wenn doch, dann in nur geringer Intensität. In den Zelllinien MCF-7 und T47D stellte sich keine Expression von ST6N-mRNA dar, was so schon durch Julien et al. (2001) beschrieben wurde. So scheint also ST3O vielmehr als ST6N für das Exprimieren von verkürzten Core1-Strukturen verantwortlich zu sein. Mit ST6N-cDNA transfizierte T47D-Zellen weisen eine verminderte Adhäsionsfähigkeit an verschiedene Komponente der extrazellulären Matrix auf sowie eine vermehrte Mobilität (Julien et al. 2005). Wie schon bemerkt, konnte in vitro in MCF7 reproduzierbar kein ST6N nachgewiesen werden, was zu den Voruntersuchungen passt. Im Zellverband in vivo war jedoch eine ST6N-Expression in den MCF7-Zellen zu ermitteln, was dafür sprechen könnte, dass als vorbereitender Schritt zur Loslösung vom Zellverband im Mammakarzinom ST6N exprimiert wird.

Insgesamt ist die ST3N- und ST6N-Expression in der Mammakarzinomzelllinie MCF7 abhängig vom Zellverband. Das metastatische Potential von Mammakarzinomzellen scheint eher von verkürzten Core-Strukturen als von stark verzweigten Glykanen abzuhängen, da keine GCNT3-Expression nachgewiesen werden konnte, jedoch ST3O. An der Terminierung der Core-Strukturen im Mammakarzinom scheint eher ST3O als ST6N beteiligt zu sein.

### **5.4.3 Glykosyltransferasen im malignem Melanom**

Zur Expression von Glykosyltransferasen im malignen Melanom gibt es nur sehr wenige Untersuchungen. Die meisten davon befassen sich gleichzeitig mit der Ermittlung von Markern zur Erkennung von Tumoraggressivität, worauf im nächsten Kapitel näher eingegangen werden soll. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass im malignen Melanom die Ausbildung von Metastasen nicht von komplexen Glykanketten mit vermehrten  $\beta$ -1,6-Verzweigungen und auch nicht von Sialylsäureresten abhängig ist (Thies et al. 2001).

Passend dazu konnte hier in den Melanomzellen keine GCNT3-mRNA nachgewiesen werden. Auffällig war vor dem Hintergrund dieser Untersuchung von Thies et al. (2001) die in vitro durchgängig ausgeprägte ST3N-Expression in allen untersuchten Zelllinien. In MV3 und FEMX-I konnte gleichzeitig ein relativ hohes Expressionslevel an ST6N nachgewiesen werden. LOX zeigte in vitro keine ST6N-Expression, obwohl diese

Zelllinie als am stärksten metastasierend angesehen wird. Da alle untersuchten Melanomlinien mittel bis stark ausgeprägt Metastasen bilden, kann dies zu der Annahme führen, dass zumindest in vitro die ST3N-Expression im Melanom das Metastasierungsverhalten beeinflusst.

Auch im Vergleich zum Mamma- und Kolonkarzinom wurde in vitro vermehrt ST3N nachgewiesen. Wie schon in 5.3.3 beschrieben, scheint die Expression mit Antiadhäsivität von Zellen und wohl besonders von Melanomzellen in Verbindung zu stehen. Der direkte In-Vitro-In-Vivo-Vergleich bestätigte dies mit einer vermehrten Expression von ST3N in vitro in FEMX-I und MV3. Gleiches galt für ST6N in FEMX-I und MV3, in denen eine deutliche Expression in vitro nachgewiesen wurde, in vivo jedoch nicht.

Insgesamt kann über die Melanomzellen und deren Expressionsmuster der untersuchten Glykosyltransferasen nur gesagt werden, dass ST3N in allen untersuchten Zelllinien nur von Zellen exprimiert wird, die sich nicht im Zellverband befinden. Zumindest in zwei von vier Melanomlinien gilt das Gleiche für ST6N. Die Melanomlinien LOX und MeWo exprimierten zumindest in vitro kein ST6N im Gegensatz zu FEMX-I und MV3. Bei unzureichender Materialqualität konnten diesbezüglich keine In-Vivo-Untersuchungen zu LOX erfolgen. Überraschenderweise konnte in den Zellen der Linie MeWo in vivo ST6N nachgewiesen werden, jedoch auf einem niedrigen Level.

Das bedeutet, dass Sialylsäurereste auf den Melanomzellen entweder doch, zumindest wenn sie aus dem Zellverband herausgelöst sind, eine Rolle spielen, oder dass es nicht zur Sialylierung kommt, da eventuell die exprimierten Sialyltransferasen kompetitiv gehemmt werden, was eher mit den Ergebnissen von Thies et al. übereinkommen würde. Da jedoch in vitro ST3N in allen untersuchten Zelllinien (Mamma- und Kolonkarzinom, Melanom) unabhängig vom Metastasierungsverhalten durchgängig bis mäßig stark exprimiert wurde, könnte auch angenommen werden, dass diese Expression zum normalen Expressionsprofil sowohl benigner als auch maligner Zellen gehört.

## **5.5 Synthese von HPA- und Selektin-Liganden durch Glykosyltransferasen**

Das Helix Pomatia Agglutinin (HPA) ist ein Lektin, welches Zuckerstrukturen auf der Zelloberfläche erkennt und bindet. HPA kann als prognostischer Marker für Patienten mit Kolon-, Magen-, Ösophagus- und Mammakarzinom verwendet werden, da es vermehrt an Tumorzellen bindet, die ein hohes metastatisches Potential aufweisen. Krebspatienten, deren Tumore HPA-positiv waren, hatten eine schlechtere Prognose als die, deren Tumore keine HPA-Bindung aufwiesen (Dwek et al. 2001, Kakeji et al. 1991, Laack et al. 2002, Leathem et al. 1987, Okuyama et al. 1998, Schumacher et al. 1994, Thies et al. 2001). Letztendlich wird weiterhin nach der Struktur gesucht, die als HPA-Ligand fungiert. Die Glykoproteine, an die HPA bindet, liegen auf der Tumorzelloberfläche und könnten somit an der Adhäsion der Zelle mit der Umgebung beteiligt sein (Köhler et al. 2010). Es wurde herausgefunden, dass HPA an eine Gruppe heterogener Proteine der HT29-Zelle bindet. Unter anderem gehören dazu Integrin  $\beta 6$ , Integrin  $\beta V$  und Annexin, welche für die Zellmigration und Zelladhäsion verantwortlich und gleichzeitig sowohl für die Loslösung aus der extrazellulären Matrix (EZM) als auch für die Bindung an selektive Komponenten der EZM notwendig sind. Gleichzeitig konnte eine HPA-Bindung mit GlcNAc-, GalNAc- und Sialylsäure reduziert werden, was vermuten ließ, dass diese Moleküle als Teilliganden eine Rolle spielen (Saint-Guirons et al. 2007). Passend dazu wurde ein monosialyliertes Oligosaccharid mittels Extraktion und „Oligosaccharidmapping“ identifiziert, welches des Weiteren als Ligand für HPA in Frage käme (Dwek et al. 2001). Die HPA-Bindung ist nicht auf einen bestimmten Teil von den Tumorzellen begrenzt, sondern über die ganze Zelle verteilt, weshalb angenommen wird, dass der Ligand eher für den Schritt der Adhäsion, als für die Invasion wichtig ist (Thies et al. 2001).

Da der HPA-Ligand also wie oben beschrieben GlcNAc-, GalNAc- und Sialylsäuremoleküle zu enthalten scheint, sollten die zur Anheftung dieser Moleküle an den HPA-Liganden notwendigen Enzyme bei metastatischen Tumoren vermehrt exprimiert werden. Von den hier untersuchten Zelllinien hatten sich in Voruntersuchungen HT29 (Kolon), T47D (Mamma), MCF-7 (Mamma) und LOX

(Melanom) als stark HPA-positiv erwiesen (Schumacher und Adam 1997, Thies et al. 2007). Das Augenmerk sollte darauf gerichtet sein, ob es Gemeinsamkeiten in der Expression der Glykosyltransferasen in den Zelllinien gab, die als stark HPA-positiv beschrieben waren.

Aussagen über T47D und LOX konnten nur über die Expression der Glykosyltransferasen *in vitro* erfolgen. Bei unzureichender RNA-Qualität gelangen keine Messungen aus dem Xenografttumor. In den *In-Vitro*-Untersuchungen waren keine wesentlichen Auffälligkeiten aus den Expressionen der Sialyltransferasen in T47D und LOX auszumachen. Deutlich erhöhte oder verminderte Expressionen waren nicht auffällig.

Bei den anderen stark HPA-positiven Zelllinien HT29 und MCF-7 gelang der *In-Vitro*-*In-Vivo*-Vergleich. Es konnte gezeigt werden, dass die GCNT3-Expression im Zellverband von HT29 reduziert und die ST3O-Expression erhöht ist. In der Kulturzelle ergab sich ein umgekehrtes Verhältnis zwischen GCNT3 und ST3O. Dies korrelierte mit dem metastatischen Potential der Zellen. HT29 exprimierte mehr mRNA dieser beiden Glykosyltransferasen als die schwächer metastasierende Zelllinie HT29mdr. HT29-Zellen mit hohem metastatischem Potential, die sich nicht im Zellverband befanden, synthetisierten also am meisten GCNT3. Dies führt folglich zu einer vermehrten  $\beta$ -1,6-Verzweigung von Oberflächenglykanen (Brockhausen et al. 1999, Huan et al. 2006, Schwientek et al. 1999). In MCF-7 war zwar, wie auch in den anderen Mammakarzinom- und Melanomzelllinien, keine GCNT3-Expression nachweisbar, jedoch hatte sich hier ein deutlicher Unterschied in der ST3N-Expression *in vivo* im Vergleich zu *in vitro* dargestellt. Im Xenografttumor war die Expression dieser Sialyltransferase gegenüber den Zellen aus dem Kulturmedium stark vermehrt. So war im HT29-Xenografttumor die ST3O-Expression und im MCF-7-Xenografttumor die ST3N-Expression deutlich gesteigert. Beide Zelllinien sind stark HPA-positiv. Dies untermauert, dass im HPA-Liganden ein Sialylsäurerest (am ehesten in  $\alpha$ -2,3-Bindung) vorhanden sein muss, wie es auch schon bereits beschrieben wurde (Dwek et al. 2001, Saint-Guirons et al. 2007).

Von ST3O ist bekannt, dass sie an Core1-Strukturen agiert und diese mittels Sialylierung terminiert (Ikehara et al. 1999, Julien et al. 2007, Priatel et al. 2000, Sewell et al. 2006, Werther et al. 1996). ST3N wurde mehrfach mit der Synthese von sLe<sup>x/a</sup> in Verbindung gebracht (Kitagawa and Paulson 1993, Carvalho et al. 2010). Das heißt, der

HPA-Ligand könnte sialyliertes Core1 oder sLe<sup>x/a</sup> sein, da beide Enzyme, die mit diesen Strukturen in Verbindung gebracht wurden, in einer jeweiligen HPA-positiven Zelle hochreguliert wurden. Sialyliertes Core1 wurde bislang noch nicht als Ligand für HPA beschrieben, so dass ebenfalls zu überlegen wäre, ob diesen beiden Glykosyltransferasen nicht verschiedenen Aufgaben an verschiedenen Substraten zukommen. So könnte es zum Beispiel sein, dass ST3O auch zur Synthese von sLe<sup>x</sup> beiträgt.

Untersuchungen zu sLe<sup>x/a</sup> zeigten, dass das Antigen eine vermehrte Affinität zu Selektinen aufwies, sobald es sich auf Core2-basierten O-Glykanen befand (Leppänen et al. 2003, Lowe 2002). Da HT29-Zellen in dieser Arbeit vermehrt GCNT3 exprimierten, wenn sie vom Tumorverband losgelöst waren, ließe sich postulieren, dass es zur Ausbildung von Selektinliganden kommt, sobald die Zelle keine Einflüsse aus Zell-zu-Zell-Kontakten mehr bekommt. Das Stellglied scheint zumindest in den HT29-Zellen nicht ST3N für die Sialylierung des Lewisantigens zu sein, da es hier nicht vermehrt exprimiert wurde, sondern GCNT3 und ST3O, welche in vitro bzw. in vivo stark heraufreguliert wurden.

Es scheint eine Diversität im Selektinbindungsverhalten einzelner Kolonkarzinomzellreihen vorzuliegen. So binden die Kolonkarzinomzellen CaCo2 beispielsweise an keines der drei Selektine (E-, P- oder L-Selektin), wobei die Kolonkarzinomzelllinien LS180, T84 und Colo205 an alle binden (Mannori et al. 1995). Die Zelllinie CaCo2 wurde in dieser Arbeit nur in vitro untersucht und zeigte gleich zu den anderen Kolonkarzinomzellen ein gleiches Level an ST3N- und ST6N-mRNA. Jedoch war die GCNT3- und ST3O-Expression im Vergleich zu HT29 wesentlich geringer. Dies könnte das geringere Metastasierungsverhalten von CaCo2 gegenüber HT29 erklären. Dadurch, dass CaCo2 weniger GCNT3 exprimiert, fehlen hier die Selektinliganden zum Austritt ins extravasale Gewebe.

Zu der Frage wie es sich mit der Selektinbindung in HPA-positiven Zellen verhält, injizierten Köhler et al. (2010) HPA-positive HT29-Zellen in E- und P-Selektindefiziente SCID-Mäuse. Diese bildeten daraufhin um 84% weniger Metastasen und es befand sich, verglichen mit SCID-Mäusen vom Wildtyp, eine höhere Anzahl an Tumorzellen im Blut der Tiere. Tumorzellabsiedlungen bildeten sich einzig in den Lungenarterien und nicht im Lungengewebe, was daraufhin deutete, dass es den

Tumorzellen ohne E- oder P-Selektin exprimierende Endothelzellen nicht möglich ist die Blutstrombahn zu verlassen.

In der Analyse konnte auf den *in vivo* gewachsenen HT29-Zellen kein sLe<sup>x</sup> nachgewiesen werden und war jedoch schwach nachweisbar auf den kultivierten Zellen. Auch sLe<sup>a</sup> konnte nicht als Ligand für E- oder P-Selektin ausgemacht werden. Die Bindungsmuster von HPA und anti-sLe<sup>a/x</sup> zeigten in dieser Untersuchung einen unterschiedlichen Charakter. Interessanterweise machte sich auch hier ein Unterschied zwischen den Bindungsmustern von E- und P-Selektininfusionproteinen zwischen den *in vivo* und *in vitro* gewachsenen HT29-Zellen bemerkbar. *In vitro* stellte sich eine ausgeprägtere Selektin-, HPA- und anti-sLe<sup>a</sup>-Bindung dar als auf den *in vivo* gewachsenen Zellen (Köhler et al. 2010). Die Expressionen der Selektinliganden auf der Zelloberfläche sind dementsprechend nicht statisch, sondern passen sich den äußeren Gegebenheiten wie z.B. Hypoxie und Zell-zu-Zell-Interaktion an. Dieser Aspekt kann auch der Expression der Glykosyltransferasen zugeschrieben werden, welche hier untersucht wurden. Auch die Expression dieser ist, wie auch die Ausbildung von Selektinliganden, von Faktoren, die im Zellverband vorherrschen oder nicht vorherrschen, abhängig.

Die hier in Kultur gewachsenen HT29-Zellen zeigten eine ausgeprägte Expression von GCNT3-mRNA, was zu der Annahme verleiten lässt, dass dieses Enzym für die Synthese des HPA-Liganden (wegen starker HPA-Positivität) und von Liganden der E- und P-Selektine (vermehrte Selektinbindung von HT29 *in vitro*) notwendig ist. Gegensätzlich dazu wurde in Leukozyten gezeigt, dass GCNT3 zwar zur Ausbildung von P-Selektin-Liganden notwendig ist, jedoch nicht für durchgängig alle E-Selektin-Liganden (Snapp et al. 2001). Da HT29 jedoch ausgeprägt GCNT3 exprimierte und mehrfach gezeigt werden konnte, dass HT29-Zellen ausschließlich an E-Selektine binden (nicht an P- oder L-Selektine), muss diesem jedoch widersprochen werden (Mannori et al. 1995, Köhler et al. 2010). Zumindest in Kolonkarzinomzellen muss GCNT3 also auch eine Funktion in der Ausbildung von E-Selektinliganden haben.

Die stark HPA-positiven HT29-Zellen benötigen also, wie oben beschrieben, E-Selektin, um ins extravasale Gewebe zu gelangen. Hierbei exprimieren sie verstärkt GCNT3. Wie ebenfalls schon beschrieben, ist die durch GCNT3 synthetisierte Core2-Struktur zumindest für die Bindung an P-Selektin essentiell (Li et al. 1996, Kumar et al. 1996). Auch für den E-Selektinliganden scheint jedoch auch die Core2-Struktur

notwendig zu sein. Ist nun die auf Core2-basierende Struktur (durch GCNT3 synthetisiert) auch gleich dem HPA-Liganden?

Als Hinweis, dass es zumindest in Kolonkarzinomzellen so sein könnte, fanden Köhler et al. (2010), dass es bei in vitro gewachsenen Zellen zu einer verstärkten HPA-Bindung kam. Gleich dazu wurde in den in vitro gewachsenen HT29-Zellen auch vermehrt GCNT3 synthetisiert. In Karzinomzellen mit anderem Ursprungsgewebe scheint es sich nicht so zu verhalten. Valentiner et al. (2005) zeigten, dass HPA die Adhäsion verschiedener Brustkrebszelllinien an Endothel verhindert. Der HPA-Ligand ist auch im Mammakarzinom für die Adhäsion an Endothel notwendig.

In dieser Untersuchung konnte keine GCNT3-Synthese in den untersuchten Mammakarzinomzelllinien nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass im Mammakarzinom der HPA-Ligand anderweitig synthetisiert wird und wahrscheinlich nicht auf einer vermehrten  $\beta$ -1,6-Verzweigung basiert.

Gleiches galt für Melanomzelllinien: Auch in diesen konnte kein GCNT3 nachgewiesen werden. LOX bindet jedoch HPA und ist invasiver in Matrigel als andere untersuchte Melanomzellen (Rye et al. 1998). Im Gegensatz dazu ist FEMX-I weniger invasiv und bindet kein (Rye et al. 1998) oder nur schwach bis mäßig HPA (Thies et al. 2007). In dem Expressionsmuster dieser beiden Zelllinien ließ sich in FEMX-I ein stark positiver Nachweis von ST6N in vitro verzeichnen, wohingegen LOX diese Glykosyltransferase nicht exprimierte. Einschränkend muss gesagt werden, dass LOX lediglich als Zelllinie in vitro untersucht wurde. Es wurde vorbeschrieben, dass eine HPA-Bindung aufgrund von Sialylsäure terminierten und maskierten GalNAc-Resten nicht zu Stande kommt. Sialylsäure ist negativ geladen, so dass Oberflächenstrukturen mit negativer Ladung zu großen Veränderungen im adhäsiven Verhalten von Zellen führen können (Fenlon et al. 1987). Die hohe ST6N-Expression in FEMX-I könnte zu einer vermehrten Sialylierung und Maskierung des möglichen HPA-Bindungspartners führen.

In den Mammakarzinomzellen ist ein derartiger Unterschied in der Expression von Sialyltransferasen als Erklärung für eine verminderte HPA-Bindung nicht deutlich geworden. HBL100 als einzige Zelllinie ohne HPA-Positivität wies keine Änderung in der Expression der untersuchten Sialyltransferasen auf. Eine Erklärung könnte sein, dass eine spezielle Bindung von einer Vielzahl vorhandener Sialyltransferasen katalysiert wird und die hier untersuchten sich von denen im Mammakarzinom exprimierten unterscheiden (Harduin-Lepers et al. 2001). Dass auch in

Mammakarzinomzellen Sialylreste den HPA-Liganden maskieren, bestätigen Brooks und Carter (2001). Zellen eines primären Mammakarzinomtumors, die zuvor HPA-negativ waren und anschließend mit Neuraminidase behandelt wurden (was zur Entfernung von terminierenden Sialylresten führt), wiesen daraufhin in 28 von 32 Proben eine starke HPA-Positivität auf. Dieses legt nahe, dass durch Sialylreste maskierte GlcNAc- und GalNAc-Moleküle eine Bindung an HPA nicht möglich machen. Im Mammakarzinom müssen also andere Sialyltransferasen als die hier untersuchten ursächlich in der unterschiedlichen HPA-Bindungskapazität zwischen HBL100, T47D und MCF-7 sein.

Unstimmig ist, dass die stark HPA-positiven Zelllinien HT29 und MCF-7, wie oben beschrieben, vermehrt ST3O bzw. ST3N exprimieren. Eine Mutmaßung wäre, dass die Art der Bindung von Sialylresten ( $\alpha$ -2,3- oder  $\alpha$ -2,6-Bindung) einen Unterschied in ihrer Funktion macht.

Wie reguliert die Tumorzelle die Sialylierung auf ihrer Oberfläche, um an Selektine zu binden und ins extravasale Gewebe zu gelangen bzw. Oberflächenstrukturen zu terminieren oder zu maskieren? Da hier gezeigt werden konnte, dass GCNT3 in HT29 Zellen, die sich nicht im Zellverband befanden, im Vergleich zu im Tumor wachsenden Zellen viel stärker exprimiert wurden, und es sich mit der  $\alpha$ -2,3-Sialyltransferase ST3O umgekehrt verhält, scheinen die entsprechenden Enzyme in Abhängigkeit ihrer Umgebung aktiv reguliert zu werden. Die Zelle verliert nicht ihre Sialylreste auf ihren Oberflächenstrukturen, sondern müsste neue Glykoproteine bilden, die stärker  $\beta$ -1,6-verzweigt sind und ggf. erst am Ende der stark verzweigten Kette sialyliert werden. Dass sich durch längere und verzweigtere Ketten die Wahrscheinlichkeit erhöht, einen Liganden für Selektine auszubilden, um es der Zelle möglich zu machen in perivaskuläre Gewebe auszuwandern, ist vorzustellen.

Im Gegensatz dazu müssten im Tumorverband kurze, unverzweigte Ketten ausgebildet sein, um interzelluläre Bindungen weniger wahrscheinlich und eine Loslösung vom Zellverband möglich zu machen.

Am Beispiel von dendritischen Zellen konnten Julien et al. (2007) zeigen, dass es im Rahmen der Differenzierung der Zellen zu einer veränderten Expression von sLe<sup>x</sup> auf der Zelloberfläche kam. Dies war nicht so sehr abhängig von der Aktivität der Glykosyltransferasen als vielmehr von dem Verhältnis in dem Core1- und Core2-Strukturen vorlagen. Lag mehr Core1 vor, so kam es zu einer vermindertem Nachweis

von sLe<sup>x</sup> auf der Zelloberfläche. Gleich dem Core1-Core2-Verhältnis verhielt sich auch das GCNT3-ST3O-Verhältnis. Eine höhere ST3O-Expression war verbunden mit einem größeren Vorkommen an Core1-Strukturen. Wahrscheinlich verhält es sich ähnlich mit den HT29-Zellen, welche hier ebenfalls eine gegenläufige Expression in vitro und in vivo zwischen GCNT3 und ST3O aufwiesen. Gegebenenfalls ist hierdurch eine zuvor beschriebene ausgeprägte Heterogenität in der Expression von sLe<sup>x/a</sup> auf HT29 zu erklären. So könnte angenommen werden, dass es je nach Core1-Core2-Verhältnis bzw. GCNT3-ST3O-Verhältnis zu einer großen Variabilität von sLe<sup>x/a</sup> auf der Zelloberfläche kommen kann.

## 5.6 Ausblick

Aufgrund unzureichender RNA-Qualitäten konnten nicht alle Zelllinien in vivo untersucht werden. Einen weiteren interessanten Aspekt könnten In-Vivo-Untersuchungen der stark HPA-positiven Zelllinien LOX (Melanom) und T47D (Mamma), welche ebenfalls ein hohes metastatisches Potential besitzen, erbringen, um weitere Aussagen über den HPA-Liganden und die Metastasierungsmechanismen der Mammakarzinome und Melanome stellen zu können. Des Weiteren könnten für die entsprechenden Gene der Glykosyltransferasen defiziente SCID-Mäuse mittels des Xenograftmodels Aufschluss über die Funktion im Metastasierungsprozess erbringen. Des Weiteren könnte versucht werden, die Expression der Glykosyltransferasen unter Hypoxie zu bestimmen, um Veränderungen zu erfassen, die vom Größenwachstum des Tumors beeinflusst sind.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, Tumorzellen auf die Expression vier verschiedener Glykosyltransferasen (GCNT3, ST3O, ST3N und ST6N) hin zu untersuchen. Diese Glykosyltransferasen sind in der Literatur mit der Metastasenbildung und Malignität von Tumoren sowie der Progression einer Tumorerkrankung in Verbindung gebracht worden. Es sollte speziell untersucht werden, ob Unterschiede in der Genexpression zwischen Tumorzellen mit schwachem und mit starkem metastatischen Potential gefunden werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob Expressionsunterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo* bestehen. Dementsprechend wurden vier Kolonkarzinom-, drei Mammakarzinom- und fünf Melanomzelllinien im Kulturmedium und zum Teil im Xenograftmodell auf die Expression der Glykosyltransferasen hin analysiert. Diese Arbeit soll dazu beitragen, die Funktion von Glykoproteinen auf der Zelloberfläche im Metastasierungsweg von Tumorzellen besser zu verstehen. Folgende Aussagen können anhand dieser Arbeit getroffen werden: In den Kolonkarzinomzelllinien liegt eine vom Metastasierungspotential abhängige Expression von GCNT3 und ST3O vor. Dies lässt schließen, dass sowohl durch ST3O terminierte Core1- als auch durch GCNT3 synthetisierte Core2-Strukturen der O-Glykane im Metastasierungsmechanismus der Kolonkarzinomzelllinien eine Rolle spielen. Des Weiteren konnte bei allen untersuchten Glykosyltransferasen an mindestens einer Zelllinie gezeigt werden, dass deren Expression abhängig von der Zell-zu-Zell-Interaktion ist. Die Expression der Sialyltransferasen ST3O, ST3N und ST6N war in manchen Zelllinien deutlich gesteigert mit gleichzeitigen Expressionsunterschieden *in vitro* und *in vivo*. Es muss davon ausgegangen werden, dass den untersuchten Sialyltransferasen Funktionen im Metastasierungsprozeß zukommen, jedoch ist es möglich, dass eine einzelne Sialyltransferase an mehreren Substraten agiert und verschiedene Funktionen erfüllt. Die Zelllinien mit hohem Metastasierungspotential der verschiedenen Tumorentitäten wiesen unterschiedliche Expressionsmuster der Glykosyltransferasen auf. Verschiedene Tumorarten scheinen auf verschiedene Mechanismen in der Metastasierung zurückzugreifen, insofern man Schlüsse von der Expression der Glykosyltransferasen auf das Metastasierungsverhalten zieht. Stark HPA-positive Zelllinien wiesen keine einheitliche Expression der Glykosyltransferasen auf, was für die Diversität der HPA-Bindungspartner spricht.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Barthel S, Gavino J, Descheny L, Dimitroff C (2007) Targeting selectin and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets* 11: 1473-1491.

Brockhausen I, Yang J, Burchell J, Whitehouse C, Taylor-Papadimitriou J (1995) Mechanism underlying aberrant glycosylation of the MUC1 mucin in breast cancer cells. *European Journal of Biochemistry* 233: 607-617.

Brockhausen I (1999) Pathways of O-glycan Biosynthesis in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1473: 67-95.

Brockhausen I (2006) Mucin-type-O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Reports* 7: 599-604.

Brooks S, Carter T (2001) N-Acetylgalactosamine, N-Acetylglucosamine and sialic acid expression in primary breast cancer. *Acta histochemica* 103: 37-51.

Brooks S, Dwek M, Schumacher U (2002) *Functional and Molecular Glykobiology*. Bios Scientific Publishers Oxford: 214.

Brown J, Fuster M, Whisenant T, Esko J (2003) Expression Patterns of 2,3-Sialyltransferases and 1,3-Fucosyltransferases Determine the Mode of Sialyl Lewis X Inhibition by Disaccharide Decoys. *Journal of Biological Chemistry* 278: 23352-23359.

Burchell J, Poulsom R, Hanby A, Whitehouse C, Cooper L, Clausen H, Miles D, Taylor-Papadimitriou J (1999) An alpha2,3 sialyltransferase (ST3Gal I) is elevated in primary breast carcinomas. *Glycobiology* 9: 1307-1311.

Carvalho A, Harduin-Lepers A, Magalhaes A, Machado E, Mendes N, Costa LT, Matthiesen R, Almeida R, Coasta J, Reis CA (2010) Differential Expression of  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase and  $\alpha$ 1,3/4 -fucosyltransferase regulates the levels of sialyl Lewis a and sialyl Lewis x in gastrointestinal carcinoma cells. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 42: 80-89.

Christie D, Shaikh F, Lucas IV J, Lucas III J, Bellis S (2008) ST6Gal-I expression in ovarian cancer cells promotes an invasive phenotype by altering integrin glycosylation and function. *Journal of Ovarian Research* 1: 1-8.

Dall'Ollio F, Malagolini N, DiStefano G, Minni F, Marrano D, Serafini-Cessi F (1998) Increased CMP-Neu-Ac:Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase activity in human colorectal cancer tissues. *International Journal of Cancer* 44: 434-439.

Dall'Ollio F, Chiricolo M (2001) Sialyltransferases in cancer. *Glycoconjugate Journal* 18: 841-850.

De Fromentel CC, Nardeux PC, Soussi T, Laviaille C, Estrade S, Carioni G, Chandrasekaran K, Cassingena R (1985) Epithelial HBL-100 cell line derived from milk of an apparently healthy woman harbours SV40 genetic information. *Experimental Cell Research* 160: 83-94.

Dimitroff C, Pera P, Dall'Olio F, Matta K, Chandrasekaran E, Lau J, Bernacki R (1999) Cell Surface N-Acetylneuraminic Acid  $\alpha$ 2,3-Galactoside-Dependent Intercellular Adhesion of Human Colon Carcinoma Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 256: 631-636.

Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS (1991) „Touchdown“ PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* 19: 4008.

Dwek MJ, Ross HA, Streets AJ, Brooks SA, Adam E, Titcomb A, Woodside, Schumacher U, Leathem AJ (2001) Helix pomatia agglutinin lectin-binding oligosaccharides of aggressive breast cancer. *International Journal of Cancer* 95: 79-85.

Fenlon S, Ellis IO, Bell J, Todd JH, Elston CW, Blamey R (1987) Helix pomatia and Ulex europeus lectin binding in human breast carcinoma. *Journal of Pathology* 152: 169-176.

Fukuda M (1996) Possible Roles of Tumor-associated Carbohydrate Antigens. *Cancer Research* 56: 2237-2244.

Fukuda M (2002) Roles of mucin-type O-glycans in cell adhesion. *Biochimica et Biophysica Acta* 1573: 394-405.

Gillespie W, Kelm S, Paulson J (1992) Cloning and expression of the Gal- $\beta$ -1,3GalNAc-2,3-sialyltransferase. *J. Biol. Chem* 267: 21004-21010.

Goonetilleke K, Siriwardena A (2007) Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19.9) as biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *EJSO* 33: 266 – 270.

Gretschel S, Haensch W, Schlag P, Kemmner W (2003) Clinical Relevance of Sialyltransferases ST6Gal-I and ST3Gal-III in Gastric Cancer. *Oncology* 65: 139-145.

Hakomori S (2002) Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 99: 10231-10233.

Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krezwinski-Recchi M, Samyn-Petit B, Julien S, Delannoy P (2001) The Human Sialyltransferase Family. *Biochimie* 83: 727-737.

Hollingsworth M, Swanson B (2004) Mucins in Cancer: Control and Protection of the Cell Surface. *Nature Reviews Cancer* 4: 45-60.

Huang M-C, Chen H-Y, Huang H-C, Hung J, Liang J, Shen T, Lin N, Ho C-C, Cho I-M, Hsu S-M (2006) C2GnT-M is downregulated in colorectal cancer and its re-expression causes growth inhibition of colon cancer cells. *Oncogene* 25: 3267-3276.

Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005) Real-time RT PCR normalisation, strategies and considerations. *Genes and Immunity* 6: 279-284.

Hull S, Bright A, Carraway K, Abe M, Hayes D, Kufe D (1989) Oligosaccharide differences in the DF3 sialomucin antigen from normal human milk and the BT-20 human breast carcinoma cell line. *Cancer Commun.* 1: 261-267.

Ikehara Y, Kojima N, Kurosawa N, Kudo T, Kono M, Nishihara S, Issiki S, Morozumi K, Itzkowitz S, Tsuda T, Nishimura S, Tsuji S, Narimatsu H (1999) Cloning and expression of a human gene encoding an N-acetylgalactosamine- $\alpha$ 2,6- sialyltransferase (ST6GalNAc I): a candidate for synthesis of cancer-associated sialyl-Tn antigens. *Glycobiology* 9: 1213-1224.

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

Itzkowitz S, Bloom E, Kokal W, Modin G, Hakomori S, Kim Y (1990) Sialosyl-Tn. A novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients. *Cancer* 66: 1960-1966.

Jin X-L, Zheng S-S, Wang B-S, Chen H-L (2004) Correlation of glycosyltransferases mRNA expression in extrahepatic bile duct carcinoma with clinical and pathological characteristics. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International* 3: 292 -295.

Julien S, Krzewinski-Recchi M, Harduin-Lepers A, Gouyer V, Guillemette H, Le Bourhis X, Delannoy P (2001) Expression of Sialyl-Tn antigen in breast cancer cells transfected with the human CMP-Neu5Ac: GalNAc  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc I) cDNA. *Glycoconjugate Journal* 18: 883-893.

Julien S, Lagadec C, Krzewinski-Recchi M, Courtand G, Xuefen L, Delannoy P (2005) Stable expression of sialyl Tn antigen in T47D cells induces a decrease of cell adhesion and an increase of cell migration. *Breast Cancer Research and Treatment* 90: 77-84.

Julien S, Grimshaw M, Sutton-Smith M, Coleman J, Morris H, Dell A, Taylor-Papadimitriou J, Burchell J (2007) Sialyl-Lewisx on P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 is regulated during differentiation and maturation of dendritic cells: A mechanism involving the glycosyltransferases C2GnT1 and ST3Gal. *The Journal of Immunology* 179: 5701-5710.

Takeji Y, Tsujitani S, Mori M, Maehara Y, Sugimachi K (1991) Helix pomatia agglutinin binding activity is a predictor of survival time of patients with gastric carcinoma. *Cancer* 68: 2438-2442.

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

Kitagawa H, Paulson JC (1993) Cloning and expression of human Gal beta 1,3(4)GlcNAc alpha 2,3 sialyltransferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 194: 375-382.

Kjønniksen I, Rye P, Fodstad O (1994) Helix pomatia agglutinin binding in human tumour cell lines: correlation with pulmonary metastasis in nude mice. *British Journal of Cancer* 69: 1021-1024.

Köhler S, Ullrich S, Richter U, Schumacher U (2010) E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung. *British Journal of Cancer* 102: 602 – 609.

Koike T, Kimura N, Miyazaki K, Yabuta T, Kumamoto K, Takenoshita S, Chen J, Kobayashi M, Hosokawa M, Taniguchi A, Kojima T, Ishida N, Kawakita M, Yamamoto H, Takematsu, H Suzuki A, Kozutsumi Y, Kannagi R, Kanangi R (2004) Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: A missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 8132-8137.

Kumar R, Camphausen R, Sullivan F, Cumming D (1996) Core2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase enzyme activity is critical for P-Selectin glycoprotein ligand-1 binding to P-Selectin. *Blood* 88: 3872-3879.

Laack E, Nikbakht H, Peters A, Kugler C, Jasiewicz Y, Edler L, Hossfeld D, Schumacher U (2002) Lectin histochemistry of resected adenocarcinoma of the lung: helix pomatia agglutinin binding is an independent prognostic factor. *American Journal of Pathology* 160: 1001-1008.

Leathem AJ, Brooks SA (1987) Predictive value of lectin-binding on breast cancer recurrence and survival. *Lancet* 9: 1054-1056.

Lee EU, Roth J, Paulson JC (1989) Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 264: 13848-13855.

Lepecq JB, Paoletti C (1967) A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: Physical and chemical characterization. *Journal of Molecular Biology* 27: 87-106.

Leppänen A, Yago T, Otto VI, McEver RP, Cummings RD (2003) Model glycosulfopetides from P-Selectin glycoprotein ligand 1 require tyrosine sulfation and a core-2 branched O-glycan to bind to L-Selectin. *Journal of Biological Chemistry* 278: 26391-26400.

Li F, Wilkins P, Crawley S, Weinstein J, Cummings RD, McEver RP (1996) Post-translational Modifications of Recombinant P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Required for Binding to P- and E-Selectin. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 3255-3264.

Lin S, Kemmner W, Grigull S, Schlag P (2002) Cell surface  $\alpha$ 2,6-Sialylation Affects Adhesion of Breast Carcinoma Cells. *Experimental Cell Research* 276: 101-110.

Lloyd K, Burchell J, Kudryashov V, Yin B, Taylor-Papadimitriou J (1996) Comparison of O-Linked Carbohydrate Chains in MUC-1 Mucin from Normal Breast Epithelial Cell Lines and Breast Carcinoma Cell Lines. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 33325-33334.

Lorke D, Krüger M, Buchert R, Bohuslavizki K, Clausen M, Schumacher U (2001) In vitro and in vivo tracer characteristics of an established multi-drug-resistant colon cancer cell line. *Journal of Nuclear Medicine* 42: 646-654.

Lowe J (2002) Glycosylation in the control of selectin counter-receptor structure and function. *Immunol. Rev* 186: 19-36.

Macabeo-Ong M, Ginzinger D, Dekker N, McMillan A, Regezi J, Wong D, Jordan R (2002) Effect of Duration of Fixation on Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Analyses. *Modern Pathology* 15: 979-98.

Machida E, Nakayama J, Amano J, Fukuda M (2001) Clinicopathological significance of core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase messenger RNA expressed in the pulmonary adenocarcinoma determined by in situ hybridization. *Cancer Research* 61: 2226-2231.

Mannori G, Crottet P, Cecconi O, Hanasaki K, Aruffo A, Nelson R, Varki A, Bevilacqua M (1995) Differential colon cancer cell adhesion to E-, P- und L-selectin: role of mucin-type glycoproteins. *Cancer Research* 55: 4425-4431.

Meijerink J, Mandigers C, van de Locht L, Tönnissen E, Goodsaid F, Raemaekers J (2001) A Novel Method to Compensate for Different Amplification Efficiencies in Patient DNA Samples in Quantitative Real-Time PCR. *Journal of Molecular Diagnostics* 3: 55-61.

Mitchell B, Brooks SA, Leathem AJ, Schumacher U (1998) Do HPA and PHA-L have the same binding pattern in metastasizing human breast and colon cancers? *Cancer Letters* 123: 113-119.

Mizuno T, Nagamura H, Iwamoto KS, Ito T, Fukuhara T, Tokunaga M, Tokuoka S, Mabuchi K, Seyama T (1998) RNA from decades-old archival tissue blocks for retrospective studies. *Diagn Mol Pathol* 7: 202-208.

Montel V, Huang T, Mose E, Pestonjamas K, Tarin D (2005a) Expression Profiling of Primary Tumors and Matched Lymphatic and Lung Metastases in a Xenogenic Breast Cancer Model. *American Journal of Pathology* 166: 1565-1579.

Montel V, Pestonjamas K, Mose E, Tarin D (2005b) Tumor-host interactions contribute to the elevated expression level of alpha1-antichymotrypsin in metastatic breast tumor xenografts. *Differentiation* 73: 88-98.

Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, Furukawa H, Ishikawa O, Sasaki Y, Kabuto T, Iwanaga T, Matsushita Y, Irimura T (1993) Increased expression of sialyl Lewis x antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Research* 53: 3632-3637.

Nakamura M, Kudo T, Narimatsu H, Furukawa Y, Kikuchi J, Asakura S, Yang W, Iwase S, Hatake K, Miura Y (1998) Single Glykosyltransferase, Core 2  $\beta$ 1-6-N-acetylglucosaminyltransferase, Regulates Cell Surface Sialyl-Le<sup>x</sup> Expression Level in Human Pre-B Lymphocytic Leukemia Cell Line KM3 Treated With Phorbol ester. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 26779-26789.

Ogawa J, Inoue H, Koide S (1997)  $\alpha$ -2,3-Sialyltransferase Type 3N and  $\alpha$ -1,3-Fucosyltransferase Type VII Are Related to Sialyl Lewis x Synthesis and Patient Survival from Lung Carcinoma. *Cancer* 79: 1678-1685.

Okuyama T, Maehara Y, Kakeji Y, Tsujitani S, Korenaga D, Sugimachi K (1998) Interrelation between tumor-associated cell surface glykoprotein and host immune response in gastric carcinoma patients. *Cancer* 82: 1468-1475.

Peréz-Garay M, Beatriz A, Pagès L, de Llorens R, de Bolòs C, Vidal-Vanaclocha F, Peracaula R (2010)  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase ST3Gal III modulates pancreatic cancer cell motility and adhesion in vitro and enhances metastatic potential in vivo. *PLoS One* 5: 12524.

Picco G, Julien S, Brockhausen I, Beatson R, Antonopoulos A, Haslam S, Mandel U, Dell A, Pinder S, Taylor-Papadimitriou J, Burchell J (2010) Over-expression of ST3Gal-I promotes mammary tumorigenesis. *Glycobiology* 20: 1241-1250.

Priatel J, Chui D, Hiraoka N, Simmons C, Richardson K, Page D, Fukuda M, Varki N, Marth J (2000) The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD 8 + T-lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. *Immunity* 12: 273-283.

Prorok-Hamon M, Notel F, Mathieu S, Langlet C, Fukuda M, El-Battari A (2005) N-glycans of core2  $\beta$ (1,6)-N-Acetylglucosaminyltransferase-I (C2GnT-I) but not those of  $\alpha$ (1,3)-fucosyltransferase-VII (FucT-VII) are required for the synthesis of functional P-selectinglycoprotein ligand-1 (PSGL-1): effects on P-, L- and E-selectin binding. *Biochemical Journal* 391: 491-502.

Rasmussen R, Morrison T, Herrmann M, Wittwer CT (1998) Quantitative PCR by Continuous Fluorescence Monitoring of a Double Strand DNA Specific Binding Dye. *Biochemica* 2: 8-11.

Recchi M, Hebbbar M, Hornez L, Harduin-Lepers A, Peyrat J-P, Delannoy P (1998) Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assessment of Sialyltransferase in Human Breast Cancer. *Cancer Research* 58: 4060-4077.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997) Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves During the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* 245: 154-160.

Roche Applied Sciences (1998) The LightCycler – the Smartest Innovation for more Efficient PCR. *Biochemica* 2: 4-7.

Roche Applied Sciences (2001) Relative Quantification. Technical Note LightCycler.

Rye P, Fodstad O, Emilsen E, Bryne M (1998) Invasion Potential and N-Acetylgalactosamine Expression in a Human Melanoma Model. *International Journal of Cancer* 75: 609-614.

Saint-Guirons J, Zeqiraj E, Schumacher U, Greenwell P, Dwek M (2007) Proteome analysis of metastatic colorectal cancer cells recognized by the Helix pomatia agglutinin (HPA). *Proteomics* 7: 4082-4089.

Schneider F, Kemmner W, Haensch W, Franke G, Gretsche S, Karsten U, Schlag PM (2001) Overexpression of Sialyltransferase CMP-Sialic Acid: Gal $\beta$ 1,3GalNAc-R  $\alpha$ 6-sialyltransferase is related to poor patient survival in human colorectal carcinoma. *Cancer Research* 61: 4605-4611

Schumacher U, Higgs D, Loizidou M, Pickering R, Leatham A, Taylor I (1994) Helix pomatia agglutinin binding is a useful prognostic marker in colorectal carcinoma. *Cancer* 74: 3104-3107.

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

Schwientek T, Nomoto M, Levery SB, Merckx G, van Kessel AG, Bennett E, Hollingsworth M, Clausen H (1999) Control of O-Glycan Branch formation. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 4504-4512.

Seales E, Jurado G, Brunson B, Wakefield J, Frost A, Bellis S (2005) Hypersialylation of  $\beta$ 1 Integrins, Observed in Colon Adenocarcinoma, May Contribute to Cancer Progression by Up-Regulating Cell Motility. *Cancer Research* 65: 4645-4652.

Sewell R, Bäckström M, Dalziel M, Gschmeissner S, Karlsson H, Noll T, Gätgens J, Clausen H, Hansson G, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J (2006) The ST6GalNAc-I Sialyltransferase Localizes throughout the Golgi and Is Responsible for the Synthesis of the Tumor-associated Sialyl-Tn O-Glycan in Human Breast Cancer. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 3586-3594.

Sharkey FE, Fogh J (1984) Considerations in the use of nude mice for cancer research. *Cancer Metastasis Rev* 3: 341-360.

Shimodaira K, Nakayama J, Nakamura N, Hasebe O, Katsuyama T, Fukuda M (1997) Carcinoma associated Expression of Core 2  $\beta$ -1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase Gene in Human Colorectal Cancer: Role of O-Glykans in Tumor Progression. *Cancer Research* 57: 5201-5206.

Snapp K, Heitzig C, Ellies L, Marth J, Kansas G (2001) Differential requirements for the O-linked branching enzyme  $\beta$ 1-6-N-glucosaminyltransferase in biosynthesis of ligands for E- and P-selectin. *Blood* 97: 3806-3811.

Soule HD, Vasquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973) A human breast cancer cell line from a pleural effusion derived from breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51: 1409-1416.

Specht K, Richter T, Mueller U, Walch A, Werner M, Höfler H (2002) Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin embedded tumor tissue. *American Journal of Pathology* 158: 419-429.

St. Hill C, Farooqui M, Mitcheltree G, Gulbahce H, Jesurun J, Cao Q, Walcheck B (2009) The high affinity selectin glycan ligand C2-O-sLe<sup>x</sup> and mRNA transcripts of the core 2  $\beta$ -1,6-NAcetylglucosaminyltransferase (C2GnTI) gene are highly expressed in human colorectal adenocarcinomas. *BMC Cancer* 9: 79-93.

Theillin O, Zorzi W, Lakaye B, de Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* 75: 291-295.

Thies A, Mauer S, Fodstad O, Schumacher U (2007) Clinically proven markers of metastasis predict metastatic spread of human melanoma cells engrafted in scid mice. *British Journal of Cancer* 96: 606-619.

Thies A, Moll I, Berger J, Schumacher U (2001) Lectin binding to malignant cutaneous melanoma: HPA is associated with metastasis formation. *British Journal of Cancer* 84: 819-823.

Thijssen V, Brandwijk R, Dings R, Griffioen A (2004) Angiogenesis gene expression profiling in xenograft models to study cellular interactions. *Experimental Cell Research* 299: 286-293.

Tsuboi S, Fukuda M (1997) Branched O-Linked oligosaccharides epitopically expressed in transgenic mice reduce primary T-cell immune responses. *EMBO Journal* 16: 6364-6373.

Valentiner U, Pfüller U, Baum C, Schumacher U (2002) The cytotoxic effect of mistletoe lectins I, II and III on sensitive multidrug resistant human colon cancer cell lines in vitro. *Toxicology* 171: 187-199.

Valentiner U, Hall D, Brooks SA, Schumacher U (2005) HPA binding and metastasis formation of human breast cancer cell lines transplanted into severe combined immunodeficient (scid) mice. *Cancer Letters* 219: 233-242.

Vazquez-Martin C, Cuevas E, Gil-Martin E, Fernandez-Briera A (2004) Correlation analysis between tumor-associated antigen sialyl-Tn expression and ST6GalNAc I activity in human colon adenocarcinoma. *Oncology* 67: 159-165.

Videira P, Correia M, Malagolini N, Crespo H, Ligeiro D, Calais F, Trindade H, Dall'Olio F (2009) ST3Gal.I sialyltransferase relevance in bladder cancer tissues and cell lines. *BMC Cancer* 9: 357-372.

Wen D, Livingston B, Medhzihradsky K, Kelm S, Burlingame AL, Paulson J (1992) Primary structure of Gal-b-1,3(4)GlcNAc $\alpha$ -2,3-sialyltransferase determined by mass spectrometry sequence analysis and molecular cloning. Evidence for a protein motif in the sialyltransferase gene family. *J. Biol. Chem.* 267: 21011-21019.

Werther JL, Tatematsu M, Klein R, Kurihara M, Kumagai K, Llorens P, Guidugli Neto J, Bodian C, Pertsemliadis D, Yamachika T, Kitou T, Itzkowitz S (1996) Sialosyl-Tn antigen as a marker of gastric cancer progression: an international study. *International Journal of Cancer* 69: 193-199.

Xiao-Ling J, Zheng S-S, Wang B-S, Chen H-L (2004) Correlation of glykosyltransferases mRNA expression in extrahepatic bile duct carcinoma with clinical pathological characteristics. *Hepatobiliary & pancreatic diseases* 3: 292-295.

Yeh J-C, Ong E, Fukuda M (1999) Molecular Cloning and Expression of a Novel  $\beta$ -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase That Forms Core 2, Core 4, and I Branches *The Journal Of Biological Chemistry* 274: 3215-3221

## 8 LEBENS LAUF

geboren am 28.07.1982 in Stade

1994 – 1997            Gymnasium Rövershagen

1998 – 2001           Ratsgymnasium Rotenburg (Wümme)

2001 – 2002           Auslandsaufenthalt Australien

seit WS 2002/2003    Studium der Humanmedizin Universität Hamburg  
Modelstudiengang

Sommer 2005        1. Ärztliche Prüfung

Anfang 2006         Beginn der Promotion am Institut für Anatomie II – Experimentelle  
Morphologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Udo  
Schumacher am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Sommer 2009        2. Ärztliche Prüfung

seit Sept. 2009      Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin am Städtischen  
Klinikum in Lüneburg

## 9 DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. med. Udo Schumacher möchte ich mich für die Überlassung des Dissertationsthemas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien sowie für die freundliche Betreuung bedanken.

Herrn Dr. rer. nat. Reinhard Müller danke ich herzlich für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, die freundschaftliche Zusammenarbeit und Betreuung sowie den fachlichen und seelischen Beistand während des praktischen Teils dieser Dissertation.

Für die Einarbeitung in die Laborarbeit, die tatkräftige Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft in allen Angelegenheiten möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie II, im Besonderen bei Frau Renate Gehrcke, bedanken.

Mein Dank gilt ebenfalls meinen Eltern, Karin und Hans-Otto Meyer, die mir das Medizinstudium und diese Doktorarbeit ermöglicht haben und immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Meinem Vater danke ich des Weiteren für die Hilfe bei der Formatierung und Korrektur dieser Arbeit.

Meinem Ehemann, Philipp Farwick, möchte ich für die vielen Aufmunterungen und die Zuversicht, die er mir in den letzten Jahren gegeben hat, danken. Ich danke ihm für die hilfreiche Kritik und für die Verbesserungsvorschläge an dieser Arbeit.

Nicht genug danken kann ich ihm jedoch dafür, dass er jeden Tag an meiner Seite ist.

## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Korreliert die Expression bestimmter Glykosyltransferasen mit der spontanen Metastasierung humaner Tumorzellen im Xenograftmodell?

im Institut für Anatomie II – Experimentelle Morphologie des Zentrums für Experimentelle Medizin des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. Udo Schumacher) selbstständig und ohne Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe, Jahr des Erscheinens, Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

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

Lüneburg, den 23.03.2011

Anna-Lena Farwick

