

ALTERNATIVE WEGE EINER  
ENDOGENEN BIOSYNTHESE DER *N*-GLYCOLYLNEURAMINSÄURE  
IN MENSCHLICHEN MAMMAKARZINOMZELLEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Mirko von Elstermann**

aus Bergisch Gladbach

Berichterstatter: Prof. Dr. Franz-Georg Hanisch  
Prof. Dr. Dietmar Schomburg

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2006

Diese Arbeit wurde von April 2003 bis Oktober 2006 am Institut für Biochemie II der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln unter der Leitung und der Betreuung von Prof. Dr. Franz-Georg Hanisch durchgeführt.

## DANKSAGUNGEN

Ich bedanke mich vor allem herzlich bei Herrn Prof. Dr. Franz-Georg Hanisch für die richtige Mischung aus Freiheit und Präzision bei der Behandlung wissenschaftlicher Probleme und seine ständige Bereitschaft, bei der praktischen Arbeit mit fundiertem Wissen zur Seite zu stehen.

Ein herzlicher Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Mats Paulsson für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Institut anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. Joachim Schultze und seinen Mitarbeitern, vor allem Dr. Svenja Debey, von der Arbeitsgruppe Molekulare Tumorbologie und Tumorimmunologie (Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Köln) danke ich sehr für die Zusammenarbeit bei der Durchführung der *microarray*-Genexpressionsanalyse und der Auswertung der Daten.

Herr Prof. Dr. Berkessel und seine Mitarbeiter vom Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln, hier vor allem Dr. Julia Frey, haben mir bei der Synthese von Glycolyl-CoA mit ihren Ressourcen und Kenntnissen engagiert geholfen, hierfür ebenfalls einen herzlichen Dank.

Meinen Eltern danke ich für ihre unermüdliche Solidarität und Geduld!

Tanja, zuerst Kollegin, dann Freundin und Gefährtin, bin ich aus voller Seele dankbar für menschliche Herzlichkeit und Wärme in einem mit wissenschaftlichem Scharfsinn und Neugier. Es ist jeden Tag eine neue Freude!

Meinen Kollegen – Hanieh, Isabelle, Sebastian, Marcus, Tilo sowie Regine und Katja aus früheren Zeiten verdanke ich eine anregende und lockere Arbeitsatmosphäre, ohne die so manches Problemchen noch 100x schwieriger geworden wäre.

IV

*Мом Сунцокрету*

## INHALT

Danksagungen	III
Widmung	IV
Inhalt	V
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Sialinsäuren, eine Klasse acidischer Kohlenhydrate</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Sialylierung: Biochemie, Zellbiologie und Physiologie</b>	<b>2</b>
1.2.1 Biochemischer Kontext: Glykosylierung	2
1.2.2 Die Biologie der Sialylierung	4
1.2.3 Die biologische Bedeutung der Glykosylierung; das Beispiel der malignen Transformation	6
<b>1.3. N-Glycolylneuraminsäure in Karzinomzellen</b>	<b>10</b>
1.3.1 Immunologische und infektionsbiologische Vorbemerkungen	10
1.3.2 Biosynthese der Sialinsäuren am Beispiel der Neu5Gc	11
1.3.3 Die Debatte über die Synthese von Neu5Gc durch humane Tumorzellen	13
1.3.4 Die Herkunft der Glycolylgruppe	15
<b>1.4 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>17</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Zellkultur</b>	<b>19</b>
2.1.1 Verwendete Zelllinien	19
2.1.2 Kulturbedingungen der Zellen	19
2.1.3 Kulturbedingungen bei Kultur der Zellen ohne FCS	21
2.1.4 Transfektion der Zellen mit sezerniertem MUC1 (MUC1-S)	21
<b>2.2 Isolation und Analytik der Sialinsäuren</b>	<b>22</b>
2.2.1 Theoretische Vorbemerkungen	22
2.2.1.1 Methoden der Abspaltung von Sialinsäuren	23
2.2.1.2 Reinigung und Verfahren zur analytischen Identifikation von Sialinsäuren	23
2.2.1.2.1 Fluoreszenzdetektion durch HPLC	24
2.2.1.2.2 Vorteile der GC/MS-Analytik	25
2.2.1.2.3 Methoden der Derivatisierung für GC/MS	25
2.2.2 Praktische Durchführung der Sialinsäureanalytik	27
2.2.2.1 Vorbereitung des Zellmaterials	27
2.2.2.2 Analyse der Medien und Serumzusätze auf Neu5Gc	28
2.2.2.3 Hydrolyse der Sialinsäuren	28
2.2.2.3.1 Methanolische HCl	28
2.2.2.3.2 Verdünnte organische Säuren	29
2.2.2.4 Aufreinigung des Hydrolysats	29
2.2.2.5 GC/MS-Analytik	29
2.2.2.5.1 Derivatisierung	29
2.2.2.5.2 GC/MS-Bedingungen	30
2.2.2.6 HPLC-Analytik	31
2.2.2.7 DC-Analytik	31
2.2.2.8 Autoradiographie	32

## VI

<b>2.3. Synthesen</b>	<b>33</b>
2.3.1 Glycolyl-CoA-Synthese	33
2.3.2 Überprüfung des Resultates der Glycolyl-CoA-Synthese mit MALDI-TOF-MS	34
2.3.3 <i>N</i> -Glycolylglucosamin und <i>N</i> -Glycolylmannosamin	34
2.3.3.1 Synthese der Acylhexosamine mit 1,3-Dioxolan-2,4-dion (Jourdian & Roseman 1958)	35
2.3.3.2 Synthese der Acylhexosamine mit 1,3-Dioxolan-2,4-dion (Kuboki et al. 1997)	35
2.3.4 Enzymatische Synthese von Glycolyl-CoA nach Vameq	35
<b>2.4 Aktivität der Glucosamin-6-Phosphat-Acetyltransferase</b>	<b>36</b>
2.4.1 Zellaufschluß und differentielle Ultrazentrifugation	37
2.4.2 Acetyltransferase-Assay und <i>N</i> -Glycolylglucosamin-Nachweis	37
<b>2.5 Fütterungsversuche mit normaler und isotoopenmarkierter GABA</b>	<b>38</b>
2.5.1 Verstoffwechslung von extern zugegebener GABA	38
2.5.2 Kultivierung der Zellen mit deuterierter GABA	38
2.5.3 Kultivierung der Zellen mit radiomarkierter GABA	38
<b>2.6 Immunodetektion der Neu5Gc mit Konfokalmikroskopie</b>	<b>39</b>
<b>2.7 Genetische Analyse des Transkriptoms von T-47D-Zellen im Vergleich mit Epithelzellen</b>	<b>40</b>
2.7.1 RNA-Extraktion	41
2.7.2 cDNA-Synthese	41
2.7.3 Microarray-Analyse	41
2.7.4 Selektion und Test der qrt-PCR-primer	42
2.7.4.1 <i>in silico</i> -Auswahl der primer	42
2.7.4.2 <i>in vitro</i> -Test der primer	43
2.7.5 Durchführung der qrt-PCR	45
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>48</b>
<b>3.1 Sialinsäureanalytik</b>	<b>48</b>
3.1.1 Säurekatalysierte Hydrolyse im Vergleich mit Methanolyse	48
3.1.1.2 Massenspektrometrische Fragmentierungsmuster von Neu5Gc und Neu5Ac	50
3.1.1.3 Sicherstellung der Abwesenheit von Neu5Gc in den verwendeten Zellkulturmedien	55
3.1.1.4 Neu5Gc-Gehalt in T-47D-Zellen und FCS-Anteil des Zellkulturmediums	57
3.1.1.5 Ergebnisse der Sialinsäureanalysen von Krebszelllinien	58
3.1.1.6 Sialinsäureanalyse mit HPLC	59
<b>3.2 Ergebnisse der Synthesen</b>	<b>61</b>
3.2.1 Synthese von 1,3-Dioxolan-2,4-Dion	61
3.2.2 Synthese von <i>N</i> -Glycolylglucosamin mit 1,3-Dioxolan-2,4-Dion	61
3.2.3 Synthese von <i>N</i> -Glycolylglucosamin mit Acetoxyacetylchlorid	62
3.2.4 Synthese von Glycolyl-CoA	63
<b>3.3 Enzymatische Ansätze</b>	<b>64</b>
3.3.1 Enzymatische Umsetzung von Hydroxypyruvat zu Glycolyl-CoA mit PDH	64
3.3.2 Enzymatische Umsetzung von Glycolyl-CoA und Glucosamin zu <i>N</i> -Glycolylglucosamin	65
<b>3.4 GABA und das Auftreten von Neu5Gc</b>	<b>67</b>
3.4.1 Fütterungsversuche mit GABA und d6-GABA	67
3.4.2. 4- <sup>14</sup> C-GABA	67
<b>3.5 Konfokalmikroskopie</b>	<b>68</b>

## VII

<b>3.6 Transkriptomanalyse: <i>microarray</i>-Daten und Validierung durch qrt-PCR</b>	<b>70</b>
3.6.1 <i>Microarray</i> -Analyse: Enzyme in postulierten Neu5Gc-Biosynthesewegen	70
3.6.2 qrt-PCR der am metabolischen Pfad von der GABA zur Neu5Gc beteiligten Enzyme	72
3.6.2.1 Validierung der <i>primer</i> -Tauglichkeit	72
3.6.2.2 Validierung ausgewählter Ergebnisse der <i>microarray</i> -Analyse durch qrt-PCR	73
3.6.3 Veränderungen der Genexpression in T-47D-Zellen	77
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>78</b>
<b>4.1 Neu5Gc in humanen Zellen</b>	<b>78</b>
<b>4.2 Evaluation der Methoden zur Sialinsäureanalytik</b>	<b>79</b>
<b>4.3 Ursprung der Neu5Gc in Karzinomzellen</b>	<b>80</b>
4.3.1 Darstellung quantitativer Analytik seltener Sialinsäuren	80
4.3.2 Sialinsäuretransport und Ursachen der Neu5Gc-Detektion in Karzinomzellen	81
<b>4.4 Diskussion der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse</b>	<b>86</b>
<b>4.5 Neu5Gc und weitere Sialinsäuremodifikationen in Karzinomen</b>	<b>88</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>93</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>94</b>
<b>LITERATUR</b>	<b>95</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>108</b>
<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>110</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>111</b>

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Sialinsäuren, eine Klasse acidischer Kohlenhydrate

Die Sialinsäuren bilden eine Klasse acidischer Kohlenhydrate mit einem Grundgerüst aus neun Kohlenstoffatomen (Abb.1). Mehr als 50 verschiedene biogene Sialinsäuren sind derzeit bekannt (Angata & Varki 2002; Schauer 2004).

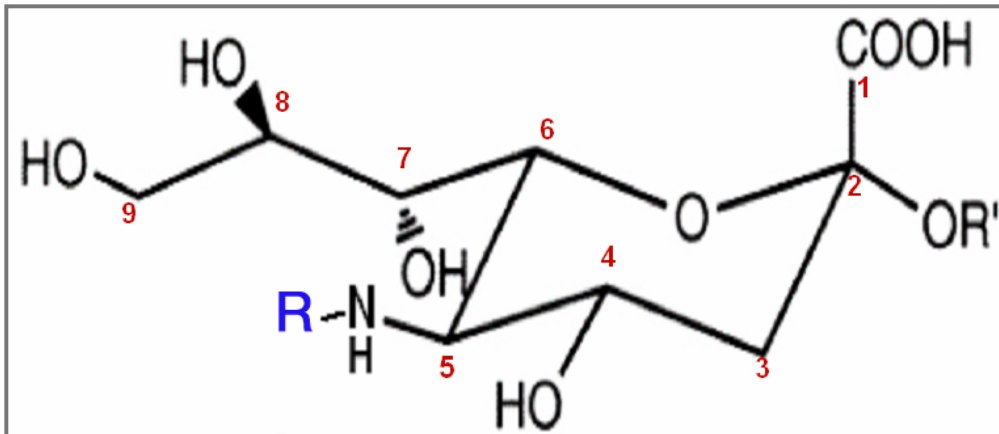


Abb.1 Grundgerüst der Sialinsäuren. An der Stelle von R können z.B. eine Acetyl- (Neu5Ac) oder eine Glycolylgruppe (Neu5Gc) stehen. R' repräsentiert den glykosidischen Bindungspartner. Verändert nach Horstkorte *et al.* 2002.

Im Gegensatz zu den anderen biogenen Kohlenhydraten – mit Ausnahme der Fucose – treten Sialinsäuren in der Natur niemals als  $\beta$ -, sondern ausschließlich als  $\alpha$ -Anomere auf (Kolter & Sandhoff 1997). Der systematische Name des bekanntesten Vertreters, der *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), lautet 5-Acetylamido-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranosonic acid. Wie aus ihrer Benennung hervorgeht, trägt sie eine Acetylgruppe an der Stelle von R in Abbildung 1.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht die *N*-Glycolylneuraminsäure, deren Vorkommen in tierischen Zellen (mit Ausnahme von Mensch und Vögeln) dem der Neu5Ac entspricht. Anstelle der Acetylamidogruppe besitzt das fünfte Kohlenstoffatom der Neu5Gc eine Glycolylamidogruppe (s. Abb. 1 und 9).

Wichtige physikochemische Unterschiede im Vergleich mit Hexosen und Hexosaminen sind die Glycerolseitenkette und die Carboxyfunktion am zweiten Kohlenstoffatom. Diese bedingt den niedrigen pK-Wert (im Fall von Neu5Ac etwa 2,2 - 3, Varki 1994) der Sialinsäuren. Unter physiologischen Bedingungen liegt die Carboxyfunktion deprotoniert vor, so daß Glykanstrukturen durch Sialinsäuren eine negative Ladung erhalten.

Die verschiedenen funktionalen Gruppen des in Abb.1 dargestellten Grundgerüsts können in vielfältiger Weise chemisch modifiziert werden:



- Neben den Gruppen des Hexoseringes können insbesondere die Hydroxyfunktionen an der Glycerolseitenkette chemisch modifiziert werden; verbreitet ist z.B. die Acetylierung (Schauer *et al.* 2001); als Spezialfall wurde im Seeigel die 9-O-Sulfatierung (Kitazume *et al.* 1996) gefunden.
- Die Aminogruppe am fünften C-Atom liegt in den meisten Fällen als Acylamidogruppe vor, wie schon für die Neu5Ac und Neu5Gc beschrieben. *In vivo* lassen sich Sialinsäuren synthetisieren, die am 5. Kohlenstoffatom Modifikationen nicht-biogener Herkunft tragen, so z.B. einen Fettsäurerest oder eine Azidogruppe. Durch solche Modifikationen können Immunreaktionen gegen Sialinsäure-haltige Epitope untersucht (Oetke *et al.* 2001) oder chemisch markierte Sialinsäuren in Glykane eingeführt werden (Luchansky *et al.* 2004).
- In den Oozyten der Regenbogenforelle wurde eine am fünften C-Atom deaminierte Sialinsäure, die KDN (2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galactonulosonic acid) entdeckt (Nadano *et al.* 1986), die anstelle der Aminogruppe eine Hydroxyfunktion besitzt. KDN wurde dann auch im menschlichen Organismus gefunden, und zwar in Lungenkrebszellen (Inoue 1996; Inoue *et al.* 2006). Ausgehend vom unmodifizierten KDN-Molekül findet man in biologischem Material wiederum Modifikationen durch Acylierung, z.B. am neunten Kohlenstoffatom (Iwasaki *et al.* 1990).

Die Sialinsäuren wurden unabhängig von einander durch Gunnar Blix (Blix 1936) in Uppsala und Ernst Klenk (Klenk 1941) am Institut für Biochemie des Klinikums der Universität zu Köln entdeckt. Klenks Bezeichnung dieser Stoffklasse als Neuraminsäuren geht auf die Lokalisierung in den von ihm erstmalig charakterisierten Gangliosiden zurück, Glykolipiden in neuronalen Ganglien. Blix' Namensgebung „Sialinsäuren“ (griechisch  $\sigma\iota\alpha\lambda\omicron\varsigma$  bedeutet im Deutschen Speichel) entstammt der Analyse von Glykanstrukturen auf Mucinen von Milch und Schleimhäuten.

## **1.2. Sialylierung: Biochemie, Zellbiologie und Physiologie**

### **1.2.1 Biochemischer Kontext: Glykosylierung**

Die Addition von Sialinsäuren an Glykoproteine erfolgt im Kontext der Glykosylierung als ko- bzw. posttranslationaler Proteinmodifikation. Diese Modifikation besteht in der kovalenten Bindung eines Mono- oder

Oligosaccharides an bestimmte Aminosäurereste von Proteinen (Peter-Katalinic 2005; Medzihradzky 2005) oder an das Sphingosin von Glycosphingolipiden (DeGroote *et al.* 2004) Die Glykosylierung von Proteinen, deren wissenschaftliche Erforschung historisch z.B. durch die Entdeckung von Zuckern in Mucin-Hydrolysaten durch Hoppe-Seyler (1877) markiert wird, findet sich bei mehr als der Hälfte vor allem der extrazellulären Proteine (z.B., Ohtsubo & Marth 2006)

Die Synthese von extrazellulären O-Glykanen erfolgt im Golgi-Apparat. Sie beginnt mit der glykosidischen Bindung der Hemiacetalgruppe von GalNAc in  $\alpha$ -anomerer Position an die Hydroxyfunktion eines Serin- oder Threoninrestes (Hang & Bertozzi 2005). Die N-Glykosylierung findet im endoplasmatischen Retikulum statt. Hier wird die Hemiacetalgruppe des endständigen GlcNAc eines zuvor gebildeten Oligosaccharids aus 15 Kohlenhydratmolekülen glykosidisch mit der Amid-NH<sub>2</sub>-Gruppe eines Asparagins verbunden.

Nach der erwähnten Bindung des 15-meren Oligosaccharids an den Asparaginrest wird aus dem *high-Mannose-N-Glykan* in mehreren Schritten einer Prozessierung die endgültige komplexe Glykanstruktur gebildet, u.a. im letzten Schritt durch terminale Bindung einer Sialinsäure. Das bei der Mucintypischen O-Glykosylierung mit einem Threonin- oder Serinrest verbundene GalNAc wird im cis- bis trans-Golgi durch eine Serie verschiedener Glykosyltransferasen mit weiteren Zuckern verlängert, wobei Gal-, GlcNAc-, Fucose- und Sialinsäuremoleküle die Glykanketten auf bis zu 20 Monosaccharide erweitern.

Die entstehenden Glykanstrukturen lassen sich in *core*, *backbone* und *periphery* untergliedern (Abb. 2), wobei bisher 8 verschiedene *core*-Strukturen identifiziert wurden (vgl. Brockhausen 1999). Den hier kurz dargestellten Glykosylierungstyp bezeichnet man als Mucin-Typ O-Glykosylierung, weil die Proteinklasse der membranständigen Mucine, die die apikalen Oberflächen glandulärer Epithelzellen bedecken, zu mehr als der Hälfte ihrer Molekularmasse aus solchen Glykanstrukturen bestehen (Hanisch & Müller 2000). Genetische Defekte in den Genen der Glykosyltransferasen führen in manchen, jedoch nicht in allen Fällen zu Krankheitssymptomen (Ohtsubo & Marth 2006).

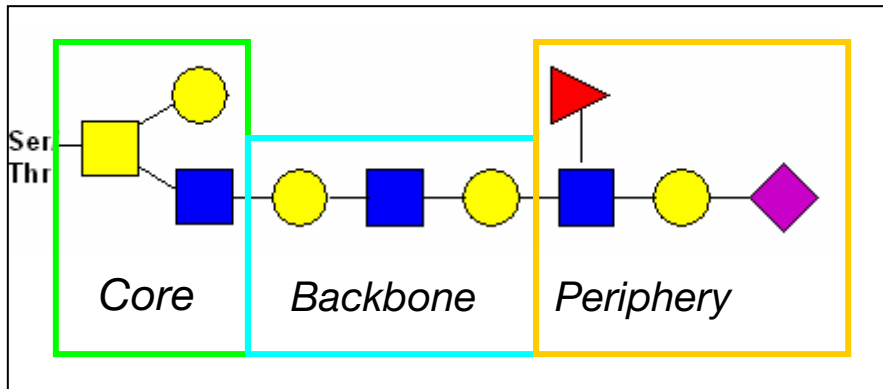


Abb.2  
Gliederung der  
Struktur von  
O-Glykanen.  
Zur Bedeutung der  
Farbsymbole in  
dieser und in den  
folgenden  
Abbildungen vgl.  
Abkürzungs-  
verzeichnis,  
S.108.

Neben der Mucin-O-Glykosylierung existieren weitere Formen der O-Glykosylierung, die physiologisch von großer Bedeutung sind. Die *intrazelluläre* O-Glykosylierung ist durch die Bindung eines einzelnen GlcNAc-Moleküls (Chou & Hart 2001) an Serin- oder Threoninresten, im Einzelfall des Glykogenins an einem Tyrosinrest (Smythe & Cohen 1991), charakterisiert; dieser Prozeß steht in Wechselbeziehungen mit der Phosphorylierung, häufig an gleicher Position, wodurch dynamische funktionale Modifikationen intrazellulärer Proteine möglich werden (Love & Hanover 2005), wie z.B. im Fall der Hormonrezeptoren des Zellkerns (Chen *et al.* 2000). Zu erwähnen ist auch die O-Mannosylierung, die – etwa im Fall des  $\alpha$ -Dystroglycans – essentiell für die Funktion des Proteins *in vivo* ist. Über die Molekularbiologie dieses Glykosylierungstyps ist noch nicht viel bekannt; das Fehlen der Mannosyltransferasen führt im humanen Phänotyp zu schweren Muskeldystrophien (Endo 2005).

### 1.2.2 Die Biologie der Sialylierung

Sialinsäuren kommen – mit der Ausnahme ihres Einbaus in Polysialinsäuren, s.u. Abschnitt 1.2.2 – als terminale Bausteine der O- und N-Glykane extrazellulärer Glykoproteine sowie der Ganglioside als Unterklasse der Glykosphingolipide vor (vgl. Abb. 2, 3, 5, 6 und 8). Sialinsäuremoleküle bilden – neben Fucosemolekülen – somit die „Kappe“ von Glykanen und gehören zu den molekularen Strukturen der Zelle, die als erste in Kontakt mit anderen Molekülen oder Zellen treten. Aufgrund dieser Position in Glykanen kommt ihnen die generelle Aufgabe zu, immunogene Glykanstrukturen abzudecken (Schauer 1985), wie sie z.B. durch GalNAc-Epitope gebildet werden (Hanisch & Ninkovi 2006).

Durch ihre Carboxygruppe senken Sialinsäuren den pH-Wert der lokalen, extrazellulären Umgebung, was sich z.B. für das Neuritenwachstum als notwendig erwiesen hat (Freire *et al.* 2002; 2004). Es ist darüber hinaus auch gezeigt worden, daß die unter physiologischen Bedingungen negative Ladung der Carboxygruppe der Sialinsäuren das Öffnungsverhalten des spannungsgesteuerten Natriumkanals reguliert (Johnson *et al.* 2004).

Bekannt ist seit langem, daß Sialinsäuren Liganden für die Rezeptorproteine der Selectine (Varki und Angata 2006) und der Siglecs (Crocker 2002) sind, die Adhäsion und Signalübertragungsprozesse steuern. Auch die Adhäsion von Viruspartikeln wie z.B. HIV oder Influenzavirus (Klenk *et al.* 2002) erfolgt durch die Interaktion der Sialinsäuren und dem entsprechenden viralen Protein. Möglicherweise beeinflussen die verschiedenen zell- und organspezifischen chemischen Modifikationen der Sialinsäuren die Regulierbarkeit dieser Prozesse; Erythrozyten lassen sich beispielsweise nicht nur Blutgruppenspezifische Glykane, sondern auch spezifische Sialinsäureprofile zuordnen (Bulai *et al.* 2003).

Im Mausmodell wurde gezeigt (Schwarzkopf *et al.* 2002), daß Mutanten, die die Neu5Ac-Synthese enzymatisch nicht ausführen können, zu einem frühen Zeitpunkt der Embryonalentwicklung absterben. Aus diesem Befund ergibt sich, daß die Aufnahme von Sialinsäuren aus der Nahrung nicht für einen viablen Phänotyp ausreicht.

Im Zuge der *N*-Glykosylierung kann es organ- und entwicklungsabhängig zu einer Polysialylierung kommen. Hier werden an das Sialinsäuremolekül, das das terminale Molekül eines komplexen *N*-Glykans bildet, weitere Sialinsäuremoleküle zu einem Polysaccharid, der Polysialinsäure (PSA), verknüpft (Angata & Fukuda 2003). Das prominenteste Beispiel für Polysialylierung bei Humanproteinen ist das *Neural Cell Adhesion Molecule*, NCAM. Hier wird die Interaktion des NCAM mit anderen Zellen über das Vorhandensein und Ausmaß der Glykosylierung mit einer PSA aus bis zu 200 Neu5Ac-Molekülen geregelt.

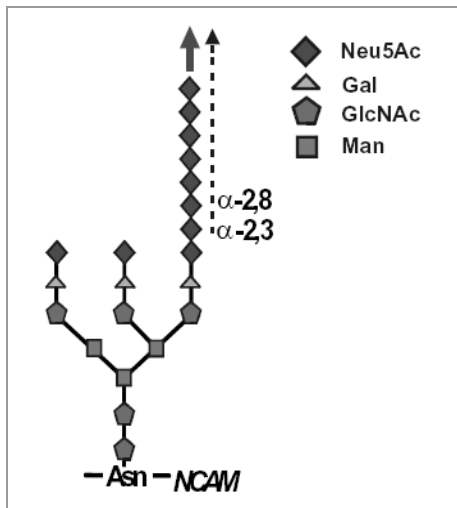


Abb. 3 Neu5Ac-Bindung und Bildung von Polysialinsäure am NCAM-Molekül.  
Aus Hoffmann 2004, S.23

Andere Beispiele für PSA sind Poly-KDN, die bisher als oncofetales Antigen in Lungenkrebs detektiert (Qu *et al.* 1996) sowie in zwei Glykoproteinen der Ratte nachgewiesen wurde (Ziak *et al.* 1996; 1999; 2002). Poly-Neu5Gc wurde bisher auf der Zellmembran des Seeigels gefunden (Kitazume *et al.* 1996).

### 1.2.3 Die biologische Bedeutung der Glykosylierung; das Beispiel der malignen Transformation

Im Rahmen des zellulären Systems beeinflussen Art und Ausmaß der Glykosylierung Funktion, Zellsortierung und Lebensdauer von Proteinen. N-Glykane können intrazellulär die native Faltung eines Proteins unterstützen (Mitra *et al.* 2006). Im sekretorischen Transportweg und im extrazellulären Raum schützen O-Glykane auf Proteinen das Peptidrückgrat vor Proteaseverdau (Kozarski *et al.* 1988). Auch die Entscheidung zwischen Rezyklisierung oder Abbau eines Membranproteins nach Reinternalisierung in die Zelle scheint in Verbindung mit der jeweiligen Glykanstruktur zu stehen (Altschuler *et al.* 2000).

Veränderungen der Glykosylierung von Membranproteinen begleiten darüber hinaus grundlegende Entwicklungszustände der Zelle, wie z.B. Apoptose (Franz *et al.* 2006) oder maligne Transformation (Brockhausen 2006). Die Bedeutung der Glykosylierung von Zelladhäsionsproteinen - z.B. im Fall des erwähnten NCAM oder der Integrine (Veiga *et al.* 1995) - ist schon seit längerer Zeit bekannt. Die Kontrolle von Signalübertragungswegen durch Glykosylierung von Rezeptorproteinen, wie z.B. bei der Fucosylierung von Notch durch die

Glycosyltransferase fringe (Haines & Irvine 2003), wurde erst in den letzten Jahren klar.

Vor allem die Glykobiologie der malignen Transformation, die auch den physiologischen Kontext der vorliegenden Arbeit bildet, ist seit langem (Hakomori 1986) Gegenstand der Forschung. Gut untersucht sind hier die Veränderungen der O-Glykane des Mucins MUC1 im Fall des Brust- und Darmkrebs. Beide stehen in einem engen Zusammenhang mit der Sialylierung, und sollen deshalb hier kurz dargestellt werden.

Das Mucin (hierzu s. Abschnitt 2.1) MUC1 besitzt in seiner extrazellulären Domäne eine *variable number of tandem repeats*- (VNTR-) Domäne (Abb. 4).

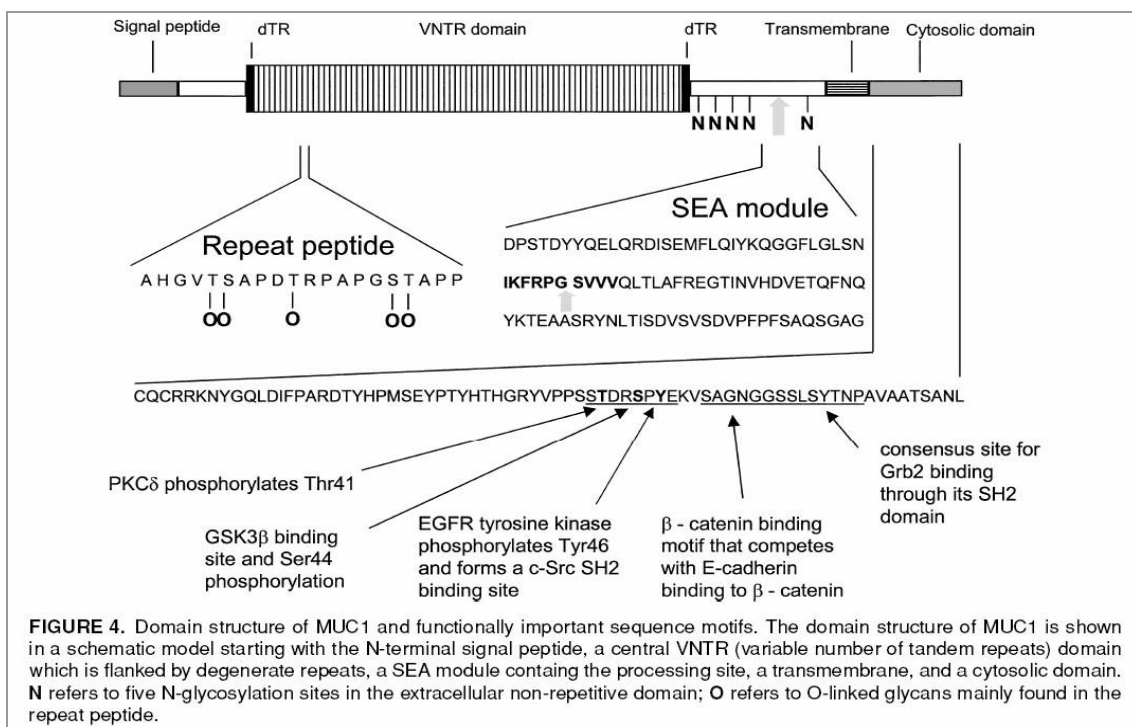
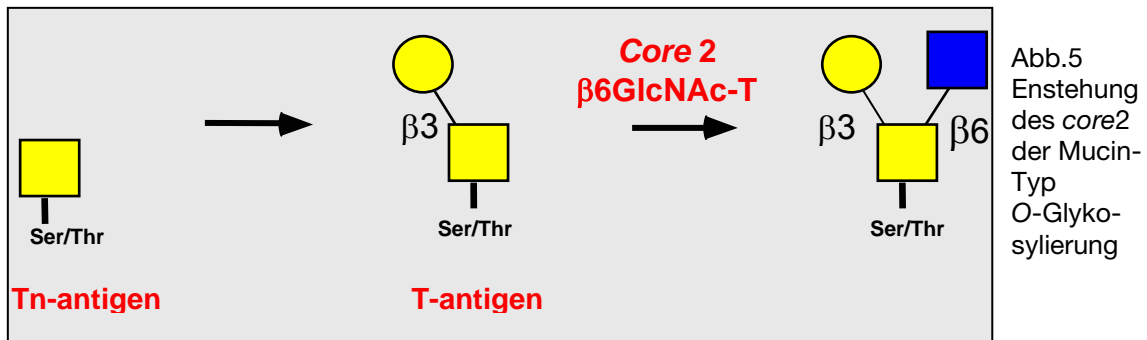


Abb.4 Domänenstruktur des transmembranären MUC1. Aus Baldus, Engelmann & Hanisch 2004.

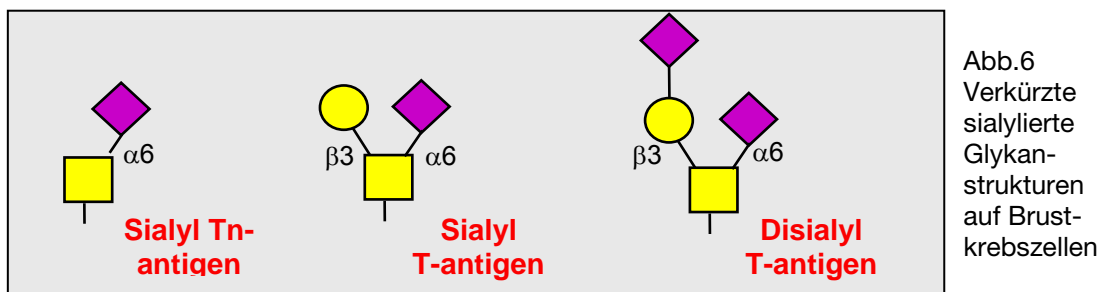
In normalen Zellen der Brust tritt vorzugsweise (Brockhausen 2006) die *core2*-Struktur der Mucin-Typ O-Glykosylierung (Abb. 6) auf, die aus dem sogenannten Tn-Antigen über die *core-1*-Struktur durch die Aktivität einer der drei Isoformen der *core2*-GlcNAc-Transferasen entsteht. Die Benennung „T-“ bzw. „TF“-Antigen ist eine Abkürzung von Thomson-Friedenreich-Antigen, Tn-Antigen bedeutet T-*negative* Antigen.

Dieser *core* wird in Brustepithelzellen mit weiteren Monosacchariden vergrößert, so daß schließlich eine Glykanstruktur entsteht, wie sie in Abb. 5

schon schematisch dargestellt wurde. Sialinsäuren und Fucose bilden die terminalen Kohlenhydrate.



Diese Polylactosamin-Glykane werden auf Brustkrebszellen stark verkürzt exprimiert, zudem läßt sich eine stärkere Sialylierung, z.B. in der Form des Disialyl-T-Antigens erkennen (Abb. 8). In den in dieser Abbildung gezeigten Glykanen haben Sialinsäuren einen Anteil von 30 bis 50 % gegenüber 10 bis 20% in den Glykanen von nichtmalignen Zellen. Gleichzeitig findet sich eine MUC1-Expression nicht mehr nur auf der apikalen, sondern auf der gesamten Zelloberfläche, da die maligne Zelle ihre Polarität verloren hat. Ausgehend vom Tn- oder T-Antigen werden die entstehenden Glykane als Sialyl-Tn-, Sialyl-T- bzw. Disialyl-T-Antigen bezeichnet.



Die in der letzten Abbildung gezeigten Glykanstrukturen sind allerdings nicht repräsentativ für sämtliche O-Glykane der verschiedenen Brustkrebszelllinien. Abbildung 9 zeigt HPLC-Chromatogramme sezernierter MUC1-Glykosylierungs sonden, die rekombinant in verschiedenen Zelllinien exprimiert wurden; man sieht deutlich, daß nur die Zelllinien T-47D und ZR-75-1 einen hohen Anteil sialylierter Glykane enthalten. Die Linien MDA-MB-231 und stärker noch MCF-7 enthalten weniger bzw. fast keine sialylierten Glykane. In der Krebszelllinie MCF-7 wurden demgegenüber komplexere, jedoch nicht stärker sialylierte Glykane gefunden (Hanisch und Müller 2000).

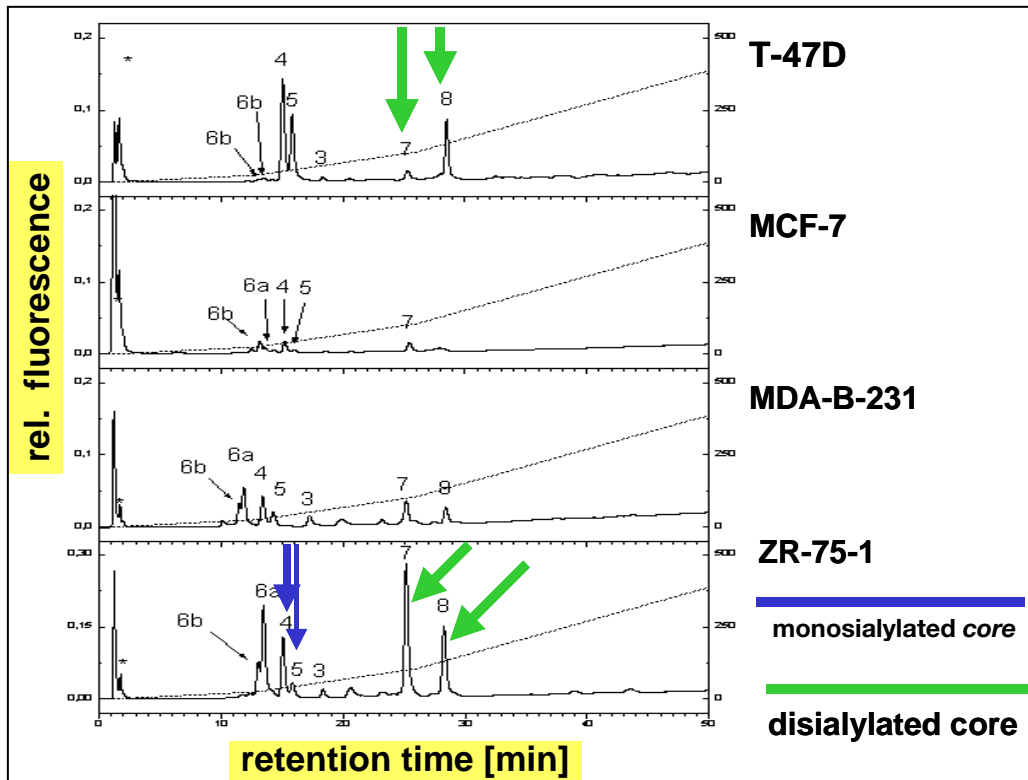


Abb. 7 HPLC-Profile der Glykane verschiedener Brustkrebszelllinien.  
Aus Müller und Hanisch 2002, verändert

Im Zusammenhang mit krebsspezifischen Veränderungen der Glykosylierung steht die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Neu5Gc, die Neu5Ac in einem Teil der Glykanstrukturen ersetzen könnte. Hierdurch könnten möglicherweise entsprechende mit Neu5Gc-sialylierte T- bzw. Tn-Antigen-Strukturen entstehen.

Eine weitere gut untersuchte Tumor-korrelierte Veränderung der Sialylierung findet sich in Darmkrebszellen. Während Mucine der Epithelzellen des Darms Disialyl-Lewis<sup>x</sup> exprimieren, zeigen Krebszellen des Darmepithels Monosialyl-Lewis<sup>x</sup> (Miyazaki *et al.* 2004; Abb. 8). In diesem Fall läßt sich deutlich ein Vorteil für die Proliferation der Tumorzellen erkennen, der durch das unterschiedliche Bindungsverhalten der sialylierten Glykane entsteht: Normale Epithelzellen interagieren über plasmamembranständiges Disialyl-Lewis<sup>x</sup> als Ligand mit Siglec-7, einem Sialinsäure-Rezeptorprotein auf Lymphocyten, wodurch deren cytotoxische Aktivität inhibiert wird. Der Monosialyl-Lewis<sup>x</sup>-Ligand auf Tumorzellen kann nicht an Siglec-7 binden. Dieser Verlust der Bindungsfähigkeit reicht jedoch nicht aus, um eine gegen die Tumorzellen gerichtete cytotoxische Aktivität der Lymphocyten auszulösen. Die monosialylierte Struktur kann jedoch als Ligand für das E-Selectin von



Endothelzellen fungieren, wodurch die Angiogenese im wachsenden Tumor gefördert wird. Eine chemische Modifikation der Sialinsäurereste in Darmkrebszellen wird im nächsten Abschnitt erörtert.

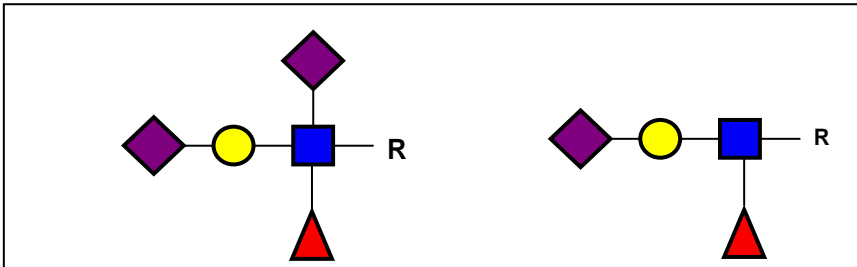


Abb.8 Die Glykanstrukturen Disialyl-Lewis<sup>x</sup> (links) und Monosialyl-Lewis<sup>x</sup> (rechts)

### 1.3. N-Glycolylneuraminsäure in Karzinomzellen

#### 1.3.1 Immunologische und infektionsbiologische Vorbemerkungen

Neu5Gc (Abb. 9) ist zusammen mit N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) die am weitesten verbreitete Sialinsäure in Zellen von Wirbeltieren. Sie wurde erstmals von Blix (1955) beschrieben.

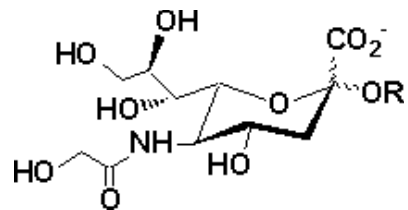


Abb. 9 Struktur von Neu5Gc. R repräsentiert den glykosidischen Bindungspartner.  
Von der Webseite <http://www.bme.jhu.edu/~kjyarema/analogs1.htm>

in der Spezies des Menschen und der Klasse der Vögel fehlt Neu5Gc, weil der letzte Schritt ihrer Biosynthese aufgrund einer nichtfunktionellen CMP-Neu5Ac-Hydroxylase (Abb.10) unmöglich ist. Aufgrund des Fehlens von Neu5Gc entwickelt der menschliche Körper Antikörper gegen Epitope, die Neu5Gc enthalten. Die immunologischen Eigenschaften von Neu5Gc-enthaltenden Epitopen wurden vor der Entdeckung der Sialinsäuren bekannt: 1924 publizierte der rumänische Pathologe Hanganutziu über menschliche Immunreaktionen (Serumkrankheit) nach Verabreichung eines Pferdeserums, 1926 folgte Deicher mit einer ähnlichen Studie über solche Impfreaktionen nach. Aufgrund dieser Arbeiten wurden die nach der Impfung mit Tierseren auftretenden Antikörper als Hanganutziu-Deicher-Antikörper bezeichnet. 1977/78 wurde dann klar, daß es sich bei den Epitopen um Neu5Gc-haltige Glykanstrukturen von Glykolipiden handelt (Higashi *et al.* 1977; Merrick *et al.*

1978). Mittlerweile wird die Stärke der Antigenität von Neu5Gc-Epitopen vor allem bei der Transplantation tierischer Organe, die auf ihren Zelloberflächen Neu5Gc-haltige Glykane exprimieren, jedoch wieder angezweifelt (Miwa *et al.* 2004).

Varki und andere (Varki 2006; Varki 2001) vertreten die Meinung, daß der Verlust der Fähigkeit der Neu5Gc-Synthese für den Menschen evolutionär vorteilhaft war, da bestimmte Pathogene Neu5Gc-haltige Glykane benötigen, um den Kontakt mit Zellen herzustellen. So sei (Varki 2001) das Fehlen von Neu5Gc einer der Faktoren, die das Halten von Nutztieren wie z.B. Kühen und Rindern begünstigt habe. Der in diesen Tieren häufig vorkommende E.coli-Stamm K12, der zu schweren Darmerkrankungen führen kann, benötigt Neu5Gc als Erkennungsmerkmal für einen Kontakt mit eukaryotischen Zellen.

### 1.3.2 Biosynthese der Sialinsäuren am Beispiel der Neu5Gc

Das charakteristische Gerüst aus 9 Kohlenstoffatomen wird bei allen Sialinsäuren durch die nucleophile Addition von Phosphoenolpyruvat an ManNAc oder ein anderes Mannosederivat gebildet, die durch die Neu5Ac-9-Phosphat-Synthase katalysiert wird (Abb. 10).

Die Acylierung am Stickstoffatom erfolgt vor der Addition. Im Fall der Neu5Ac und auch der in tierischen Zellen auftretenden Neu5Gc ist das GlcN-6-Phosphat Substrat einer Transferase, die eine aktivierte Acetylgruppe vom Acetyl-CoA auf das Hexosamin überträgt. Als Baustein für den weiteren Syntheseweg kann aber auch *N*-Acetylglucosamin aus dem Kohlenhydratstoffwechsel verwendet werden, das durch eine Kinase am 6. C-Atom phosphoryliert wird. Ausgehend vom GlcNAc-6-Phosphat erfolgt nun die eigentliche Sialinsäuresynthese (Abb. 10).

Eine Mutase wandelt das GlcNAc-6-Phosphat zunächst zum GlcNAc-1-Phosphat um. Dieses wird dann durch CTP unter Abspaltung von anorganischem Pyrophosphat zu CMP-GlcNAc umgesetzt.

Die nächsten beiden Stadien der Neu5Ac bzw. auch der tierischen Neu5Gc-Synthese werden durch ein bifunktionelles Enzym, die UDP-GlcNAc-Epimerase/ManAc-Kinase katalysiert. Mit einem *knock-out* dieses Enzyms wurde im Mausmodell gezeigt, daß die Synthese von Sialinsäure bzw. die folgende Sialylierung von Glykoproteinen essentiell für die

Embryonalentwicklung ist (Schwarzkopf *et al.* 2002). Die Menge des aus der Nahrung aufgenommenen ManNAc genügt also zumindest im Mausmodell nicht für eine ausreichende Neu5Ac-Synthese. Ergebnis der Reaktion des bifunktionellen Enzyms ist eine Epimerisierung des GlcNAc zu ManNAc und die Phosphorylierung des ManNAc zum *N*-Acetylmannosamin-6-Phosphat, dem Substrat der Additionsreaktion (Abb. 10), die am Anfang des Abschnittes schon erwähnt wurde.

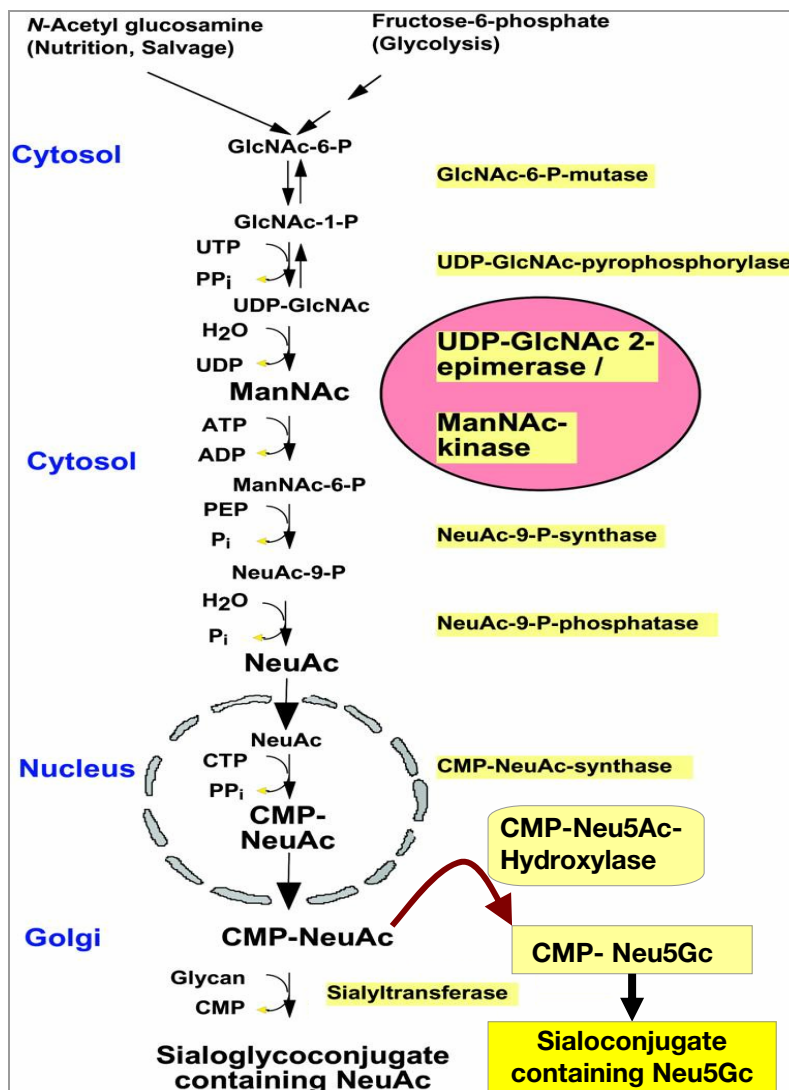


Abb. 10  
Syntheseweg der Neu5Ac  
und Neu5Gc.  
Nach Schwarzkopf *et al.*  
2002, verändert.

Humane Neu5Ac-9-Phosphat-Synthase kann neben dem *N*-Acetylmannosamin-6-Phosphat auch andere Mannosederivate verstoffwechseln (Lawrence *et al.* 2000). Deshalb können auch Mannosen mit verschiedensten nicht-biogenen Substituierungen (z.B. längerkettige Acylreste oder eine Azidogruppe) zur Sialinsäuresynthese *in vivo* eingesetzt werden, worauf schon im Abschnitt 1.1 hingewiesen wurde.

Eine Phosphatase spaltet die Phosphatgruppe von der gebildeten Sialinsäure ab, worauf ihr Transport in den Zellkern erfolgt. Hier kommt es zu einer „Aktivierung“ des Moleküls durch kovalente Bindung an CMP, dann zum Rücktransport in das Cytosol.

Ausgehend vom CMP-Neu5Ac wird dann in tierischen Zellen durch eine Oxidation des  $\alpha$ -C-Atoms des Acetylrestes, der hierdurch zu einer Glycolylgruppe umgewandelt wird, Neu5Gc gebildet. In Humanzellen ist dies nicht möglich, da das menschliche Homolog der in tierischen Zellen für die Oxidation erforderlichen CMP-Neu5Ac-Hydroxylase (CMAH) im 5'-Bereich eine 92 bp-Deletion hat, die zum Funktionsverlust des Genproduktes führt (Shaw und Schauer 1988, Bouhours und Bouhours 1989, Muchmore *et al.* 1989). Während die Neu5Ac-Synthese durch *feedback*-Inhibition der Acetyltransferase-Reaktion (Schritt 1 in Abb. 10) durch CMP-Neu5Ac gesteuert werden kann (Murrell *et al.* 2004), ist noch nicht klar, wie die Neu5Gc-Synthese – d.h. der letzte Schritt der Oxidation von CMP-Neu5Ac – reguliert wird.

### **1.3.3 Die Debatte über die Synthese von Neu5Gc durch humane Tumorzellen**

Der Verlust von Neu5Gc in menschlichen Zellen steht im Kontrast zum Wiederauftauchen in einigen Krebsformen (Schauer & Malykh 1999, Koda *et al.* 2003, Tzanakakis *et al.* 2005), vor allem im Brustkrebs (Kawai *et al.* 1992, Hanisch *et al.* 1992; 1996) in einem Anteil von 1-17 % (Hanisch *et al.* 1996) der gesamten Sialinsäuremenge von MUC1. Andererseits konnten diese Befunde durch eine Analyse von Darmkrebszellen nicht bestätigt werden (Tangvoranuntakul *et al.* 2003). Aufgrund dessen wurde vermutet, daß die früheren Daten experimentelle Artefakte darstellen. Diesbezüglich wurde vermutet (Bulai *et al.* 2003), daß es während der analytischen Prozedur durch Wasserentzug zur Bildung des 1,7-intramolekularen Lactons der Neu5Ac kommen könnte, das bei der gegenwärtig überwiegend zur Sialinsäureanalyse eingesetzten HPLC ähnliche chromatographische Eigenschaften wie Neu5Gc haben soll.

Das experimentelle Artefakt einer Neu5Gc-Detektion wäre auch durch die Verwendung tierischen Materials in der Zellkultur möglich; es ist vielfach nachgewiesen worden (z.B. Yin *et al.* 2006), daß Zellen Sialinsäuren aus dem extrazellulären Bereich gut aufnehmen können. Als Quelle kommt insbesondere

das bei der Zellkultur üblicherweise eingesetzte FCS in Betracht, das – wie auch in den Analysen der vorliegenden Arbeit gezeigt, siehe Abschnitt 3.1.1.3 – Neu5Gc-haltige Glykoproteine enthält. In den Studien, die Neu5Gc in Krebszellen entdeckten, wurde allerdings das FCS durch Zusätze ersetzt, die nicht tierischen Ursprungs sind, wie etwa Humanserum, das auch in der vorliegenden Arbeit sowie in der Studie von Tangvoranuntakul und Kollegen (Tangvoranuntakul *et al.* 2003) *et al.* verwendet wurde, oder synthetische Serumersatzstoffe (Hanisch *et al.* 1996).

Die These eines endogenen Ursprungs von Neu5Gc wurde weiter durch den Befund geschwächt, daß Neu5Gc in Körperflüssigkeiten sowie in Haaren gefunden werden kann, nachdem es extern aufgenommen wurde (Tangvoranuntakul *et al.* 2003). Die Autoren der genannten Studie vertraten deswegen die Auffassung, daß Neu5Gc in Krebszellen ausschließlich aus der Nahrung stammt, eine endogene Synthese also nicht stattfindet. Andererseits wurde für menschliche Erythrocyten gezeigt (Bulai *et al.* 2003), daß diese trotz eines Angebotes von Neu5Gc durch die Nahrung diese Sialinsäure *in vivo* nicht besitzen, auch wenn in diesen Zellen neben Neu5Ac eine Vielzahl verschiedener Sialinsäuren in Spuren nachgewiesen werden konnte. Der Nachweis von Neu5Gc in Krebszellen wurde vor diesem Hintergrund dem gesteigerten Metabolismus von Krebszellen allgemein zugeschrieben (Tangvoranuntakul *et al.* 2003).

In Lymphomzellen wurde im Anschluß daran tatsächlich ein Zelltransporter gefunden (Bardor *et al.* 2005), der in der Lage ist, Neu5Gc vom extrazellulären Bereich ins Cytoplasma der Zelle zu transportieren. Es wäre angesichts der immunologischen Eigenschaften von Neu5Gc allerdings erstaunlich, wenn der Transporter spezifisch für Neu5Gc wäre. Die These der exogenen Herkunft der Neu5Gc in Krebszellen erfuhr vor kurzem weitere Unterstützung durch den Nachweis, daß Krebszellen den Import von Sialinsäuren unter hypoxischen Bedingungen insgesamt durch gesteigerte Expression von Sialin erhöhen, das für den Import von Sialinsäuren verantwortlich ist (Yin *et al.* 2006).

Die soweit dargestellten Daten können zu dem Resümee Anlaß geben, daß Neu5Gc in Krebszellen ausschließlich externen Quellen entstammt (Martin *et al.* 2005). Andererseits würde eine endogene Neu5Gc-Synthese zu Befunden passen, nach denen das Sialinsäureprofil von Krebszellen von

demjenigen abweicht, das in normalen Zellen gefunden werden kann. Hierunter können quantitative Abweichungen verstanden werden, wie der erhöhte Anteil von Neu5Ac an MUC1-Glykanen in Tumorzellen. Daneben werden jedoch auch Sialinsäuren in Tumoren gefunden, die in normalen menschlichen Zellen nicht oder nur in solch geringen Mengen vorkommen, daß eine exogene Herkunft - z.B. durch die Nahrung - vermutet werden kann. Ein bekanntes Beispiel ist die KDN (s.o. S. 2), die in Lungenkrebszellen (Inoue *et al.* 1996) entdeckt wurde. Diese Sialinsäure entsteht durch die Addition von PEP an Mannose (zu diesen Befunden siehe auch Abschnitt 4.5 der Diskussion).

In Darmkrebszellen findet man im Unterschied zu den beschriebenen Befunden ein verringertes Ausmaß einer chemischen Modifikation der Neu5Ac-Struktur. Bei dieser Modifikation handelt es sich um eine Acetylierung der Neu5Ac an den Positionen 7 bis 9 des Kohlenstoffgerüsts, die in Epithelzellen des Darms etwa 50 % (monoacetyliert) bzw. 30 % (di- oder triacetyliert) des Sialinsäuregehaltes (Corfield *et al.* 1999) ausmacht. Grund hierfür ist ein verringertes Transkriptionsniveau der entsprechenden Acetyltransferase (Schauer & Corfield 1998). Vor diesem Hintergrund wäre ein möglicher endogener Biosyntheseweg durch differentielle Genexpressionsanalyse der an der NeuGc-Synthese beteiligten Enzyme in Brustkrebszellen und normalen Epithelzellen zu prüfen.

Aus den Bemerkungen über den Mechanismus der KDN-Synthese und über die Verwendbarkeit nichtphysiologisch *N*-substituierter Mannosamine lassen sich wiederum Arbeitshypothesen hinsichtlich der endogenen Synthese von Neu5Gc aufstellen, die weitere Ausgangspunkte für die experimentelle Arbeit bildeten.

#### **1.3.4 Die Herkunft der Glycolylgruppe**

Der Ursprung der Glycolylgruppe der Neu5Gc kann verschiedenen metabolischen Abweichungen zugeordnet werden, die in Krebszellen gefunden werden können (Zu & Guppy 2004). Ein erhöhter Gehalt an GABA (4-Aminobuttersäure) ist für Krebszellen gut dokumentiert (Opolski *et al.* 2000; Nicholson-Guthrie *et al.* 2001; Matuszek *et al.* 2001). In früheren Studien wurde vermutet (Vamecq & Draye 1990), daß GABA über 4-Hydroxybutyrat und nachfolgende  $\beta$ -Oxidation zu Glycolyl-CoA (Abb. 11) verstoffwechselt wird.

Vamecq und Draye zeigten in einem photometrisch untersuchten Enzymansatz in vitro ohne anschließende chemische Identifikation, daß Glycolyl-CoA von Rattenleberzellen zur Synthese von *N*-Glycolylglucosamin verwendet werden kann. Als wahrscheinlichen Mechanismus postulierten sie, daß die GlcN-6-Phosphat-Acetyltransferase, die in der Neu5Ac-Synthese die Acetylgruppe auf das Hexosamin überträgt, auch das Glycolyl-CoA als Substrat verwenden kann.

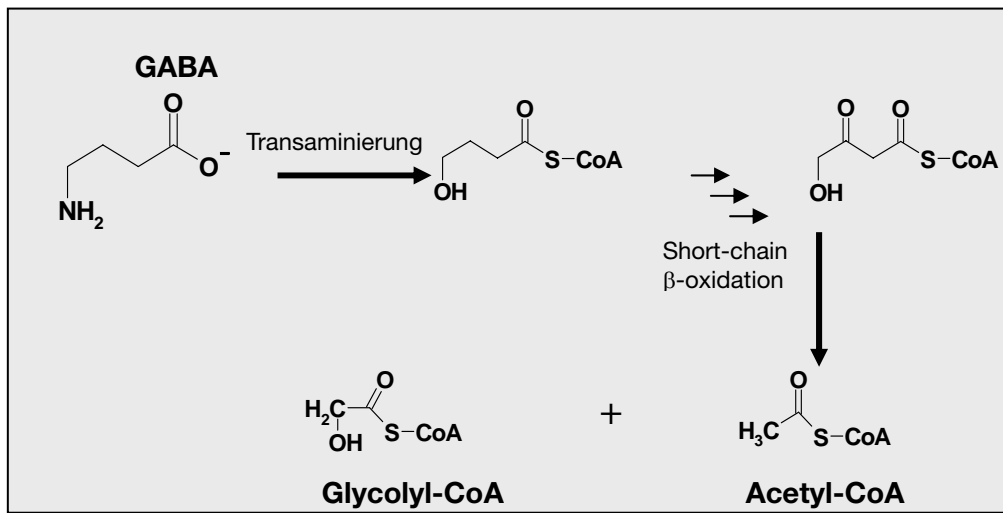


Abb.11 Katabolismus der GABA mit vermuteter Bildung von Glycolyl-CoA

Neben der Hypothese, daß GABA der Ursprung der Glycolylgruppe ist, wurde vermutet, daß (1) der Metabolismus von Glycolat selbst, (2) die  $\omega$ -Oxidation von  $\omega$ -Hydroxyfettsäuren und (3) der Katabolismus von Hydroxypyruvat durch die Pyruvat-Decarboxylase (Vamecq & Draye 1990; Malykh *et al.* 2001) zur Bildung von Glycolyl-CoA führen (Abb. 12).

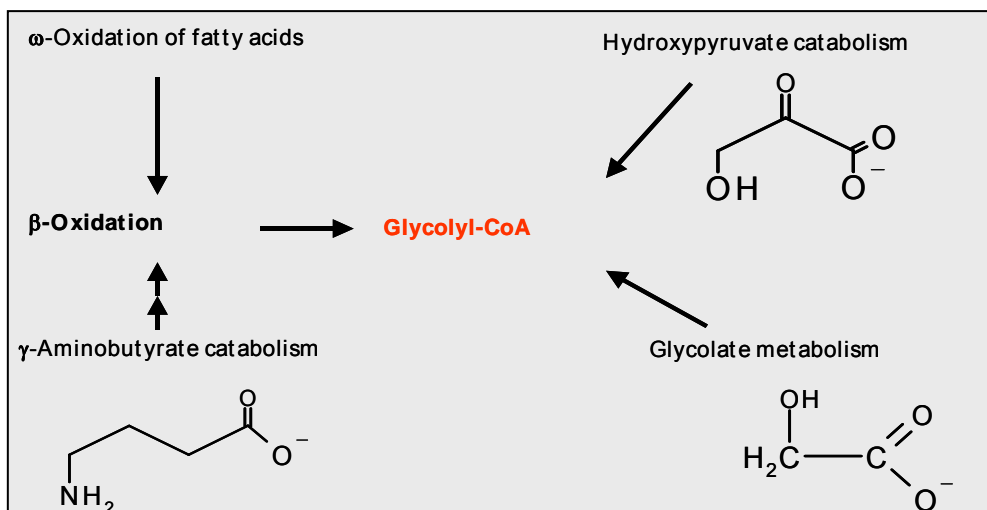


Abb. 12 Mögliche Biosynthesewege des Glycolyl-CoA

Im Fall von Glycolat und Hydroxypyruvat sind physiologische Funktion und Ursprung der Substanzen allerdings unklar. Die Substanzklasse der  $\omega$ -Hydroxyfettsäuren wurde im Unterschied dazu in den Kontext der metabolischen Abweichungen von Krebszellen eingeordnet (Vameq & Draye 1987).



#### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit verfolgte das Ziel, experimentelle Evidenz für eine mögliche endogene Synthese der NeuGc in menschlichen Brustkarzinomzellen zu liefern.

1. Die Existenz alternativer Synthesewege der NeuGc sollte zunächst durch den Nachweis gesichert werden, dass auch in NeuGc-freien Medien Karzinomzellen die Sialinsäurevariante exprimieren.
2. Da Glycolyl-CoA als Donorsubstrat bei der Acylierung von Sialinsäurevorläufern fungieren könnte, sollte geprüft werden, ob die Hexosamin-spezifischen Acyltransferasen das variante Cosubstrat tolerieren.
3. Mehrere katabolische Stoffwechselwege im Aminosäure- und Fettsäureabbau können zu einem erhöhten Glycolyl-CoA-Pool beitragen. Einzelne Vorläufermetabolite, wie die GABA, sollten daher in radiometabolischen Tracerexperimenten Einsatz finden, um ihren Beitrag zur NeuGc-Synthese zu bestätigen.
4. Tumorspezifische Stoffwechseländerungen könnten z.T. auf veränderte Expressionsraten einzelner in die paradoxe NeuGc-Synthese involvierter Enzymgene zurückgehen. Deshalb sollte in einer differentiellen Genexpressionsanalyse auf der Grundlage etablierter Brustkarzinomzelllinien und normaler Epithelzellen ein Expressionsprofil erstellt werden, um regulierte Enzymspecies zu identifizieren.
5. In einem weiteren (optionalen) Teilprojekt sollten die Trägerproteine der NeuGc auf menschlichen Brustkarzinomzellen identifiziert werden.
6. Da zwischenzeitlich bekannt wurde, dass NeuGc zu einem erheblichen Teil aus exogenen Quellen stammen kann, war ihre Evaluierung als urinärer Tumormarker nicht mehr relevant und wurde daher als Teilprojekt fallen lassen.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Verwendete Zelllinien

Für die Arbeit wurden verschiedene humane Mammakarzinom-Zelllinien verwendet, die – ebenso wie die Lungenkrebszelllinie STAV-AB – durch pleurale Effusion gewonnen wurden. Sämtliche Mammakarzinom-Zelllinien wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen.

Als Ursprungsgewebe der Zelllinien MDA-MB-231 (Cailleau et al. 1974) und MCF-7 (Soule et al. 1972; Brooks et al. 1973) werden metastasierende Adenokarzinome genannt. Die Linien T-47D (Horwitz et al. 1978; Westley & Rochefort 1980) und ZR-75-1 (Engel et al. 1978) sind ebenfalls glandulärer Herkunft, sie entstammen duktalem, infiltrierendem Karzinomen. Hinsichtlich ihrer zytologischen Eigenschaften läßt sich bei MDA-MB-231 eine myoepitheliale, bei den anderen Zelllinien eine epitheliale Morphologie (Neill et al. 2004) feststellen. Zellen der Linie MDA-MB-231 unterscheiden sich auch bezüglich ihrer molekularen Marker, da sie als einzige Östrogen-Rezeptor  $\alpha$ -negativ sind (Neill et al. 2004).

Humane Brust-Epithelzellen (HMECs; Stampfer 1999) wurden laut Distributor (Cambrex, Verviers, Belgien) aus Gewebe gewonnen, das der Mastektomie einer benignen Hypermastie entstammt.

Die Zelllinie STAV-AB wurde aus einem malignen epithelialen Mesotheliom der Lunge gewonnen, einer seltenen Krebserkrankung dieses Organs (Klominek et al. 1989). Besonderheit dieser Zellen ist es, daß sie bei Kultur mit FCS von einer epithelialen zu einer fibroblastenartigen Morphologie wechseln (Klominek et al. 1989).

### 2.1.2 Kulturbedingungen der Zellen

Alle Zelllinien wurden als *monolayer* bei 37°C in einem Inkubator (Heraeus) mit 5 % CO<sub>2</sub> in Zellkulturflaschen mit Filterverschluß (TPP, Trasadingen, Schweiz) kultiviert.

Sobald die Zellen 80 % Konfluenz erreicht hatten, wurden sie mit einer Lösung aus 0,05 % Trypsin (Biochrom, Berlin) und 0,02 % EDTA (Biochrom) abgelöst. Die Trypsinisierung wurde nach 5 bis 10 min mit dem verwendeten Komplettmedium gestoppt; die abgelösten Zellen wurden dann für 5 min bei 180xg zentrifugiert und neu in Kultur genommen. Die Verhältnisse der Neuaussaat der jeweiligen Zelllinien ebenso wie die Zusammensetzung ihrer Kulturmedien sind in Tabelle 1 aufgeführt. Alternativ wurde das Ablösen der Zellen mit dem Enzymgemisch *Accutase* (PAA, Cölbe) durchgeführt, einer Mischung bakterieller Kollagenasen, die laut Hersteller die Membranproteine weniger stark angreifen als das Trypsin. Da die Ausbeuten an Sialinsäuren jedoch bei beiden Verfahren identisch waren, wurde bei der Rekultivierung der Zellen meist mit Trypsin gearbeitet.

Tab.1. Zusammensetzung der für die Zelllinien verwendeten Zellkulturmedien

Zelllinie	Basalmedium	Anteil an Serum (%)	Verhältnis bei der Neuaussaat	Weitere Zusätze
MCF-7	DMEM	10	1:5	0.01 mg/ml Rindernsulin
MDA-MB-231	DMEM	10	1:6	-
STAV-AB	RPMI1640	6,5	1:4	-
T-47D	RPMI1640	10	1:10	0.2 Units/ml Rinderinsulin
ZR-75-1	RPMI1640	8,5	1:6	1.0 mM Natriumpyruvat

Alle Medien, PBS und FCS wurden von Biochrom (Berlin) bezogen. Zum Basalmedium (MEBM) der HMECs wurden folgende Zusätze (Tab.2) hinzugegeben. EGF, Hydrocortison, Insulin, BPE und Gentamicin/Amphotericin-B waren vom Hersteller zum MEBM separat beige packt und wurden zu Beginn der HMEC-Kultur in das Medium gemischt. Gemäß den Empfehlungen von Stampfer (<http://www.lbl.gov/~mrgs/other/procs.html>; Stampfer Cancer Cell Lines 1999 §) wurde das Zellkulturmedium noch mit Isoprotenerolbitartrat (Sigma) und humanem Apo-Transferrin (Sigma) ergänzt.

Tab.2. Zusätze zum Basalmedium der HMECs

Zusatz	Endkonzentration
EGF (100ug/ml)	5 ng/ml
Hydrocortison (1 mg/ml)	0.5 µg/ml
Insulin (1 mg/ml)	5 µg/ml
BPE (14 mg/ml)	70 µg/ml
Humanes Apo-Transferrin (10 mg/ml)	5 µg/ml
Gentamicin/Amphotericin-B	50 µg/mL
Isoproterenolbitartrat ( 5 µM )	0,01 µM

### 2.1.3 Kulturbedingungen bei Kultur der Zellen ohne FCS

Im Fall der Krebszelllinien wurden zwei verschiedene Methoden angewendet, um ein FCS-freies Wachstum der Zellen herbeizuführen.

#### 1) Kultur der Zellen mit *AIMV*

Bei dem AIMV-Medium (Gibco) handelt es sich um ein ursprünglich für die Lymphozytenkultur vorgesehenes Medium. Es konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch erfolgreich für die Kultur der Krebszelllinien adaptiert werden.

Das FCS-haltige Medium wurde in Schritten von 10, 30, 50, 65, 80 und 100 % durch AIMV ersetzt. Eine Umstellung erfolgte zum einen nach dem Ablösen und Neuaussäen der Zellen, zum anderen während der Kultur der Zellen.

#### 2) Kultur der Zellen mit *humanem Serum*

Die Benutzung von humanem Serum erfordert keine spezielle Umstellung der Zellen. War es erforderlich, humanes Serum einzusetzen, wurden die Zellen mit der gleichen Menge an Serum gezogen wie bei Einsatz von FCS.

### 2.1.4 Transfektion der Zellen mit sezerniertem MUC1 (MUC1-S)

Die Isolation von transmembranärem MUC1 gestaltet sich recht aufwendig (Hanisch et al. 1996). Untersuchungen zeigen (z.B. Engelmann 2005), daß die sezernierte Form des endogenen MUC1 eine ähnliche Glykanstruktur wie die eines rekombinanten MUC1-Fusionsproteins (MUC1-S) aufweist. Um in einem Anschlußprojekt an die Experimente zur Neu5Gc-Genese die Struktur der O-Glykane des MUC1 von T-47D-Zellen genauer untersuchen zu können, wurde

eine transfizierte T-47D Zelllinie etabliert, die die sezernierte Form des MUC1 (MUC1-S) in das Zellmedium abgibt.

Die DNA-Sequenz des zur Transfektion verwendeten Konstruktes lautet folgendermaßen:

```

5-AGCTTCTGCCTGCCGCTGCCTGCCTGCCACTGAGGGTTCCCAGCACCATGAGGGCCTGG
  ATCTTCTTTCTCCTTTGCCTGGCCGGGAGGGCTCTGGCAGCCCCGCTAGTTCATCATCAT
  CATCATCATGGTCCGCTAGTTGACGTCGCCAGCAATGAACAAAACTCATCTCAGAAGAG
  GATCTGGCTAGTATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCTGGGATATCGAAGGTCGTGGGCTA
  GCCCCGTACGCCCTGAAGGAGATGGCCCCGCCGGCCACGGCGTCACCTCCGCCCCGGAC
  ACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCGCCCCGAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGAG
  AGCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGAC
  ACCAGGCCCGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGAC
  ACCAGGCCCGCCCCGGGCTCCACCGCGCCCCGAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGAC
  ACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCAAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGAC
  ACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCTCCTCCTGCTCATGGTGTGATGAAGGAGGCCCTG
  CCGTACCCGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGGATCCAGACATGATAAGATACAT-3

```

Zur Transfektion der Zellen mit MUC1-S wurden T-47D-Zellen bis auf eine Konfluenz von 30 bis 50 % gezogen. Für eine 150 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche wurden 20 µg MUC1-S DNA mit 780 µl RPMI-1640 (ohne Serum und andere Zusätze) vermischt. Anschließend wurden 120 µl Superfect (Qiagen) hinzugegeben und die Mischung für 10min bei RT inkubiert. Danach wurden 5,2 mL des jeweiligen Vollmediums (mit FCS und Zusätzen) hinzugefügt.

Die Zellen wurden folgendermaßen vorbehandelt. Das Medium wurde entfernt und der Zell-*monolayer* anschließend zweimal mit RPMI-1640 (ohne Serum und andere Zusätze) gewaschen; Reste des Mediums nach dem letzten Waschen wurden abgesaugt. Nun wurden die Zellen für 3h mit dem vorbereiteten Transfektionsmedium im Brutschrank bei 37°C unter Zellkulturbedingungen inkubiert.

Nach drei Stunden wurde das Transfektionsmedium entfernt. Die Zellen wurden dann mit dem üblichen Vollmedium wie oben beschrieben gezogen. Nach 24 h wurde es mit einem Medium ersetzt, das 5 µg /mL Puromycin enthielt. Das Puromycin dient als Selektionsantibiotikum für erfolgreich transfizierte Zellen, die ein Puromycin-Resistenzgen tragen.

Von einer erfolgreichen Transfektion konnte nach 5-7 Tagen Wachstum ausgegangen werden.

## 2.2 Isolation und Analytik der Sialinsäuren

### 2.2.1 Theoretische Vorbemerkungen

Die Sialinsäureanalytik besteht aus den Schritten Extraktion, Reinigung und Analyse - d.h. chemische Identifikation sowie Quantifizierung - der Substanzklasse (Reuter & Schauer 1994). Vor der Extraktion der Sialinsäuren wird meist eine Isolierung der Membranfraktion aus dem Zell-Lysat durch differentielle Zentrifugation (de Duve 1975) durchgeführt. In diesem Schritt kann gleichzeitig der Salzgehalt der Probe durch wiederholte Waschungen mit destilliertem Wasser vermindert werden.

In einigen Fällen wurde auch eine Extraktion der Membranproteine (z.B., Tzanakakis et al. 2006) oder die Isolierung einzelner Proteinspezies wie z.B. des MUC1 (Hanisch et al. 1996) durchgeführt. Gegenwärtig arbeitet man meist mit einer isolierten Membranfraktion als Ausgangsmaterial für die Sialinsäureextraktion (z.B. Bardor et al. 2005).

#### 2.2.1.1 Methoden der Abspaltung von Sialinsäuren

Die Sialinsäuren als endständige Kohlenhydrate extrazellulärer Glykanstrukturen können (1) in einem enzymatischen Ansatz mit Sialidasen, z.B. der *Vibrio cholerae*-Sialidase, (2) mit methanolischer HCl und (3) durch säurekatalysierte Hydrolyse abgespalten werden (Reuter und Schauer 1994). Der Sialidaseansatz ist für die Analytik seltenerer Sialinsäuren allerdings nicht empfehlenswert, da die Sialidasen unterschiedliche Substratspezifität besitzen (Reuter & Schauer). Setzt man die Abspaltung von Neu5Ac als 100%, so wird z.B. Neu5Gc lediglich mit der Hälfte der Effektivität freigesetzt. Sialidase kam daher bei der Neu5Gc-Analytik nicht zum Einsatz.

Methanolische HCl und verdünnte Säure bewirken beide säurekatalysierte Spaltungen der glykosidischen Bindung. Im Fall der methanolischen HCl wird der mit dem terminalen Kohlenhydrat verbundene Zucker durch eine Methylgruppe ersetzt, die Acetalgruppe des terminalen Kohlenhydrates bleibt also als Vollacetal erhalten. Dieses wird beim Einsatz von verdünnter Säure zum Halbacetal des freien Zuckers umgesetzt, weil eine Hydroxygruppe aus dem Wasser an die Stelle des glykosidischen Bindungspartners tritt. Die Ausbeute des methylierten Kohlenhydrates beim Einsatz der methanolischen HCl wird besonders durch Feuchtigkeit stark vermindert (Chambers and Clamp 1971). Das Reagenz wurde

deswegen durch Einleiten getrockneten Chlorwasserstoffs in Methanol hergestellt, doch auch hier entstehen durch Reaktion mit dem Methanol geringe Mengen von Wasser und Methylchlorid. Bevorzugt wird heute deswegen ein Gemisch aus Methanol und Acetylchlorid, das zu Methylacetat und Chlorwasserstoff umgesetzt wird; das Methylacetat fungiert während der Methanolyse durch Esterspaltung als Wasserfänger.

Aufgrund ausreichender Ausbeuten und einfacherer Handhabbarkeit wird gegenwärtig meist verdünnte Säure zur Abspaltung der Sialinsäuren verwendet.

In der Literatur kamen folgende Säuren zum Einsatz:

- 1M Ameisensäure (Mawhinney & Chance 1984)
- 2M Essigsäure (Varki & Diaz 1984; Mawhinney & Chance 1984)
- 2M Propionsäure (Mawhinney & Chance 1984)
- 0,05 bzw. 0,1 M TFA (Bardor 2005)
- 0,1 M Schwefelsäure (Mawhinney & Chance 1984; Reuter und Schauer 1994)

Wie Varki und Mitarbeiter (Varki & Diaz 1984) herausfanden, können insbesondere acetylierte Sialinsäuren durch die Einwirkung starker Säuren deacetyliert werden. Andererseits ist insbesondere beim Einsatz von Essigsäure eine Verfälschung durch Acetylierung der Hydroxyfunktionen der Sialinsäuren möglich.

Reuter und Schauer (1994) empfehlen eine Zweischrtrittmethode, in der zuerst eine schwache Carbonsäure, dann eine stärkere verdünnte Mineralsäure zum Einsatz kommen, um die Ausbeute zu maximieren und Verluste durch Säureeinfluß zu minimieren; diese Methode hat sich jedoch in der Literatur aufgrund ihrer etwas umständlichen Handhabung nicht durchgesetzt.

### **2.2.1.2 Reinigung und Verfahren zur analytischen Identifikation von Sialinsäuren**

Nach der Hydrolyse der Sialinsäure ist eine Abtrennung des Hydrolysats vom verbleibenden Protein erforderlich sowie gegebenenfalls eine Entsalzung durch Gelfiltration, wenn eine HPLC durchgeführt werden soll. Die Abtrennung von makromolekularen Bestandteilen erfolgt meist durch Ultrazentrifugation mit geeigneten Filtern.

### 2.2.1.2.1 Fluoreszenzdetektion durch HPLC

Analyse und Quantifizierung der Sialinsäurefraktion wird heute meistens mit HPLC durchgeführt. Hierzu müssen die Sialinsäuren mit einem passenden Chromophoren wie dem 2-Aminobenzamid (Abb. 13) derivatisiert (Bigge et al. 1995) werden, was anschließend eine empfindliche Fluoreszenzdetektion ermöglicht (vgl. Lamari und Karamanos 2002). In einigen Fällen wird zur chemischen Identifikation des Analyten eine massenspektrometrische Analyse der eluierten Sialinsäurefraktion vorgenommen.

Die Derivatisierung des Sialinsäuremoleküls durch Aminobenzamid verläuft nach dem Reaktionsmechanismus (Abb. 13) der reduktiven Aminierung.

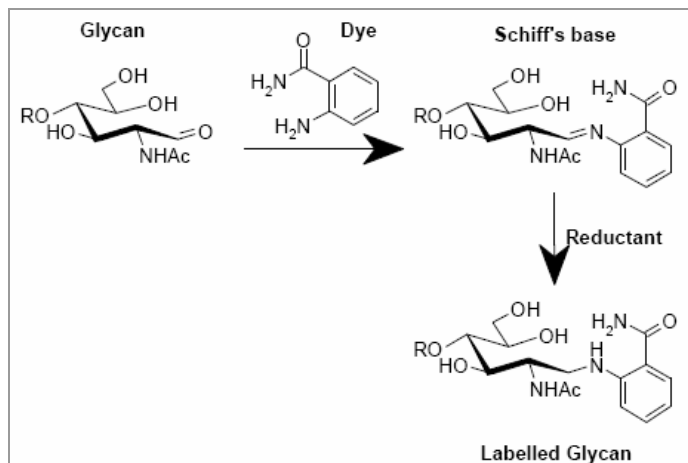


Abb. 13.  
Reaktionsmechanismus der  
reduktiven Aminierung von  
Glykanen.  
Aus  
[http://search.cosmobio.co.jp/cosmo\\_search\\_p/search\\_gate2/docs/LUD\\_LTKABA2.20040813.pdf](http://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/LUD_LTKABA2.20040813.pdf)

### 2.2.1.2.2 Vorteile der GC/MS-Analytik

In der vorliegenden Arbeit wurde in der weit überwiegenden Zahl der Fälle die GC/MS-Analytik der HPLC-Analytik vorgezogen, wobei technische Möglichkeiten bestanden, beide Verfahren anzuwenden. GC/MS ist die Analysemethode der Wahl für kleinere Moleküle (weniger als 2000 Da, im Kontext der vorliegenden Arbeit weniger als 800 Da). Die GC/MS-Analytik bietet in einem einzigen Analysegang hohe Empfindlichkeit bei gleichzeitig möglicher Identifikation durch die unabhängigen Parameter Retentionszeit und massenspektrometrisches Fragmentierungsmuster an.

Eine Quantifizierung kann in der GC/MS-Analytik – wie bei anderen analytischen Verfahren auch – mit einem externen oder internen Standard durchgeführt werden, der der gesuchten Substanz bzw. der Substanzklasse chemisch ähnlich sein sollte. Sofern keine absolute Quantifizierung der Sialinsäuren erforderlich ist, kann die vorhandene zellinterne Neu5Ac als interner Standard verwendet



werden. Vor allem in menschlichen Zellen macht diese mindestens 80, oft 90% der gesamten Sialinsäure aus und bietet so eine zuverlässige Quantifizierungsreferenz. Die übrigen Sialinsäuren werden dann als Anteile des Neu5Ac-Signals ausgedrückt.

### **2.2.1.2.3 Methoden der Derivatisierung für GC/MS**

Um eine Interaktion stark elektronegativer Atome wie der Sauerstoffatome von Hydroxygruppen mit dem Säulenmaterial des Gaschromatographen zu verhindern, müssen die Wasserstoffatome solcher Gruppen vor der Injektion der Probe in den GC/MS-Apparat mit chemisch inerten Gruppen substituiert werden. Die GC/MS-Analytik von Sialinsäuren erfordert es deswegen, ein Derivatisierungsreagenz für deren Hydroxy- und Carboxyfunktionen zu finden, das nicht mit der Aminogruppe reagiert. Hierzu eignen sich Alkyl-, Acyl- und Silylgruppen; letztere dominieren die Literatur über gaschromatographische Derivatisierung und wurden auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Daneben wurde auch ein neueres Verfahren evaluiert, das eine Methylierung der Carboxyfunktion mit anschließender Acylierung der Hydroxyfunktionen vorsieht (Zanetta et al. 2001; Bulai et al. 2003).

#### **(1) Derivatisierung von Sialinsäuren durch Methylierung und Acylierung**

Bulai und Kollegen (Bulai et al. 1999; 2003) führten eine Methylierung der Sialinsäuren mit Diazomethan an der Säurefunktion und anschließender Veresterung der OH-Gruppen mit perfluorierten Carbonsäureanhydriden wie dem Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA) durch. Hauptvorteil könnte eine effizientere und stabilere Derivatisierung sein, wodurch ein teilweiser Zerfall der Derivate im GC-Injektor verhindert wird. Den Autoren zufolge handelt es sich hierbei um ein Problem, das bei der Trimethylsilylierung auftritt.

Diese Methode konnte in der angegebenen Weise unter den gegebenen technischen Umständen nicht erprobt werden, da ein Arbeiten mit Diazomethan aufgrund seiner Toxizität und Explosionsgefährlichkeit nicht möglich war. Stattdessen wurde zur Methylierung das gasförmige Diazomethan, das aus Vorläufersubstanzen in geschlossenen Apparaturen hergestellt werden muß, durch Trimethylsilyldiazomethan (TMSDM) ersetzt (Kudoh et al. 1994; Rimmer et al. 1996). Dieses überträgt eine Methangruppe auf das analysierte Molekül und zerfällt selbst zu einer inerten Trimethylsilylverbindung und  $N_2$ .



Abb. 14. Mechanismus der Alkylierung durch Trimethylsilyldiazomethan (TMSDM)  
 Aus [http://userpage.chemie.fu-berlin.de/~tlehmann/krebs/files\\_diazoalkanes.pdf](http://userpage.chemie.fu-berlin.de/~tlehmann/krebs/files_diazoalkanes.pdf)

Im Anschluß an die Methylierung wurde dann die Veresterung der Hydroxyfunktionen mit den perfluorierten Carbonsäureanhydriden Pentafluorpropionsäureanhydrid (PFPA) und HFBA durchgeföhrt.

## (2) Derivatisierung von Sialinsäuren mit Trimethylsilylgruppen

Ein sehr verbreitetes Verfahren zur Derivatisierung der Hydroxy- und Carboxyfunktionen von Sialinsäuren ist die Substituierung des Wasserstoffatoms dieser Gruppen mit einer Trimethylsilylgruppe (Kamerling et al. 1974; Casals-Stenzel et al. 1975; Kamerling & Vliegthart 1989; Abb. 15).

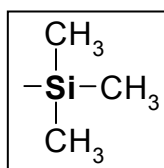


Abb.15.  
 Die Trimethylsilylgruppe (TMS)

Die Reaktion von Phenol mit MSTFA (Donike 1969) ist in Abbildung 16 exemplarisch für die Derivatisierung mit Silylierungsreagenzien dargestellt; bei dem Reaktionsmechanismus handelt es sich um eine bimolekulare nucleophile Substitution (Knapp 1978), Resultat ist die Trimethylsilylierung des Moleküls.

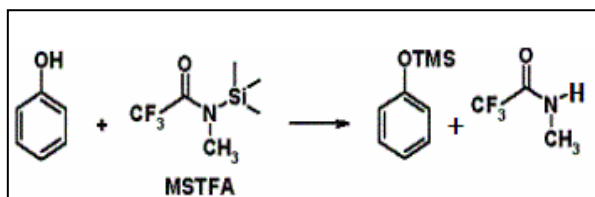


Abb. 16. Mechanismus der Trimethylsilylierung am Beispiel von MSTFA.  
 Nach Knapp 1978.

Bei der Derivatisierung sind im Fall der Sialinsäure folgende Punkte zu beachten:

- 1) Eine Öffnung des Hexoseringes im Zuge der Derivatisierung ermöglicht eine Drehung der Carboxy- und Hydroxyfunktionen am zweiten C-Atom. Durch diese Anomerie können nach der Derivatisierung und Injektion in den GC/MS-Apparat zwei chromatographische Signale entstehen.

- 2) Die unterschiedliche Substituierbarkeit des Carboxy- und des Hydroxy-Wasserstoffatoms kann die Verwendung von zwei verschiedenen Derivatisierungs-

reagenzien erforderlich machen. Eine zweiseitige Derivatisierung kann andererseits zu Analytverlusten führen.

3) Eine vollständige Derivatisierung des Sialinsäuremoleküls am Stickstoffatom des fünften Kohlenstoffatoms ist schwierig, aufgrund der chemischen Inertheit des Stickstoffs gegenüber dem Säulenmaterial allerdings auch nicht erforderlich. Bestimmte Reagenzien wie z.B. MSTFA haben jedoch die Eigenschaft, solche chemischen Funktionen teilweise zu derivatisieren. Hierdurch können aufgrund der Anomerie am 2. Kohlenstoffatom bis zu 4 Signale von einem Analytenmolekül verursacht werden. Vor allem bei Analysen mit mehreren Substanzen wird die analytische Prozedur durch diese Vervielfachung des Signals stark erschwert; zudem kann die Menge eines bestimmten Analyten durch Verteilung auf vier Signale unter die Nachweisgrenze rutschen.

Aufgrund dieser chemischen Randbedingungen der Derivatisierung und Silylierung ergab sich für die Neu5Gc-Analytik TMS-Imidazol als das Derivatisierungsmittel der Wahl (Abb. 17).

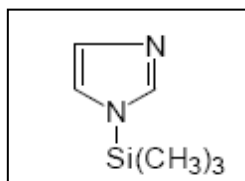


Abb. 17.  
Chemische Struktur des TMSI.

TMSI silyliert Hydroxy- und Carboxyfunktionen gleichermaßen gut und läßt Aminofunktionen unangetastet. Von Vorteil ist auch, daß geringe Mengen von Feuchtigkeit die Derivatisierung nicht beeinträchtigen. Das nach der Derivatisierungsreaktion entstehende Imidazol schließlich nimmt auf die Analyse keinen negativen Einfluß.

## 2.2.2 Praktische Durchführung der Sialinsäureanalytik

### 2.2.2.1 Vorbereitung des Zellmaterials

Etwa  $3 \times 10^7$  Tumor- oder Epithelzellen wurden für einen Analysegang verwendet. Die Zellen wurden nach dem Ernten zunächst für 10 min bei 500xg zentrifugiert, um den größten Teil des Mediums abzutrennen. Anschließend wurden sie nach Resuspension in 40 mL 0,9 % iger NaCl-Lösung unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert, um Reste des Zellkulturmediums zu entfernen.

Der Rückstand der Zentrifugation wurde in 26 mL ddH<sub>2</sub>O in einem Ultrazentrifugationsröhrchen (Beckman Coulter, Krefeld) resuspendiert und 1 min

auf dem Vortex (Binder, Tuttlingen) geschüttelt. Das hypotone Milieu des Wassers führte eine Lyse der Zellen herbei, was durch Anfärbung des Zellmaterials mit Trypanblau (Serva) und Inspektion des Zellmaterials unter dem Binokularmikroskop (Axiovert 25; Braun) nachgewiesen wurde.

Danach wurde die Probe für 20 min bei 100.000xg (Beckman Optima L-70K Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Der Rückstand der Zentrifugation wurde für die Hydrolyse der Sialinsäuren verwendet.

#### **2.2.2.2 Analyse der Medien und Serumzusätze auf Neu5Gc**

Um die Abwesenheit von Neu5Gc in den verwendeten Medien und Serumzusätzen sicherzustellen, wurden die Proteine aus den Flüssigkeiten ausgefällt und der Sialinsäureanalytik zugeführt.

10 mL AIMV oder 1,5 mL Humanserum bzw. FCS wurden mit einer 100 % igen (w/v) Trichloressigsäure (Fluka) im Verhältnis 1:1 (v/v) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die gefällten Proteine wurden dann bei 16.100xg abzentrifugiert und der Hydrolyse mit 0,1 M TFA (s. 2.2.2.2.2) unterworfen.

#### **2.2.2.3 Hydrolyse der Sialinsäuren**

Die Hydrolysen wurden stets in dickwandigen Spitzgläsern (Pierce) mit 1,5 mL Volumen, verschlossen durch einen Schraubverschluß mit Tefloneinsatz (Macherey & Nagel, Düren), durchgeführt. Für die Hydrolyse von  $3 \times 10^7$  Zellen wurden 1 mL des jeweiligen Reagenz eingesetzt.

##### **2.2.2.3.1 Methanolische HCl**

Bei dieser Methode wurde mit methanolischer HCl gearbeitet, die für jeden Ansatz frisch hergestellt und anschließend für maximal 1 Woche weiterverwendet wurde. Die Anwendung methanolischer HCl führt zu einer säurekatalysierten Spaltung der glykosidischen Bindungen und Methylierung der freien Zucker.

1 M methanolische HCl wurde durch Mischen von 0,71 mL Acetylchlorid (Fluka) mit 10 mL wasserfreiem Methanol (Riedel-deHaen) auf Eis hergestellt.

### 2.2.2.3.2 Verdünnte organische Säuren

Folgende Carbonsäuren in verschiedenen Konzentrationen wurden für die Hydrolyse der Sialinsäuren verwendet (Tab.3).

Tab. 3. Bei der Hydrolyse der Sialinsäuren eingesetzte Carbonsäuren

Säure	Konzentration [M]	Hydrolysedauer [h]
Ameisensäure (Aldrich)	1	1
Essigsäure (Aldrich)	2	2
TFA	1	1
TFA	0,5	1, 1,5, 2
TFA	0,1	1, 1,5, 2
TFA	0,05	1
Propionsäure (Aldrich)	2	1

### 2.2.2.4 Aufreinigung des Hydrolysats

Das Hydrolysat wurde auf zwei Weisen von Zellmaterial oder Proteinen befreit.

- (1) Nachdem das Hydrolysat in ein Eppendorfgefäß überführt worden war, wurde es bei 16.000xg für 20 min zentrifugiert. Die Zentrifugation wurde einmal wiederholt.
- (2) Die unter (1) erwähnte Zentrifugation wurde einmal durchgeführt. Anschließend wurde der Überstand in ein Amicon Ultra-4-Zentrifugationsröhrchen gegeben (*cut off* 5000 da; Millipore) gegeben und für 20 min bei 1500xg zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand zum Trocknen wiederum in ein 1,5 mL-Spitzglas überführt und das Wasser bei 40°C durch einen Stickstoffstrom entfernt.

### 2.2.2.5 GC/MS-Analytik

#### 2.2.2.5.1 Derivatisierung

##### (1) Einführung der TMS-Gruppe mit MSTFA bzw. TMSI

Die getrocknete Probe wurde mit 100 µL MSTFA (Macherey & Nagel) versetzt, mit Argon überschichtet und für 30min bei 60°C inkubiert. Dann wurde 1µl in den GC/MS-Apparat injiziert.

Bei Verwendung von TMSI (Macherey & Nagel) wurde ebenfalls ein Volumen von 100 µL eingesetzt. Die Probe wurde hier 30 min bei 65°C inkubiert. Auch bei dieser Variante wurde 1 µL in den GC/MS-Apparat injiziert.

Gegebenenfalls auftretende Trübungen des Silylierungsansatzes wurden vor der Entnahme des Injektionsvolumens für die GC/MS für 5 min bei 16100xg abzentrifugiert.

## **(2) Methylierung mit anschließender Acylierung**

Die getrocknete Probe wurde mit 30 µL TMSDM (Aldrich), 100 µL Methanol (Riedel-deHaen) und 70 µL Hexan (Aldrich) versetzt und anschließend bei 50°C für 15 min inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde dann unter einem Stickstoffstrom eingedampft.

Der Rückstand wurde in 25 µL Acetonitril (Aldrich) aufgenommen und mit 200 µL HFBA (Fluka) oder PFPAA (Fluka) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit Argon überschichtet, das Glas wurde dann fest verschlossen und für 5 min auf 150°C erhitzt.

### **2.2.2.5.2 GC/MS-Bedingungen**

Das GC-MS System bestand aus einem Fisons GC 8060 Gaschromatographen und einem MD 800 Massenspektrometer (Fisons/Thermo Electron GmbH, Dreieich). Das System wurde mit der Masslab-Software (Version 1.2.7, Fisons/Thermo Electron) betrieben. Als Ionisierungsmethode wurde der Electron-Impact-Modus (EI) bei 70 eV verwendet. Das GC-MS-System wurde gemäß der Betriebsanleitung mit Perfluoro-N-butylamin (Fluorochem Ltd., Derbys, UK) als Referenzgas justiert. Die Quelltemperatur wurde auf 200°C, die Interface-Temperatur auf 250°C und die Spannung des Detektors auf 400 V eingestellt. Die Stärke des Emissionsstroms war 340 µA.

Die massenspektrometrische Analyse wurde im Bereich von 100 bis 700 amu bei einer Rate von 2 scans/s durchgeführt, die Lösungsmittelverzögerung betrug 3 min. Die Gaschromatographie wurde mit einer 15 m x 0,25 mm x 0,25 µm RTX-5Sil MS-Kapillarsäule (Restek GmbH, Bad Homburg) durchgeführt. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1,7 mL/min eingesetzt.

Das Temperaturprogramm war folgendermaßen aufgebaut: Nachdem für 1 min eine Temperatur von 160°C gehalten wurde, wurde die Temperatur mit einer Rate von 10°C/min auf 320°C, und dann mit einer Rate von 3°C/min bis auf 325°C

gesteigert. Diese Temperatur wurde für 10 min konstant gehalten, und anschließend bei einer Rate von 15°C/min auf 160°C abgekühlt.

#### **2.2.2.6 HPLC-Analytik**

Zur Probe, die maximal 100 µMol Glykane enthalten sollte und salzfrei war, wurden 5 µL einer Lösung gegeben, die 0,35 M 2-Aminobenzamid (ICN) und 1 M Natriumcyanoborhydrid (Aldrich) in 70 % Dimethylsulfoxid (Aldrich) und 30 % Essigsäure enthielt. Für das Fluoreszenzreagens wurden zunächst 136 mg 2-Aminobenzamid in 1 mL Essigsäure und 125 mg Natriumcyanoborhydrid in Dimethylsulfoxid auf-gelöst. Dann wurde die 2-Aminobenzamid-Lösung mit der Natriumcyanoborhydrid- Lösung im Verhältnis 2:3 gemischt.

Nachdem die Glykane mit dem Fluoreszenzreagenz versetzt worden waren, wurde der Ansatz für 2h bei 60-65°C inkubiert.

Für die Normalphasen-HPLC wurden als Laufmittel A 50 mM Ammoniumformiat-Lösung (aus Ammoniumhydroxid (Fluka) und Ameisensäure hergestellt) eingesetzt (pH 4,4), als Laufmittel B Acetonitril (Aldrich). Der Gradient verlief während einer Zeitdauer von 80 min von 80 % auf 40 % des Laufmittels A .

Die Fluoreszenz-Detektion erfolgte bei 330 nm (Anregung)/420 nm (Emission).

#### **2.2.2.7 DC-Analytik**

Bei der Dünnschichtchromatographie wurden mehrere Verfahren erprobt, deren Parameter in Tabelle 4 beschrieben werden. Alle DCs wurden in geschlossenen Glaskammern mit den Formaten 20x 20x 8,5 cm durchgeführt, die mit 120 mL des Laufmittels gefüllt wurden. Die Äquilibrierungszeit zur Sättigung des Kammerraums mit Laufmitteldämpfen betrug 2 h. Als Festphase wurde stets Silicagel 60 auf einem Aluminiumträger (Merck) im Format 20x20 cm eingesetzt; das in der Literatur empfohlene (Reuter und Schauer 1994) Cellulosematerial kam wegen der Gefahr der Zersetzung durch das Aufsprühen des säurehaltigen Orcinolreagens mit anschließender Erhitzung nicht zum Einsatz. Die Startzone der Chromatographie lag in 2 cm Höhe der DC-Platte.

Tab. 4. Bedingungen der verschiedenen Verfahren zur Sialinsäure-DC

	Gemischte Substanzen	Mischungsverhältnis v/v	Dauer [h:min]	Literatur
A	1-Propanol/1-Butanol/0,1M HCl	2:1:1	1:40	Reuter & Schauer (1994)
B	1-Propanol/NH <sub>4</sub> OH/H <sub>2</sub> O	6:1:2,5	4:35	Kitajima et al. (1998)
C	1-Butanol/Pyridin/H <sub>2</sub> O	5:3:2	8:10	Warren et al. (1958)
D	Methanol/Trichlormethan/ 20mM CaCl <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O	5:4:1	3:20	Tiralongo et al. (2000)

Die DC-Platten wurden nach dem Lauf kurz getrocknet und dann mit dem Orcinol-Reagenz (s.u.) besprüht. Das Orcinol-Reagenz bestand aus 81,4 mL HCl 37 % (Fluka), 0,2 g Orcinol (Merck), 2 mL 1 % iger FeCl<sub>3</sub>-Lösung (Merck) auf 100 mL Wasser. Drei Teile des Reagenz wurden vor Gebrauch mit einem Teil Wasser verdünnt.

Nach dem Aufsprühen wurden die DC-Platten auf eine Heizplatte gelegt, die auf 110°C aufgeheizt wurde. Nach kurzem Trocknen der Chromatographieplatten wurden diese mit einer hitzebeständigen Glasplatte bedeckt und 15 min lang bei 110°C inkubiert. Die Resultate der DC wurden nach dem Abkühlen der Platten mit einem Scanner als digitales Bild erfaßt.

### 2.2.2.8 Autoradiographie

Für eine autoradiographische Detektion <sup>14</sup>C-markierter Neu5Gc (s.u.) wurde eine DC-Platte in drei Bereiche unterteilt. In zwei von den drei Bereichen wurde Neu5Ac bzw. Neu5Gc als Standardsubstanz am Start der Dünnschichtchromatographie aufgetragen, im letzten Drittel die Probe, das Hydrolysat der Zellmembranfraktion. Nach dem Ende der DC wurde der Bereich mit den Sialinsäurestandards vom Probenbereich getrennt und wie unter 2.5.3 beschrieben behandelt.

Der Bereich, in dem die Probe chromatographiert wurde, wurde mit Klebeband auf einem Röntgenfilm (Fuji) befestigt und in eine lichtundurchlässige Filmkassette gelegt. Film und DC-Platte wurden 10 Tage bei -80°C aufbewahrt, anschließend wurde der Film entwickelt (Maschinenentwickler).



## 2.3. Synthesen

### 2.3.1 Glycolyl-CoA-Synthese

Arbeitshypothese war es, daß Glycolyl-CoA von der Glucosamin-Acetyltransferase als Substrat für die Übertragung der Glycolylgruppe verwendet werden kann. Da Glycolyl-CoA kommerziell nicht erhältlich ist, mußte es eigens für den enzymatischen Ansatz synthetisiert werden.

Die Herstellung des Thioesters aus CoA und Glykolsäure ist durch den Einsatz der Glykolsäure selbst nicht möglich, da das Gleichgewicht der Reaktion fast ausschließlich auf der Seite der Ausgangsstoffe liegt. Deshalb mußte zunächst 1,3-Dioxolan-2,4-dion, ein stärker reaktives Derivat der Glykolsäure, hergestellt werden (Abb. 18); seine Reaktion mit dem CoA liegt fast ausschließlich auf der Seite der Produkte. Die Bildung des Glycolyl-CoA wurde mittels MALDI-TOF MS überprüft.

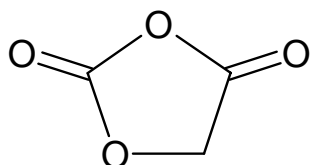


Abb. 18.  
Struktur des  
1,3-Dioxolan-2,4-dion

Gemäß der Vorschrift von Tang und Deng (2002) wurden zu einer Lösung von Glykolsäure (10 mMol) (Fluka) in 10 mL wasserfreiem Tetrahydrofuran (Lancaster) 1,5 mL (12 mMol) Diphosgen (Lancaster) gegeben. Nach Zugabe von 30 mg Aktivkohle (Lancaster) wurde die Mischung für 8 h bei RT gerührt; die Reaktion erfolgte nach der in Abbildung 19 dargestellten Reaktionsgleichung. Der Reaktionsansatz wurde durch Celit (Lancaster) filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen.

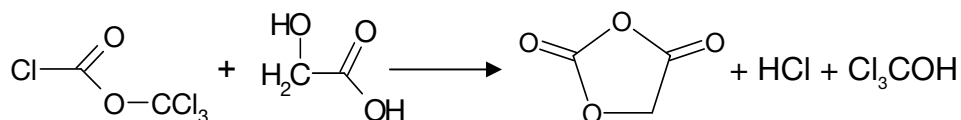


Abb. 19. Reaktionsgleichung der Bildung von 1,3-Dioxolan-2,4-dion

Die Synthese von Glycolyl-CoA erfolgte nach Jourdian & Roseman 1958. Zunächst wurde ein Gemisch aus 12 µmol CoA (10 mg bezogen auf 75 % Reinheit, Sigma), 0,3 mMol KHCO<sub>3</sub> (Roth) und 1,2 mL ddH<sub>2</sub>O hergestellt. Dazu wurden 30 µMol 1,3-Dioxolan-2,4-dion gegeben, gelöst in 3 mL Dioxan (Aldrich). Das Gemenge wurde in einem Eisbad für 1 h gerührt, der pH-Wert wurde mit

$\text{KHCO}_3$  zwischen 6-7 gehalten, um entstehende Ameisensäure zu neutralisieren, die die Thioesterbildung stören würde.

### 2.3.2 Überprüfung des Resultates der Glycolyl-CoA-Synthese mit MALDI-TOF-MS

Das Ergebnis der Reaktion wurde mit MALDI-TOF-MS überprüft, da die Größe des Moleküls (825,9 Da) die Kapazität des vorhandenen GC/MS-Gerätes überstieg. Die massenspektrometrischen Analysen wurden auf einem Bruker-Reflex IV (Bruker) durch Positivionendetektion im Reflectron-Modus durchgeführt. Die Ionisierung der kokristallisierten Analyte wurde mit einem gepulsten Laser (Wellenlänge 337 nm) durchgeführt. Die Ionen wurden in einem Feld von 20 kV beschleunigt und bei 23 kV reflektiert.

Für die Analyse wurden 2 mL des Produktes der Glycolyl-CoA-Synthese 1:10 (v/v) mit Aceton verdünnt und getrocknet. Der Rückstand wurde in 20  $\mu\text{L}$  Wasser mit 0,1 % TFA (v/v) aufgenommen. 1  $\mu\text{L}$  dieser Lösung wurden auf das *target* einer Goldplatte aufgetragen und mit demselben Volumen der Matrixlösung gemischt. Als Matrix wurde eine gesättigte Lösung von 2,5-Dihydroxybenzoesäure in Acetonitril und 0,1 % TFA (1:2, v/v) verwendet.

### 2.3.3 N-Glycolylglucosamin und N-Glycolylmannosamin

Die als analytische Standardsubstanzen benötigten Acylhexosamine N-Glycolylglucosamin und N-Glycolylmannosamin wurden auf zwei verschiedenen Wegen synthetisiert, um das Ergebnis eines Weges mit dem des jeweils anderen überprüfen zu können.

#### 2.3.3.1 Synthese der Acylhexosamine mit 1,3-Dioxolan-2,4-dion (Jourdan & Roseman 1958)

5 mMol GlcN-Hydrochlorid (Sigma) wurden in 10 mL  $\text{ddH}_2\text{O}$  aufgelöst. Zu der Lösung wurden 6 mMol  $\text{KHCO}_3$  (Roth) und 1,2 mL Methanol (Merck) gegeben. 15 mMol synthetisiertes 1,3-Dioxolan-2,4-dion verdünnt in 20 mL Dioxan (Aldrich) wurden hinzugefügt, und der Ansatz wurde 90 min unter Beibehaltung eines pH-Wertes von 6 bis 7 in einem Eisbad gerührt.

#### 2.3.3.2 Synthese der Acylhexosamine mit Acetoxyacetylchlorid (Kuboki et al. 1997)

100 mg (2,26 mMol) ManN-Hydrochlorid (Fluka) wurden in 4 mL  $\text{ddH}_2\text{O}$  aufgelöst. In der Lösung wurden 700 mg  $\text{NaHCO}_3$  (Merck) aufgelöst, dann – nachdem ein pH-Wert von 9 sichergestellt worden war – 260  $\mu\text{L}$

Acetoxyacetylchlorid (Aldrich) hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 20 min auf Eis gerührt, anschließend für ca. 2 h bei RT inkubiert. Es sollte sich ein Gemisch aus *N*-Glycolylglucosamin, *N*-Glycolylmannosamin, *N*-Acetylglycolylmannosamin und *N*-Acetylglycolylglucosamin bilden.

Die Analyse der Syntheseergebnisse erfolgte mit GC/MS. Die Geräteparameter waren wie im Abschnitt 2.2.2.4.1.3 angegeben, das Temperaturprogramm lautete wie in Tabelle 5 angegeben.

Tab. 5. Temperaturprogramm der GC/MS-Analytik der synthetisierten Acylhexosamine

T [°C]	Dauer [min]	$\Delta T/t$ [°C/min]
100	1	2
130	0	3
200	0	6
280	10	8

Dadurch, daß *N*-Glycolylglucosamin in der ersten Synthese in Reinform gebildet wurde, konnte *N*-Glycolylmannosamin bei der Untersuchung der Produkte der zweiten Synthese durch seine veränderte Retentionszeit, aber durch das gleiche Fragmentierungsmuster identifiziert werden. Da die Glycolylhexosamine zu einem späteren Zeitpunkt von der Säule eluieren als die Acetylhexosamine, war zu erwarten, daß die Acetylglycolylhexosamine – abgesehen von einem andersartigen Fragmentierungsmuster – eine höhere Retentionszeit haben als die Glycolylhexosamine.

Die technischen Bedingungen für die GC/MS-Analytik wurden in Abschnitt 2.2.2.5.2 beschrieben.

### 2.3.4 Enzymatische Synthese von Glycolyl-CoA nach Vameq

Um den grundsätzlichen Nachweis zu führen, daß die Pyruvatdehydrogenase Hydroxypyruvat zu Glycolyl-CoA und CO<sub>2</sub> verstoffwechseln kann, wurde ein entsprechender Enzymsatz mit käuflich erworbener PDH aus Schweineherz (Sigma) und Hydroxypyruvat (als Lithiumhydroxypyruvat, Fluka) durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde Pyruvat (als Natriumpyruvat, Fluka) verwendet, als Negativkontrolle Wasser.

Tabelle 6 gibt Auskunft über die für 2 mL Enzymsatz in Phosphatpuffer (25mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck) und 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)) verwendeten Komponenten (nach Vamecq 1990)

Der Ansatz wurde ohne Substrat zunächst für 10 min bei 30°C inkubiert. Dann wurde das Substrat hinzugegeben, danach wurde alle 20 s ein Volumen von 70 µL entnommen und die Reaktion durch Inkubation für 10 s bei 95°C abgestoppt. Die Proben wurden in eine Quartzküvette gefüllt und die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.

Tab. 6. Bestandteile des PDH-Enzymansatzes mit Hydroxypyruvat

	Konzentration	Verwendete Mengen von angesetzten Lösungen
PDH (Sigma)	1 U/mL	1340 µL (10 U/6,7 mL)
NAD <sup>+</sup> (Fluka)	2 µM	373 µl (10 mg/1,4 mL Puffer)
CoA (Sigma)	0,1	18 µL (10 mg/1 mL bezogen auf 85 % Reinheit)
TPP (Sigma)	0,2 µM	23 µL (12 mg /1,5 mL)
Cystein (Sigma)	2,5 µM	175 µL (10 mg /2 mL)
MgCl <sub>2</sub> (Merck)	1 µM	34 µL (10 mg /1,765 mL)
Substrat	2 µM	44 µL (10 mg /1 mL)

5 µL der letzten entnommenen Probe wurden wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben der MALDI/TOF-MS-Analyse unterworfen. Es wäre möglich gewesen, diesen Syntheseweg präparativ zu nutzen. Von dieser Idee wurde jedoch Abstand genommen, weil (a) das Glycerol nur schwierig vom Glycolyl-CoA getrennt werden kann und (b) die Ausbeute der Enzymatik im Vergleich zur chemischen Synthese klein, eine Heraufskalierung wegen der einzusetzenden Enzymmenge jedoch unverhältnismäßig teuer wäre.

#### 2.4 Aktivität der Glucosamin-6-Phosphat-Acetyltransferase

Die Aktivität der Glucosamin-6-Phosphat-Acetyltransferase in den T-47D Zellen wurde nach Vamecq et al. (1990) analysiert.

Für den Enzymansatz mußten die Zellen zunächst aufgeschlossen werden; hier wurde wegen der schonenden Wirkung auf zelluläre Enzyme die Nadelaspiration gewählt. Danach war eine differentielle Ultrazentrifugation (de Duve 1975) erforderlich, um die Organellfraktionen zu trennen. Mit der Microsomenfraktion – Golgi und ER –, die laut Literatur (Vamec & Draye 1990) die höchste Acetyltransferaseaktivität aufweisen, wurde dann der assay durchgeführt.

### 2.4.1 Zellaufschluß und differentielle Ultrazentrifugation

Die als *monolayer* vorliegenden Zellen (ca.  $5 \times 10^8$ ) wurden trypsinisiert und bei 300xg abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 2 mL Homogenisierungsmedium resuspendiert. Das Homogenisierungsmedium bestand aus 0,1 M MES, 1 mM PMSF, 1 mM PMSF und 1 M Sucrose.

Die resuspendierten Zellen wurden dann vierzigmal durch eine Injektionskanüle mit einem Innendurchmesser von 0,2 mm (Braun) in eine Spritze (Braun) aufgezogen. Der Erfolg der Nadelaspiration wurde durch Versetzen des Zellmaterials mit Trypanblau (Serva) unter dem Binokularmikroskop überprüft. In Zellen mit intakter Membran ist das Cytoplasma nicht blau angefärbt.

Die aufgeschlossenen Zellen wurden dann in ein für die Ultrazentrifugation geeignetes 1,5 mL-Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt. Eine Zentrifugation (Eppendorf 5415 R) bei 3.000xg für 10 min führte zunächst zur Abtrennung der Zellkerne. Dann folgte eine Zentrifugation (Eppendorf) des Überstandes bei 12.000xg zur Abtrennung der Membrantrümmer. Abschließend wurde der Überstand der zweiten Zentrifugation (Beckman) bei 100.000xg für 60 min zentrifugiert, um Cytosol und Microsomenfraktion zu trennen.

### 2.4.2 Acetyltransferase-Assay und N-Glycolylglucosamin-Nachweis

Der Ansatz für die Acyltransferase war wie in Tab. 7 beschrieben zusammengesetzt. Die Komponenten wurden in 100 mM Tris-HCl, pH 8 aufgelöst. In 2 mL des Ansatzes wurden die Microsomenfraktion resuspendiert, dann wurde er bei 37°C inkubiert. In den ersten 5 Minuten wurden alle 30 s ein Volumen von 40 µL entnommen, dann bis zur 10. Minute alle 60 s und schließlich wurden bis zur 25. Minute alle 2,5 min 40 µL entnommen. Die entnommenen Mengen wurden zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion für 10 s auf 95°C erhitzt und dann bis zur weiteren Analyse eingefroren.

Tab. 7. Bestandteile des Acyltransferaseansatzes

	Konzentration
EDTA	0,25 mM
Triton X-100	0,1 % v/v
Glucosamin	1 mM
Glycolyl-CoA	0,1 mM

Die aufgetauten Proben wurden zunächst für 15 min bei 16.100xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in der Vakuumzentrifuge (DNA plus, Heto) von Wasser befreit. Dann wurde der Rückstand mit 30 µL MSTFA versetzt und für 20 min bei 65°C erhitzt. Die Probe wurde nun der GC/MS-Analyse unterzogen. Die Geräteparameter waren wie oben (2.2.2.4.1.3) angegeben, Temperatur- und Massenspektrometer- programm waren wie oben (2.3.2.2) dargestellt.

## **2.5 Fütterungsversuche mit normaler und isotopenmarkierter GABA**

Hier sollte versucht werden, den Neu5Gc-Gehalt der Zellen durch externes Zusetzen von GABA zum Zellmedium zu erhöhen.

### **2.5.1 Verstoffwechselung von extern zugegebener GABA**

Für den Fütterungsversuch wurde eine 1 M GABA-Lösung (Fluka) hergestellt und mit NaHCO<sub>3</sub> neutralisiert. Die Lösung wurde dann sterilfiltriert, und 400 µL wurden zu 40 mL Zellmedium gegeben, sodaß GABA im Zellmedium eine Konzentration von 10 mM hatte. Die Zellen wurden 42 h in dem Medium gezogen, dann geerntet und der Neu5Gc-Analyse wie oben unter 2.2.2 ff. beschrieben unterzogen.

### **2.5.2 Kultivierung der Zellen mit deuterierter GABA**

Bei Zugabe einer deuterierten GABA zum Zellkulturmedium war zu erwarten, daß die Zellen im Fall einer endogenen Neu5Gc-Synthese eine Neu5Gc synthetisieren, die eine um 2 Da erhöhte Molekularmasse hat (s.o., Abb. 11 und Kap. 1.3.4). Ein solcher Ansatz hat den Vorteil, daß es nicht erforderlich ist, sich auf die Identifikation einer radioaktiv markierten Neu5Gc in einer DC zu verlassen. Vor diesem Hintergrund wurde die in 2.5.2 beschriebene Vorgehensweise mit der oben erwähnten (Abschnitt 2.5.1) sechsfach deuterierten GABA durchgeführt.

### **2.5.3 Kultivierung der Zellen mit radiomarkierter GABA**

Ein sehr sensibler Ansatz zur Verfolgung des möglichen Stoffwechselweges von der GABA zur Neu5Gc ist der Einsatz einer GABA, deren viertes Kohlenstoffatom durch ein <sup>14</sup>C-Atom ersetzt wurde (H<sub>2</sub>N-<sup>14</sup>CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH).

Hierzu wurden 10 µCi für eine 75 cm<sup>2</sup>-Flasche mit T-47D-Zellen eingesetzt. Nach 42 h wurden die Zellen geerntet und die Sialinsäuren isoliert (s.o., Abschnitt

2.2.2). Anstelle der mit dem radioaktiven Analyten nicht durchführbaren GC/MS-Analyse wurde das getrocknete Sialinsäurehydrolysat mit 20  $\mu\text{L}$  dd  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und der DC-Analyse mit anschließender Autoradiographie (s.o., 2.2.2.4.3) zugeführt.

## **2.6 Immunodetektion der Neu5Gc mit Konfokalmikroskopie**

Zellen können mit Antikörpern gegen bestimmte Antigene, Proteine oder Glykanstrukturen auf der Zelloberfläche inkubiert werden. Die so gebundenen Antikörper können als Antigene mit einem zweiten fluoreszenzmarkierten Antikörper reagieren. Die hiermit resultierende Fluoreszenzmarkierung der gesuchten Proteine oder Glykanstrukturen kann im Verfahren der sogenannten *Konfokalmikroskopie* in sensitiver Weise sichtbar gemacht werden. Da die chemischen Methoden der Neu5Gc-Analytik völlig zufriedenstellend waren und ein tumordiagnostischer Ansatz bezüglich der endogenen Neu5Gc-Präsenz nicht viel versprach, wurden Methoden der Immunodetektion nicht weiter für die Neu5Gc-Analytik verfolgt. Es sollte jedoch wenigstens sichergestellt werden, daß der in einer unbekanntem Konzentration vorhandene Antikörper 3E1.2 (Devine 1991) mit Neu5Gc-haltigen Epitopen reagiert.

Die Konfokalmikroskopie wurde folgendermaßen vorbereitet:

Zwei Objektträger für die Lichtmikroskopie wurden über Nacht in 70 % Ethanol mit 1 % HCl inkubiert. Sie wurden dann in der Raumluft getrocknet, mit PBS gewaschen, für 30 min in einer wäßrigen Lösung von 10 % Polylysin in Wasser gelagert, und abschließend für 5 min in PBS gewaschen.

300  $\mu\text{L}$  Medium mit  $10^5$  Epithel- oder Tumorzellen wurden für 1 h auf den Objektträger gegeben; nach 1 h wurde das Medium zweimal mit 300  $\mu\text{L}$  PBS vom Objektträger gewaschen.

Der erste Antikörper, 3E1.2 (geschätzte Ausgangskonzentration: 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), wurde nun in einer Verdünnung von 1:1000 in 300  $\mu\text{L}$  PBS auf die Zellen gegeben; die Immunreaktion lief über den Zeitraum einer Stunde. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Der zweite Antikörper, Alexa 488, wurde dann (gelöst wiederum in PBS mit 0,1 % BSA (v/m) in einer Konzentration von 1:1000) zu den Zellen gegeben, die Einwirkungszeit betrug 30 min. Abschließend wurden die Zellen auf dem Objektträger dreimal mit PBS gewaschen; die Probe war nun bereit für die Inspektion mit dem Konfokalmikroskop (Leica CTR MIC)

Zur Excitation der Fluorophoren des Alexa488-Antikörpers wurde ein Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm verwendet.

## **2.7 Genetische Analyse des Transkriptoms von T-47D-Zellen im Vergleich mit Epithelzellen**

In der Einleitung wurde darauf hingewiesen (1.3.3), daß die Synthese bestimmter Glykanstrukturen zumindest teilweise vom Expressionsniveau der entsprechenden Glykosyltransferasen abhängt. Andererseits scheinen auch chemische Modifikationen einzelner Kohlenhydrate, wie der Sialinsäuren, von der Menge des mRNA-Transkriptes abzuhängen, so z.B. bei der Acetyltransferase, die bestimmte Hydroxyfunktionen der Sialinsäuren acetyliert. Diese Befunde gaben Anlaß, eine Transkriptomanalyse von T-47D im Vergleich mit Epithelzellen zu erstellen, die in dieser Form in der Literatur noch nicht durchgeführt wurde. Aufgrund dieses neuen Untersuchungsansatzes wurde eine Gesamtanalyse des Transkriptoms durch die zur Verfügung stehende *microarray*-Analyse mit DNA-Chips (Affymetrix) durchgeführt.

Unabhängig davon sollten die für ausgewählte Enzyme des vermuteten Neu5Gc-Synthesewegs gefundenen *microarray*-Daten mit der quantitativen *real-time* PCR quantitativ bestätigt oder widerlegt werden.

Der Teil der genetischen Analyse ist gegliedert in (1) RNA-Extraktion, (2) cDNA-Herstellung, (3) *microarray*-Analyse (4) Selektion und Test der *qrtPCR-primer* im Agarosegel (5) Durchführung und Auswertung der *qrt-PCR*.

### **2.7.1 RNA-Extraktion**

Zunächst wurden  $10^7$  T-47D- bzw. Epithelzellen geerntet und in PBS von Medium abzentrifugiert. Für die Extraktion der Gesamt-RNA wurde unter RNase-freien Bedingungen den Arbeitsanweisungen des hierfür eingesetzten *RNAeasy-Kits* (Qiagen) gefolgt. Die gewonnene RNA wurde schließlich mit einem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf) quantifiziert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt, wenn sie nicht sofort weiterverwendet wurde.



### 2.7.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde je 1 µg RNA von T-47D- bzw. Epithelzellen verwendet. Es wurde zunächst in je einem Nuclease-freien Reaktionsgefäß eine Mischung mit der in Tabelle 8 wiedergegebenen Zusammensetzung erstellt.

Tab. 8. Komponenten des Voransatzes der cDNA-Synthese gemäß den Arbeitsvorschriften des Produzenten der reversen Transkriptase (NEB)

	V [µL]
total RNA	1-10 je nach RNA-Konzentration
dT <sub>23</sub> -VN-Primer (NEB)	2
dATP, dCTP, dGTP, DTTP (PeqLab)	je 1 (Konzentration jeweils 2,5 µM)
Nuclease-freies Wasser (Fluka)	auf 16 auffüllen

Die dT<sub>23</sub>-*primer* hybridisieren mit dem Poly-A-Schwanz der mRNA und ermöglichen es so der Polymerase, die Synthese der DNA ausgehend von der Oligo-dT-Region durchzuführen.

Diese Mischung wurde 5 min bei 70°C inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA aufzubrechen. Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurde folgender cDNA-Reaktionsansatz hergestellt:

Tab. 9. Komponenten des Reaktionsansatzes der cDNA-Synthese gemäß den Arbeitsvorschriften des Produzenten der reversen Transkriptase (NEB)-

	V [µL]
RNA/Primer/NTP-Gemisch	16
10x Reverse-Transkriptase-Reaktionspuffer	2
RNase-Inhibitor	1
M-MuLV reverse Transkriptase (NEB)	1

Die Reaktion erfolgte bei 42 °C für 1 h. Durch Erhitzen auf 95°C wurde das Enzym inaktiviert. Nach dem Abkühlen war die hergestellte cDNA für die PCR verfügbar oder wurde für spätere Verwendung bei -20°C eingefroren.

### 2.7.3 Microarray-Analyse

Das Protokoll für die microarray-Analyse folgt den Angaben von J. Schultze (Arbeitsgruppe Molekulare Tumorbologie und Tumorummunologie, Klinikum der Universität zu Köln, pers. Mitteilung 2006). 5 µg nach der in 2.7.1 dargestellten Methode gewonnene Gesamt-RNA wurden verwendet, um doppelsträngige cDNA zu generieren. Hierfür wurde ein T7-(dT)24-Oligonucleotid-*primer*

zusammen mit dem *One Cycle* cDNA-Synthese-kit (Affymetrix, Santa Clara, USA) verwendet. Nach Reinigung mit dem *Sample Cleanup Module* (Affymetrix) für *microarray*-Analysen diente die cDNA als *template*, um durch *in vitro*-Transkription (IVT) biotinylierte cRNA herzustellen, wobei das *IVT Labeling Kit* (Affymetrix) zum Einsatz kam. Die markierten cRNA-Transkripte wurden wiederum mit dem *Sample Cleanup*-Modul gereinigt, anschließend wurden generierte Mengen und Reinheit durch UV-Spektroskopie und Electrophorese gemessen. Die Fragmentierung der cRNA-Transkripte, Hybridisierung and *scanning* der *high-density* Oligonucleotid-*microarrays* (HG-U133A *arrays*, Affymetrix) wurden gemäß der Richtlinien des Herstellers (*GeneChip Expression Analysis Technical Manual*, Affymetrix) durchgeführt.

Für die Datenerhebung wurde die Affymetrix *Microarray Suite* 5.0 benutzt. Die Analyse der Primärdaten wurde mit der dCHIP 1.3.1<sup>®</sup>-Software durchgeführt, wobei die Datenerhebung mittels des *PM-only*-Modells durchgeführt und die Daten mit der *invariant set*-Normalisierung (Li & Wong 2001) unterworfen wurden. Für *gene ontology assessment* und die Visualisierung der metabolischen Pfade wurden MAPPfinder2.0<sup>®</sup> und GenMAPP2.0<sup>®</sup> (Dahlquist *et al.* 2002) eingesetzt. Die Quantifizierung unterschiedlich exprimierter Gene erfolgte mit dem *unpaired student's T-Test*.

## 2.7.4 Selektion und Test der *qrt-PCR-primer*

### 2.7.4.1 *in silico*-Auswahl der *primer*

Für die spätere *rt-PCR* sind folgende Kriterien entscheidend (Bustin 2004):

- Die *primer* sollten die Exon-Grenzen überlappen, d.h. eine echte Sequenz der cDNA widerspiegeln. Da die cDNA durch Herausschneiden der Introns aus der DNA während des *splicings* entsteht, können *primer*, die an der Grenze des Exons enden, zu einer Amplifikation vorhandener DNA als Verunreinigung der extrahierten RNA führen. Dies läßt das Ausmaß der Transkription eines Gens höher erscheinen, als es tatsächlich ist.
- Daneben sollten die *primer* eine Länge zwischen 18 und 24 Basenpaaren haben;
- Die *primer*-Paare sollten an ihren Enden nicht komplementär zueinander sein, um die Bildung von *primer*-Dimeren zu vermeiden;
- Die *primer* sollten einen GC-Gehalt zwischen 40 und 60 % aufweisen.

- Das PCR-Produkt sollte eine Länge zwischen 65 und 115 Basenpaaren haben.

Bei der Generierung rtPCR wurde folgende Strategie eingesetzt:

- 1) Für die Abfrage der Roche-Datenbank (s.u.) musste zunächst die *sequence id* des betreffenden Gens ermittelt werden. Hierzu wurde die Nukleotidsequenzdatenbank des NCBI abgefragt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>).
- 2) Die ermittelte *sequence id* wurde dann in die Universal ProbeLibrary for Human eingegeben (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/adc.jsp>), die die erforderlichen Exon-übergreifenden Primersequenzen zur Verfügung stellt.
- 3) Die erhaltenen Sequenzen wurden dann mit der *in silico*-PCR-Datenbank University of California Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) daraufhin überprüft, ob sie tatsächlich das von der Roche-Datenbank angegebene PCR-Produkt ergeben, und ob sie spezifisch für das gesuchte Gen sind.

So wurde eine Liste von *primer*-Paaren für 9 Gene generiert, deren Expressionsniveau in den T-47D-Zellen gemäß der *microarray*-Analyse erhöht gegenüber dem Niveau in den Epithelzellen war. Nun wurde zunächst eine normale PCR mit anschließender Analyse der Produktmenge durch Agarosegelelektrophorese und UV-Detektion der im Gel vorhandenen DNA durchgeführt.

#### **2.7.4.2 *in vitro*-Test der *primer***

Die in der Tabelle 11 angegebenen *primer*-Sequenzen wurden mit den gewonnenen cDNAs durch eine PCR auf ihr Funktionieren in der rtPCR hin geprüft (Abkürzungen der Gennamen siehe Abkürzungsverzeichnis). Es werden nur diejenigen Sequenzen aufgeführt (Tab. 11), die in der PCR positive Resultate ergaben. *Primer*, die kein positives Ergebnis erbrachten, wurden nicht mit aufgeführt.

Zusätzlich zu den aufgeführten *primern* wurde ein GAPDH-*primer* (NEB) als eine für viele Genome geeignete Positivkontrolle verwendet. Zunächst wurde bei der PCR gemäß der Herstellerangaben der Taq-Polymerase ohne weiteren Zusatz von MgCl<sub>2</sub> gearbeitet; es stellte sich jedoch heraus, daß die Produktmenge durch Zusatz des Magnesiumsalzes erhöht wurde, die vom Hersteller empfohlene Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (Tab. 10) wurde daher mit MgCl<sub>2</sub> ergänzt.

Tab. 10. Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den *in vitro*-PCR-Test der *primer*

	V [ $\mu$ L]
PCR-Puffer (NEB)	2,5
50 mM MgCl <sub>2</sub> (NEB)	1
dNTPs je 10 mM	1,5
Taq-Polymerase (NEB)	1
<i>Primer</i> 10 $\mu$ M je	1,25
cDNA (geschätzte Menge: 500 ng)	2,5
Nuclease-freies Wasser (Fluka)	13,5

Tab. 11. DNA-Sequenzen der für die qrt-PCR verwendeten *primer*.

Die Nummern beziehen sich auf die Gelphotos, Abb. 45 und 46.

Primer-Nr.	Primername	DNA-Sequenz der <i>Primer</i> -Paare
1	ABAT_2F	GCCTCTGATGAAGACGGAAG
	ABAT_2R	GCACAGCCTCTGCATTCTG
2	AKRA_2F	ACTGGCCTTATGCCTTTGAG
	AKRA_2R	TCGTAGCATATAGTCCCATCAGC
3	BUCS_3F	CCAAGATGGCAAACACTCC
	BUCS_3R	CTTCAGGCTCCGTAATTTCTCT
4	HADHSC_F	GCCTGTCATGAACTTGTGG
	HADHSC_R	CCTAGGGCTTTGCTAAAGTCTACC
5	EHHADH_F	CTTTCGGAGGGGGACTAGAG
	EHHADH_R	AACTTCTGGTAAGCCAACTTGAG
6	ACADSB_1F	TGGCAAAGACTATTTGATTTTCA
	ACADSB_1R	GCAGCATTGTATGTTAGTAATCTTGC
7	ACADSB_2F	TGCCTGGTTCATTTTTGTGT
	ACADSB_2R	ATCCAGAAGCCAGAAGACCA
8	ACADS_F	CGGAGTCATCATGAGTGTCAA
	ACADS_R	TCCTTGGAGCCAACTTCAA
9	BDH_F	GCCTGGAGACCTACAAGCAG
	BDH_R	CATGCTGCTGATATTGACGAC
10	ST3GAL1_2F	GAGGACGACACCTACCGATG
	ST3GAL1_2R	CAAGTTATTGGGCTTCTTCTCC

Das Temperaturprogramm der PCR war wie folgt (Tabelle 12) aufgebaut. PCR-Produkte wurden bei 4°C gelagert, sofern sie nicht sofort weiterverwendet wurden.

Tab. 12. Temperaturprogramm der Test-PCR der *primer*

T [°C]	Dauer [min]	
95	5	
95	0,5	40 Zyklen
55	0,5	
72	1	
72	10	

Die PCR-Produkte wurden auf einem 3 %igen Agarosegel mit 1 µL Ethidiumbromid pro 40 mL Agaroselösung analysiert, auf dem als Längenstandard gleichzeitig eine DNA-Fragmentmischung (Sigma) mit Längen von 20 bis 1000 Basenpaaren lief. In einem UV-Belichtungsgerät (TFP-M/WL. MWG Biotech) wurden die Amplifikate sichtbar gemacht und abfotografiert (Gelprinter 2000i, MWG Biotech).

### 2.7.5 Durchführung der qrt-PCR

Nachdem sichergestellt war, daß die ausgewählten *primer* das gewünschte Ergebnis erbrachten, erfolgte der Übergang zur qrt-PCR. Hier war es erforderlich, einen geeigneten Quantifizierungsstandard zu finden. Diesbezüglich wurde schließlich die ribosomale RNA als Referenzmolekül ausgewählt, weil sich in entsprechenden Studien ihr Expressionsniveau gewebs- und zelltypspezifisch als weitgehend konstant erwiesen hat (Goidin et al 2001). Dies läßt sich von den als Standards eingesetzten GAPDH und Actin nicht behaupten, wie mehrere Studien und Übersichtsartikel (Zhong et al. 2001 ) mittlerweile gezeigt haben.

Der rRNA-*primer* (18 s rRNA; Eurogentec) wurde in einer Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnung von  $10^8$  eingesetzt, um eine Vergleichbarkeit des Expressionsniveaus gering exprimierter Gene und des Standards zu ermöglichen. Als Fluoreszenzfarbstoff für die Detektion der entstehenden PCR-Produkte wurde der SYBR Green-Farbstoff im QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen)

eingesetzt. Der Reaktionsansatz für die PCR war wie in Tabelle 13 beschrieben zusammengesetzt.

Tab. 13. Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die qrt-PCR

	V [ $\mu$ L]
SYBR Green Master Mix	25
cDNA (geschätzte Menge: 1 $\mu$ g)	5
Primer 10 $\mu$ M je	2,5
Nuclease-freies Wasser (Fluka)	17

Für die qrtPCR wurde die *DNA Engine Opticon2* (MJ Research) eingesetzt. Zur quantitativen Auswertung kam die *Opticon Monitor*-Software, Version 1.2 (MJ Research/Bio-Rad) zum Einsatz. Das Temperaturprogramm war wie in Tab. 14 beschrieben aufgebaut.

Tab. 14. Aufbau des Temperaturprogrammes für die qrt-PCR

T [ $^{\circ}$ C]	Dauer [min]	
94	2	
94	0,5	30 Zyklen
50	0,5	
72	0,5	
72	1	

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Sialinsäureanalytik

Vor dem Hintergrund einer großen Zahl dokumentierter Analysemethoden für Sialinsäuren waren für die Aufgabenstellung der Arbeit folgende Schritte unerlässlich:

- (1) Identifizieren einer Extraktions- und Analysemethode, die die Neu5Gc-Ausbeute maximiert;
- (2) Vermeidung analytischer Artefakte in bezug auf die Neu5Gc-Analytik anhand eines eindeutigen Musters von spektrometrischen Massespuren;
- (3) Sicherstellung der Abwesenheit von Neu5Gc in den verwendeten Zellkulturmedien.

Nach diesen Vorarbeiten folgt die Analytik der serumfrei gezogenen Zelllinien auf Neu5Gc.

##### 3.1.1 Säurekatalysierte Hydrolyse im Vergleich mit Methanolyse

Die in der Literatur angegebenen Verfahren zur Hydrolyse von Sialinsäuren wurden hinsichtlich ihres Neu5Gc-Ertrags und des Verhältnisses von Neu5Ac und Neu5Gc untersucht. Als Referenzprotein wurde hierfür das Rindersubmaxillarismuzin (BSM) verwendet. Nach einer kürzlich erschienenen Arbeit (Smits *et al.* 2005) beträgt das Mengenverhältnis von Neu5Gc zu Neu5Ac 1: 1,8.

Bei Verwendung von 0,1 M TFA ergab sich für die Analyse des BSM als Mittelwert der Verhältnisse von Neu5Gc zu Neu5Ac 1:4. Wurde methanolische HCl eingesetzt, sank das Verhältnis auf 1:5.

Hinzu kommt, daß bei der Methanolyse geringe Mengen der  $\beta$ -Anomere der Sialinsäuren entstehen (vgl. Abbildung 20). Im Fall der Neu5Ac hat das Signal des  $\beta$ -Anomers eine Intensität von etwa 10%, gemessen am Signal des  $\alpha$ -Anomers. Mit der Säurehydrolyse läßt sich die Mutarotation vermeiden, die Hydrolyse liefert ausschließlich (vgl. Abbildung 21) das biogene  $\beta$ -Anomer. Wegen der geringeren relativen Ausbeute und der Bildung des  $\alpha$ -Anomers wurde die Neu5Gc-Freisetzung von den Zellmembranproteinen ausschließlich mit TFA als Hydrolysereagenz durchgeführt. Die Wasserempfindlichkeit der Methanolyse (Chambers & Clamp 1971) spricht ebenfalls gegen die Wahl dieser Methode, auch wenn das aus der Herstellung des Methanolysereagenz entstehende Methylacetat Wasser binden sollte.

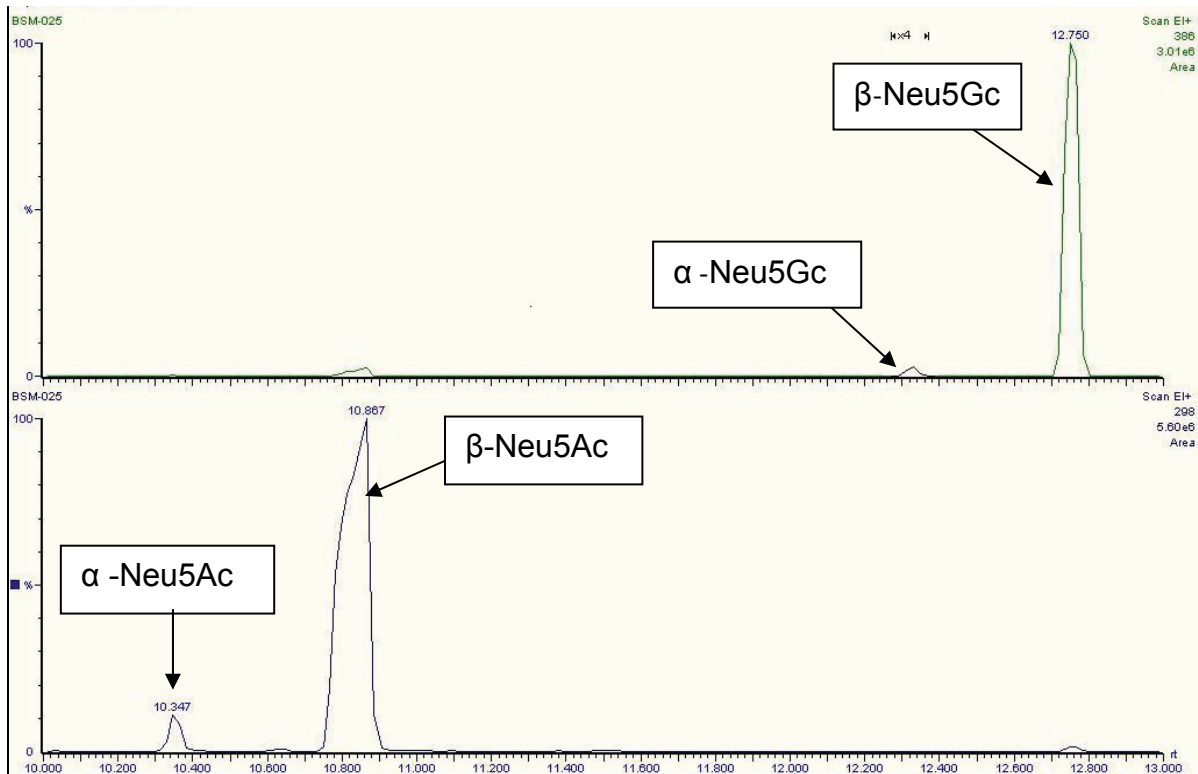


Abb. 20 Chromatogramm der Sialinsäure-TMS-Derivate nach Methanolyse. Gezeigt wird ein *scan* der MassLab-Software nach den Ionen  $m/z$  298 und 388 im Gesamtionenstrom (s.u. Tab. 14 zur vermuteten Struktur der detektierten Ionen).

Das im zyklischen *Scan*-Modus registrierte Chromatogramm wurde ionen-spezifisch für die relativen Massen  $m/z$  298 bzw. 386 dargestellt. Beide Ionen stellen die entsprechenden Basalionen dar, die nach Pertrimethylsilylierung von Sialinsäuren detektiert werden (Fragment D in Tab. 14). Der einzige Unterschied im Fall der Methanolyse ist die Ersetzung der TMS-Gruppe an der Carboxyfunktion durch eine Methylgruppe, wodurch das Basalion des trimethylsilylierten Methylesters eine um 58 Da reduzierte Masse erhält.

Im Vergleich (Abbildung 21) mit dem vorhergehenden Chromatogramm zeigt die GC/MS-Analytik des Säurehydrolysats von BSM lediglich zwei Signale ohne Anomerdetektion. Wiederum wurden die im *Scan*-Modus registrierte Basalionenspur der Sialinsäure-Fragmentierung dargestellt; ihre Struktur wird im nächsten Abschnitt beschrieben.



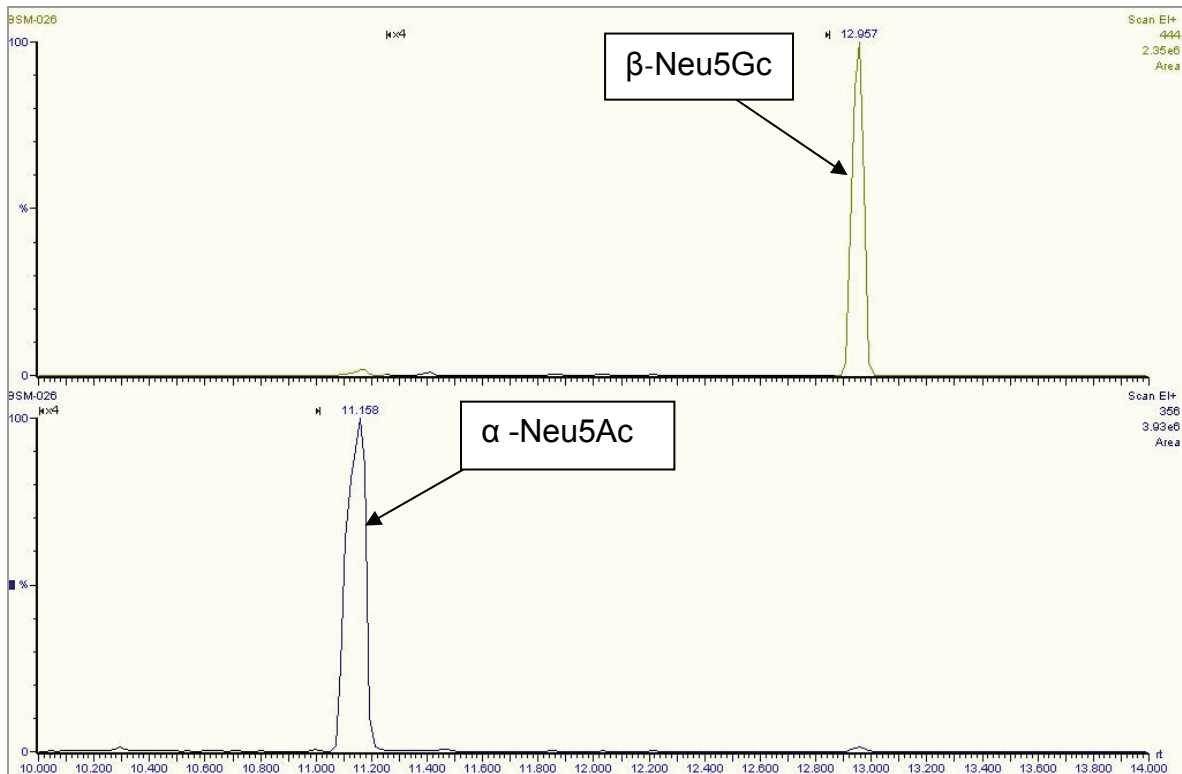


Abb. 21 Chromatogramm des Sialinsäurehydrolysats mit TFA und nachfolgender Derivatisierung mit TMSI. Gezeigt wird ein im zyklischen *Scan*-Modus registriertes Chromatogramm bei den relativen Massen  $m/z$  356 und 444 im Gesamtionenstrom. Eine Darstellung der Struktur der detektierten Ionen erfolgt im nächsten Abschnitt (3.1.1.2).

Die Hydrolyse durch 2 M Propionsäure bzw. durch 2 M Essigsäure brachte dagegen auch in mehrfachen Ansätzen keine verwertbaren Ergebnisse in der GC/MS-Analyse. Getestet wurden auch Hydrolysen mit 0,05, 0,2, 0,5 und 1 M TFA. Diese verschlechterten jedoch die Ausbeuten freigesetzter Sialinsäuren; eine Hydrolyse mit 0,1 M TFA für 1 h bei 80°C ergab sich aus der Evaluation hiermit als optimal.

In Vorversuchen mit Kumarinsäure (eine aromatische Säure mit einer Hydroxyfunktion) gelang die Methylierung mit TSMDM, auch die Peracylierung von Hexosen als Testsubstanzen verlief erfolgreich. Die Kombination beider Methoden und damit die Weiterentwicklung der Methode nach Bulai (Bulai et al. 2003) führte dagegen zu keinen positiven Ergebnissen.

### 3.1.1.2 Massenspektrometrische Fragmentierungsmuster von Neu5Gc und Neu5Ac

Eine Injektion von je 0,3 nmol Neu5Ac und Neu5Gc ergibt das in Abbildung 22 gezeigte Chromatogramm. Neu5Ac und Neu5Gc werden als TMS-Derivate deutlich voneinander getrennt; die Retentionszeiten unterscheiden sich um etwa 1,8 min. Diese Differenz blieb auch bei allen folgenden GC/MS-Analysen weitgehend stabil.

Das Chromatogramm zeigt, daß eine Trimethylsilylierung der Aminofunktion der Sialinsäuren durch die Verwendung von TMSI vollständig vermieden werden konnte.

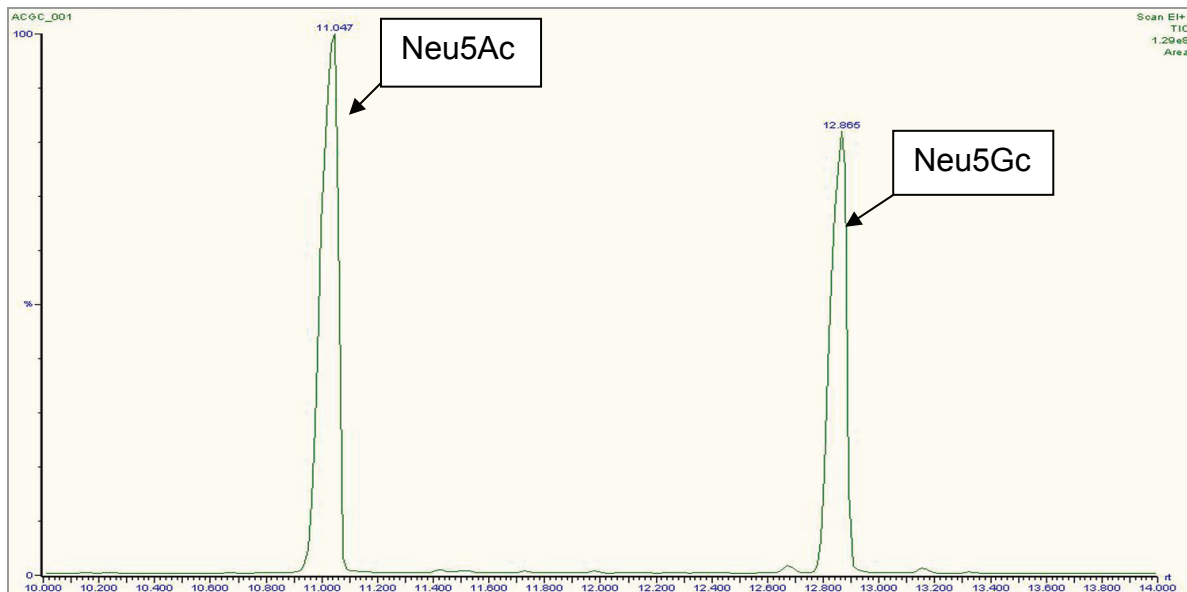


Abb. 22 Totalionen-Chromatogramm (150-800 Da) eines Gemischs von je 100 ng Neu5Gc und Neu5Ac nach Derivatisierung mit TMSI.

Beide Sialinsäuren zeigten keine Anomerisierung und waren daher als einheitliches Signal detektierbar.

Abbildung 23 zeigt das Massenspektrum der pertrimethylsilylierten Neu5Ac.

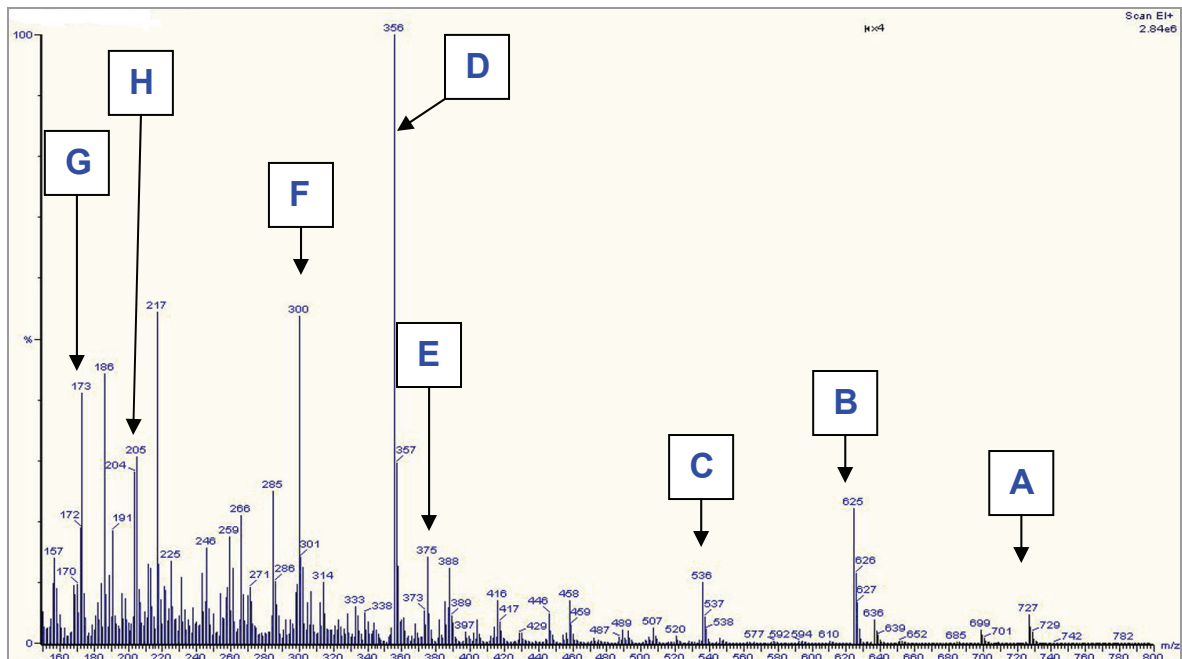


Abb. 23 70 eV-EI- Massenspektrum der Neu5Ac registriert unter den im 2. Abschnitt beschriebenen GC/MS-Bedingungen

Das entsprechende Spektrum der Neu5Gc zeigt Abbildung 24.

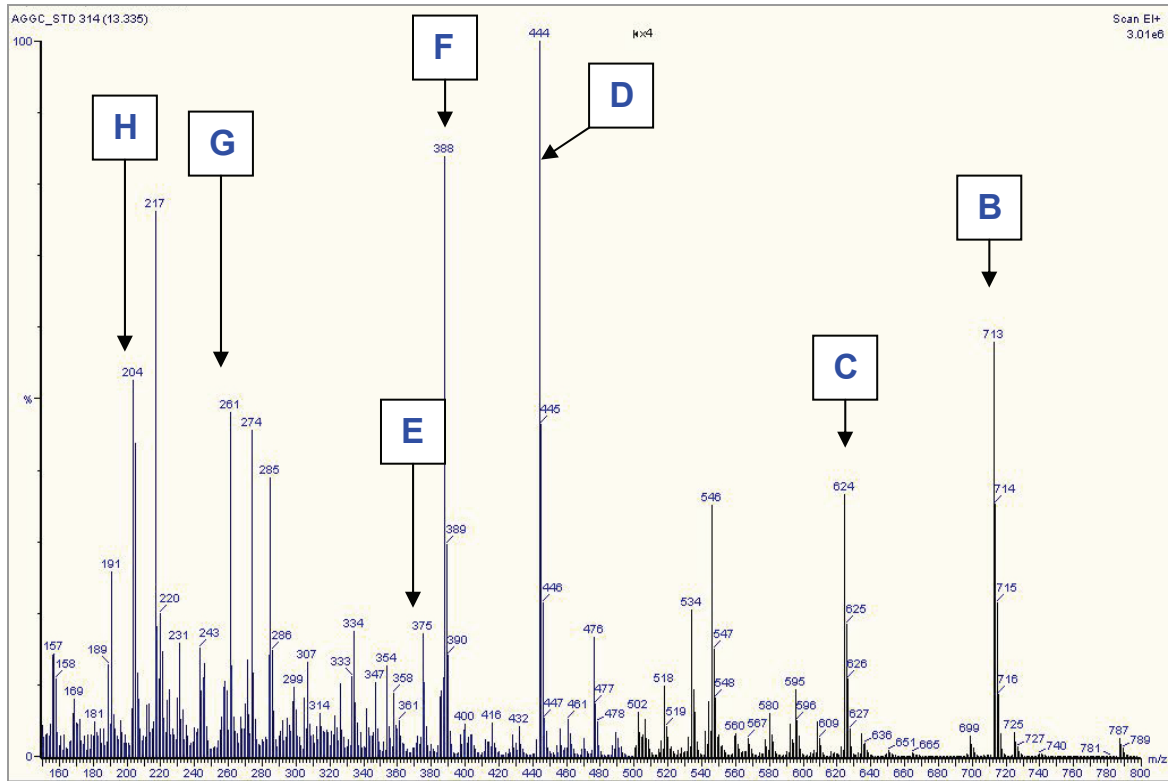


Abb. 24 70 eV-EI-Massenspektrum der Neu5Gc registriert unter den im 2. Abschnitt beschriebenen GC/MS-Bedingungen

Die intensivsten Ionen der gezeigten Sialinsäurespektren lassen sich den Molekülfragmenten in Tabelle 14 zuordnen. Die Strukturen der meisten dieser Fragmente sind schon in der Arbeit Übersicht von Kamerling und Vliegenthart (Kamerling & Vliegenthart 1989) beschrieben worden. Die Autoren gingen allerdings von einer Methylierung der Carboxygruppe mit anschließender Trimethylsilylierung der Hydroxygruppen aus. Bei einer Trimethylsilylierung aller funktionellen Hydroxy- und Carboxygruppen ergibt sich durch die Ersetzung der Methylgruppe an der Carboxyfunktion eine um 58 Da höhere Masse für alle von Kamerling und Vliegenthart beschriebenen Fragmente. Abweichend hiervon findet sich jedoch das Fragment mit  $m/z$  300 bzw. 388 im Fall der Neu5Gc, das eine relative Intensität von 55 bis 80% der Intensität des Basalions hat. Diesem Fragment konnte die Struktur F zugeordnet werden. Ein vergleichbares Fragment findet sich im Fall der trimethylsilylierten Sialinsäuremethylester nicht (vgl. Kamerling & Vliegenthart 1989).

	Struktur	Neu5Ac	Neu5Gc
A		727	(814)
B		625	713
C		536	624
D		356	444
E		375	375
F		300	388
G		173	261
H		205	205

Tab. 14.  
Molekülfragmentationen von  
permethylsilylierten  
Sialinsäuren nach EI-  
Massenspektrometrie bei  
70 eV.

Zu diesen Strukturen  
(außer Struktur F) vgl.  
auch Kamerling &  
Vliegthart 1989.

**R**= O=C-CH<sub>3</sub> (Neu5Ac)  
oder O=C-CH<sub>2</sub>-OTMS  
(Neu5Gc)

Die Pertrimethylsilylierung bietet somit gegenüber der initialen Methylierung der Carboxyfunktion mit anschließender Trimethylsilylierung der Hydroxyfunktionen einen Vorteil bei der Identifizierung der verschiedenen Sialinsäuren, da neben dem Basalion ein weiteres intensives strukturelevantes Ion genutzt werden kann. Dies erleichtert die Identifizierung weiterer Sialinsäuren; so läßt sich in Hydrolysaten der Membranfraktion von T-47D-Zellen ein Signal detektieren, zu dem folgendes Fragmentierungsmuster gehört (Abbildung 25).

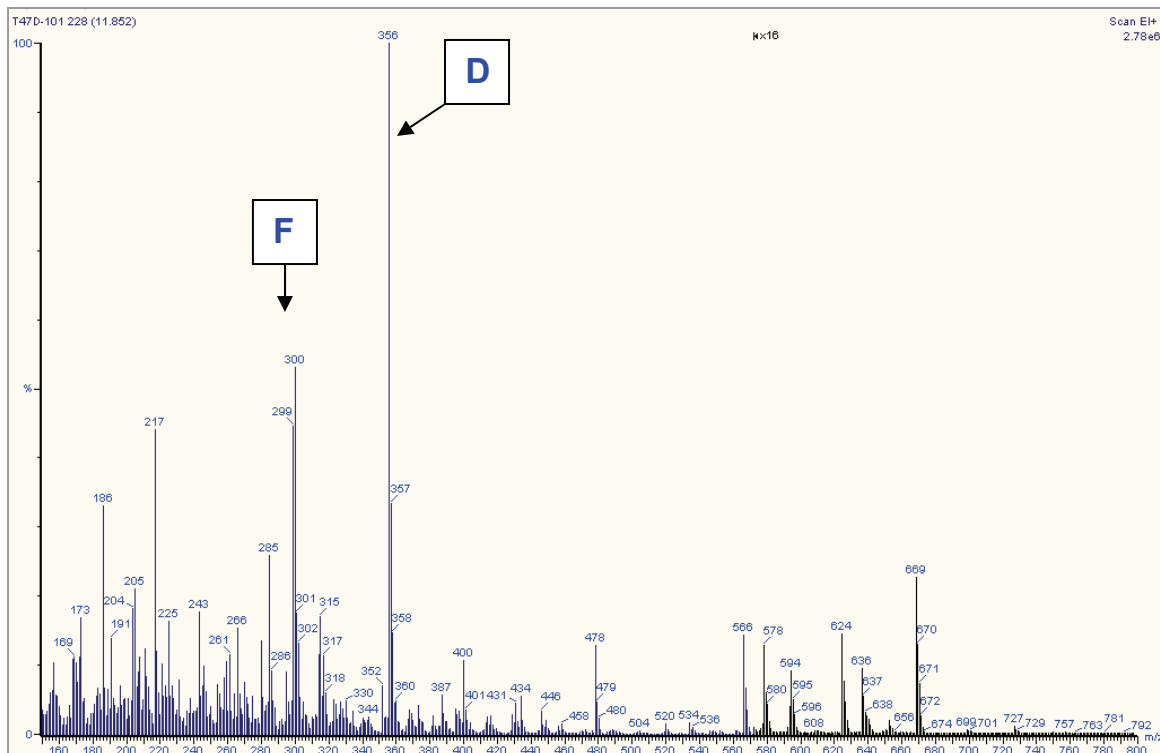


Abb. 25 70 eV-EI-Massenspektrum von Neu5Ac8/9Me (Scan von 150 bis 800 Da) unter den im 2. Abschnitt beschriebenen GC/MS-Bedingungen

Hier treten wiederum die Fragmente D und F auf, die die Substanz als Sialinsäure identifizieren. Die Anwesenheit des Ions  $m/z$  300 läßt die Annahme zu, daß die Sialinsäure am vierten Kohlenstoffatom unmodifiziert ist,  $m/z$  300 und 356 lassen auf eine Acetylierung der Aminofunktion schließen (ansonsten lägen z.B.  $m/z$  388 und 444 vor, wie im Fall der Neu5Gc). Zwischen den Massespuren  $m/z$  566 und 669 liegt dagegen eine Differenz von 58 amu gegenüber den Spuren 625 und 727 des Neu5Ac-Massenspektrums (siehe oben, Abbildung 23). Dies läßt sich durch die Methylierung der Hydroxyfunktionen des Moleküls entweder am achten oder am neunten Kohlenstoffatom erklären, die zu der genannten Massendifferenz führt – 15 Da für die methylierte Hydroxygruppe anstatt 73 Da für die trimethylsilylierte

Hydroxygruppe. Es handelt sich also um Neu5Ac8/9Me, die z.B. auch auf humanen Erythrozyten vorkommt (Bulai et al. 2003).

### 3.1.1.3 Sicherstellung der Abwesenheit von Neu5Gc in den verwendeten Zellkulturmedien

Die mit Trichloressigsäure gefällten Proteine des AIM V-Komplettmediums wurden einer Sialinsäureanalyse wie in 2.2.2.5 dargestellt unterzogen. Nach GC/MS-Analytik und massenspektrometrischer Registrierung der Chromatogramme der für Neu5Gc charakteristischen Ionen bei  $m/z$  388 bzw. 444 ergab sich das in Abbildung 26 wiedergegebene Profil. Zum Vergleich wird ein ionenselektives Chromatogramm bei der relativen Masse des Basissignals der Neu5Ac gezeigt.

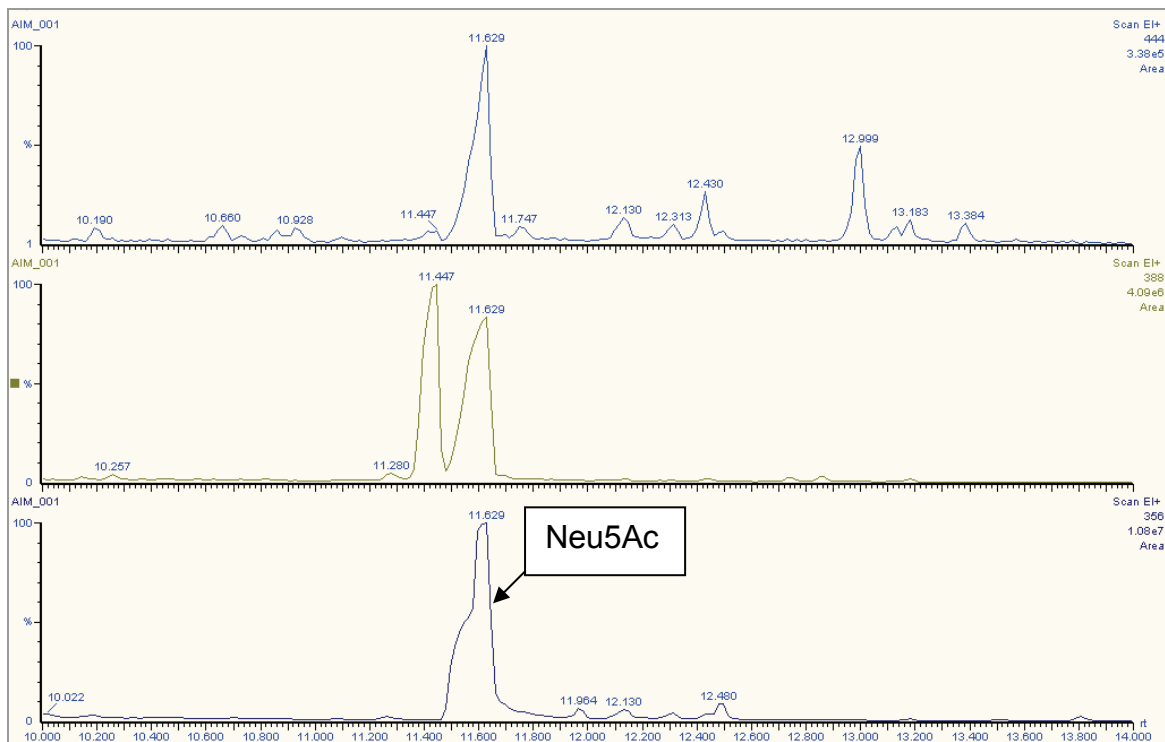


Abb.26 Gaschromatogramm der gefällten Proteine des AIMV-Mediums nach Säurehydrolyse und Derivatisierung mit TMSI sowie *scanning* nach den Ionen  $m/z$  356, 388 und 444 mit der MassLab-Software.

Trotz eines Signals bei 13.384 bzw. 13.183 min kann man die Anwesenheit von Neu5Gc durch das Fehlen des zweitstärksten Ions mit  $m/z$  388 sowie durch eine von der Messung der Standards hinreichend abweichende Retentionszeitdifferenz von 1.855 min bzw. 1.654 min zwischen dem Neu5Ac-Signal und den fraglichen Signalen nach 13 min ausschließen. Ein vergleichbares Resultat ergibt sich bei den in Abbildung 27 dargestellten Resultaten der Analyse von Proteinen des Humanserums.

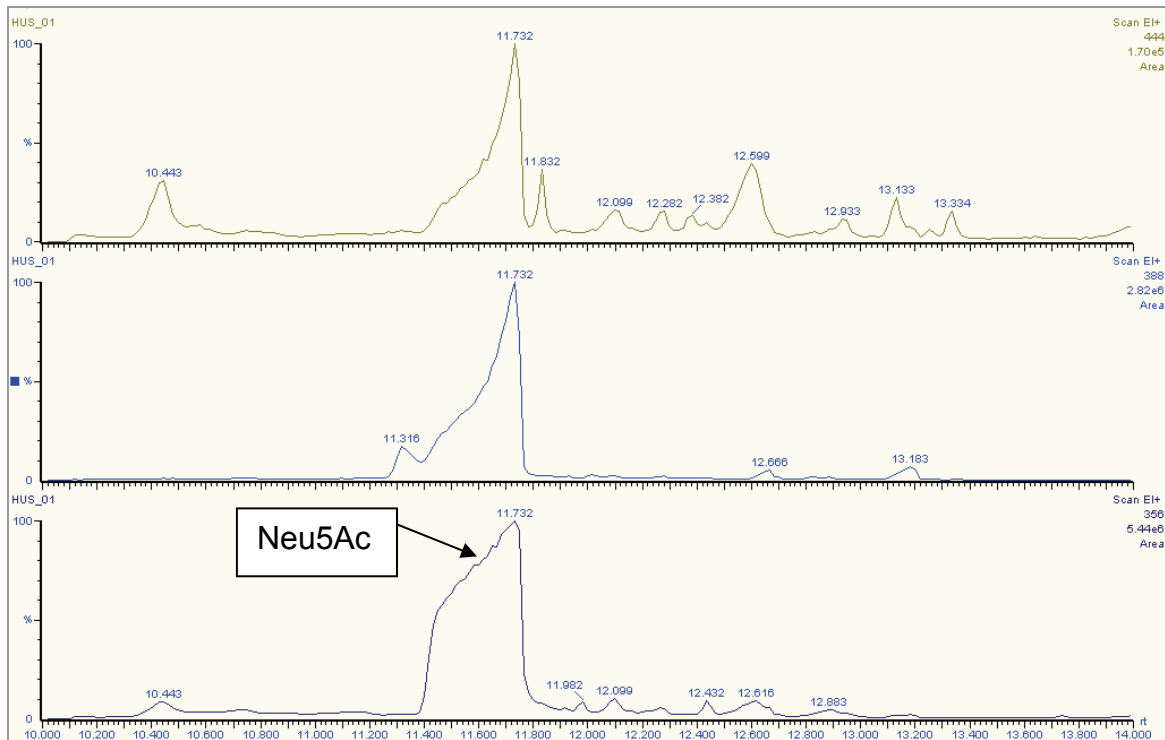


Abb. 27 Gaschromatogramm der gefällten Proteine von Humanserum nach Säurehydrolyse und Derivatisierung mit TMSI sowie *scanning* nach den Ionen  $m/z$  356, 388 und 444 mit der MassLab-Software.

Hier sehen wir beim *scanning* nach dem Ion  $m/z$  444 wieder ein Signal bei 13.334 min, das jedoch nicht in einer passenden Retentionszeitdifferenz zum Neu5Ac-Molekül bei 11.732 min steht. Darüber hinaus fehlt ein entsprechendes Signal für den *scan* nach dem Ion  $m/z$  388.

Als Positivkontrolle dient eine Probe mit RPMI, das 10% FCS enthält. RPMI selbst kann gemäß der Liste der Komponenten keine Sialinsäuren enthalten, da es nur aus Salzen, Aminosäuren und Vitaminen sowie Phenolrot besteht. Vorhandene Sialinsäuren müssen also aus dem FCS stammen. Abbildung 28 zeigt das Chromatogramm mit dem *scanning* nach den für Neu5Gc charakteristischen Ionen mit  $m/z$  388 bzw. 444. Die Qualität des Chromatogramms ist durch das verzerrte Signal der Neu5Ac im Bereich von 11.6 min beeinträchtigt; in dem um 13.37 min liegenden Signal läßt sich dennoch eindeutig Neu5Gc nachweisen, denn im Massenspektrum finden sich die für Neu5Gc charakteristischen Ionen B, C, D und F aus Tab. 14. Das Signal bei 13.266 min repräsentiert ebenfalls eine Neu5Gc – kenntlich durch die Ionen D und F –, doch die Ionen B und D weisen ein um 44 Einheiten vermindertes Masse-zu-Ladungsverhältnis auf.

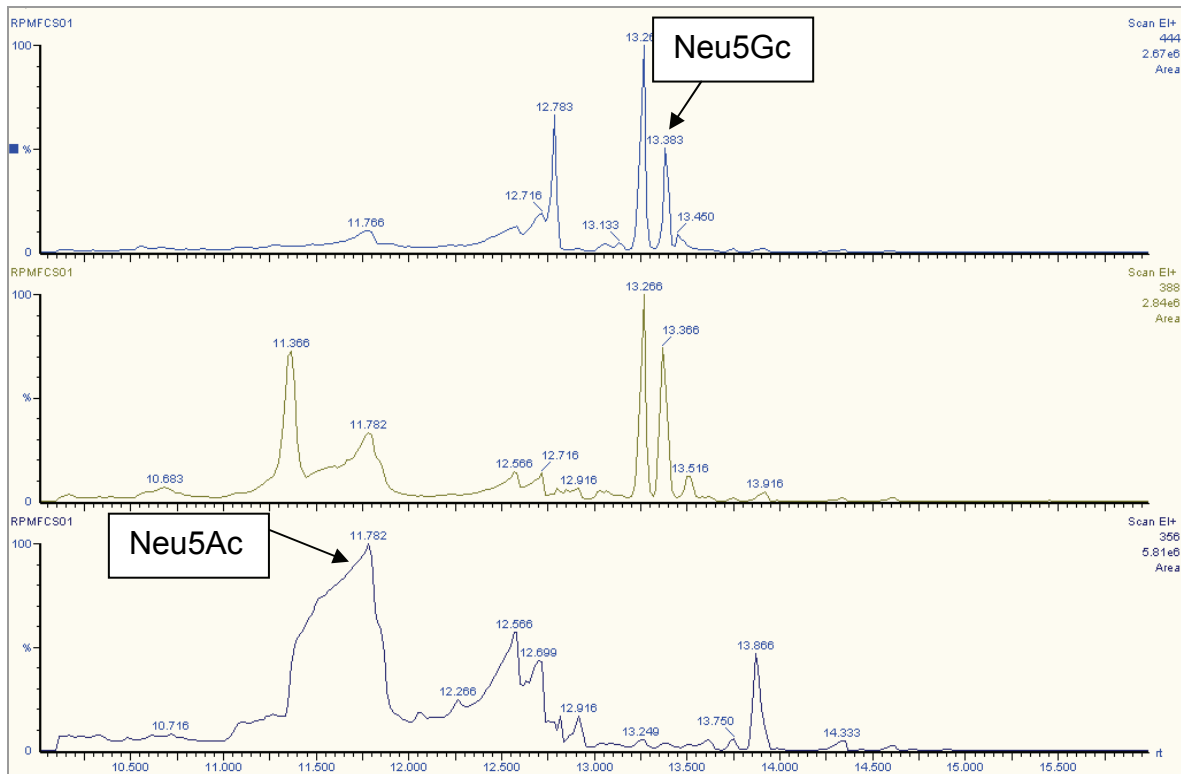


Abb. 28 GC/MS der gefällten Proteine aus RPMI-Medium mit 10% FCS nach Säurehydrolyse und Derivatisierung mit TMSI. Ionenspuren bei m/z 356, 388 und 444.

### 3.1.1.4 Neu5Gc-Gehalt in T-47D-Zellen und FCS-Anteil des Zellkulturmediums

Bei Steigerung des AIMV-Gehaltes im Zellkulturmedium ergibt sich für die Neu5Gc-Expression in T-47D-Zellen der in Abbildung 29 gezeigte Verlauf.

Nach vollständiger Umstellung der Zellkultur auf tiereserumfreie Bedingungen (AIM V oder Humanserum) pendelte sich der Neu5Gc-Gehalt auf einen Mittelwert von 0,4% ein (vgl. Abbildung 29). Gründe für die beobachtete Schwankungsbreite des Neu5Gc-Gehaltes von bis zu 70% werden in der Diskussion (Abschnitt 4.3) erörtert.

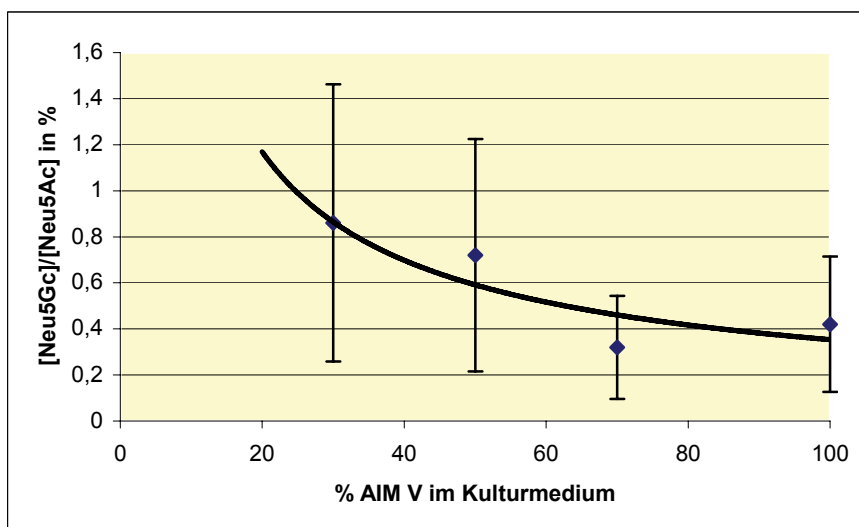


Abb. 29 Abhängigkeit des Neu5Gc-Gehaltes in T-47D-Zellen vom FCS-Anteil im Zellkulturmedium.

Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus mehreren Analysen.



Ausgehend von der Etablierung einer robusten Analyseverfahren und der Beseitigung exogener Neu5Gc-Quellen konnte nun zur Analyse der Membranfraktion von T-47D-Zellen übergegangen werden.

### 3.1.1.5 Ergebnisse der Sialinsäureanalysen von Krebszelllinien

Bei der Analyse tierserumfrei gezogener Krebszelllinien zeigte sich ein stark schwankender Neu5Gc-Gehalt. Nur ein Teil der serumfrei gezogenen Zellansätze enthielt Neu5Gc, wobei dieses Fehlen nicht mit der Länge der serumfreien Zellkultur korrelierte. Die Ergebnisse der Neu5Gc-Analytik sind in Tabelle 15 zusammengefaßt.

Tab. 15. Zusammenstellung der analysierten Mammakarzinomzellen

	Ansätze ohne Serum	Anteil der Ansätze mit Neu5Gc-Detektion (%)
MDA-MB-231	36	5 (13,9)
T-47D	25	11 (44)
ZR-75-1	14	2 (14,3)

In T-47D-Zellen ließ sich Neu5Gc am häufigsten identifizieren, es wurde in etwas weniger als der Hälfte der serumfrei gezogenen Zellansätze detektiert. Der Mittelwert des Verhältnisses von Neu5Gc und NeuAc entsprach 0,4%. Zur Errechnung dieses Wertes wurden Proben verwendet, die nach der Reduktion des Anteils von Tierserum wenigstens für eine Woche serumfrei gezogen worden waren. Gemäß der Literatur (Tangvoranuntakul et al. 2003) sollte diese Zeit ausreichen, um exogene Neu5Gc im zellulären Pool ausschließen zu können.

Zu Beginn der Arbeit wurden in T-47D-Zellkulturen, die in einem Zeitraum von 4 – 10 Wochen serumfrei gezogen worden waren, extrem hohe Neu5Gc-werte gemessen. Sie bewegten sich zwischen 11 und 16% (Abb. 30). Die Schwankung zwischen diesen anschließend in dieser Höhe nicht mehr festgestellten Neu5Gc-Gehalten und den späteren Werten ist Thema der Diskussion (Abschnitt 4.3).

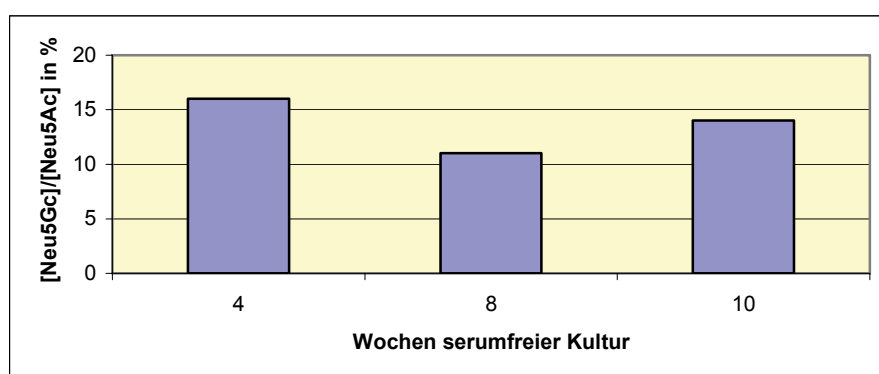


Abb. 30. Prozentanteile von Neu5Gc im Verhältnis zum Neu5Ac-Anteil über 4 – 10 Wochen tierserumfreier Kultur.

In etwa einem Siebtel der MDA-MB-231 und ZR-75-1 Zellproben konnte Neu5Gc gefunden werden. Hierbei hatten ZR-75-1-Zellen mit 1,65 % einen vierfach höheren und MDA-MB-231 einen zweifach höheren Neu5Gc-Anteil als T-47D-Zellen. Eine Weiterverwendung der ZR-75-1- und der MDA-MB-231-Zellen für die Untersuchungen über mögliche endogene Neu5Gc-Biosynthesewege verbot sich jedoch wegen des geringen Anteils der Neu5Gc-haltigen Zellansätze an der Gesamtzahl der untersuchten Proben. Da die T-47D-Analysen den größten Anteil mit Neu5Gc-positiven Proben hatten, wurden sie exemplarisch für die weitere Untersuchung der Neu5Gc-Biosynthese verwendet.

Im Fall der Lungenkarzinomzelllinie STAV-AB konnte keine Neu5Gc detektiert werden; dies steht im krassen Widerspruch zu den Ergebnissen von Tzanakakis *et al.* (s. hierzu die Diskussion, Abschnitt 4.2).

MCF-7-Zellen erwiesen sich insgesamt durchgehend als Neu5Gc-frei und konnten so als Negativkontrolle in der Sialinsäureanalytik eingesetzt werden. Auf einen Einsatz von HMEC als Negativkontrolle wurde wegen ihrer beschränkten Lebensdauer und des langsamen Wachstums verzichtet, die Abwesenheit von Neu5Gc in normalen Zellen ist in der Literatur darüber hinaus gut dokumentiert (z.B., Varki 2001). Wegen der Verwendung von BPE in dem verwendeten Zellkulturprotokoll des Distributors ließ sich in HMEC Neu5Gc mit einem Anteil von 1% an der Neu5Ac-Menge detektieren.

### **3.1.1.6 Sialinsäureanalyse mit HPLC**

Wie bei allen rein chromatographischen Verfahren kann auch in der HPLC eine Identifikation von Analyten nur über den Vergleich der Retentionszeiten erfolgen. In der vorliegenden Arbeit sollte exemplarisch ein in der Literatur verwendetes HPLC-Protokoll für die Trennung von Neu5Ac und Neu5Gc reproduziert (Abb. 31) und mit dem Ergebnis der GC/MS verglichen werden.

Die HPLC-Chromatogramme (Abbildungen 30 und 31) zeigen eine Trennung von Neu5Ac und Neu5Gc. Bei Vergleich mehrerer Standardläufe (Abbildung 31) fällt auf, daß die Retentionszeiten eines authentischen Neu5Gc bzw. Neu5Ac-Standards stark schwanken können.

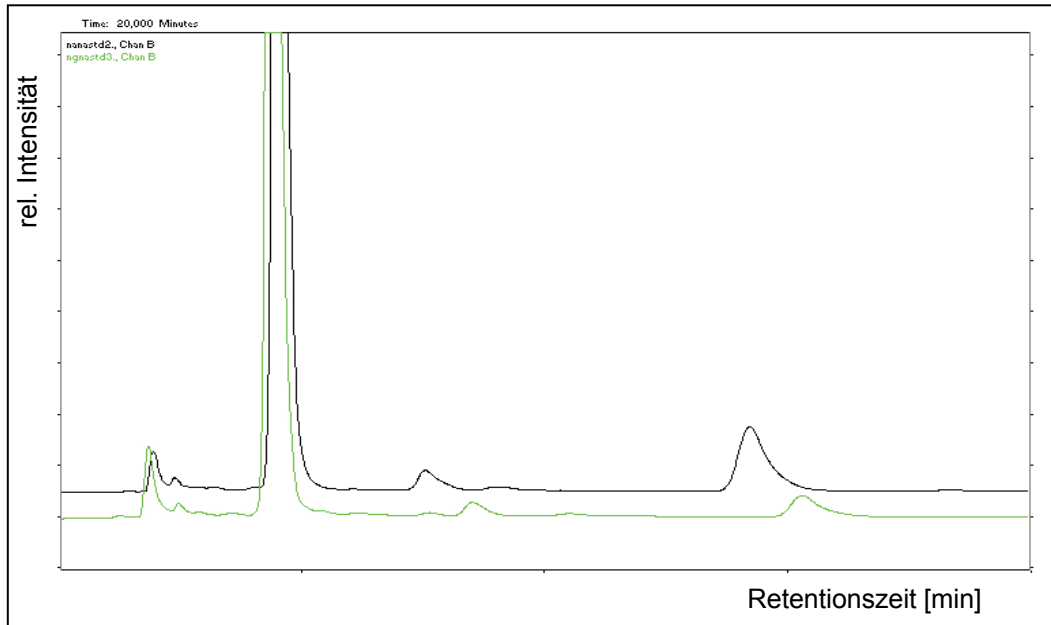


Abb. 31 HPLC mit Fluoreszenzdetektion von Neu5Ac (schwarzer Graph) und Neu5Gc (grüner Graph) als Standardsubstanzen im Vergleich

Eine rein chromatographische Identifikation von Substanzen in einem Gemisch mit mehreren Komponenten wie z.B. einem Membranhydrolysat wäre somit kaum möglich. Von einer weiteren Verwendung der HPLC-Analytik für die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit wurde daher Abstand genommen.

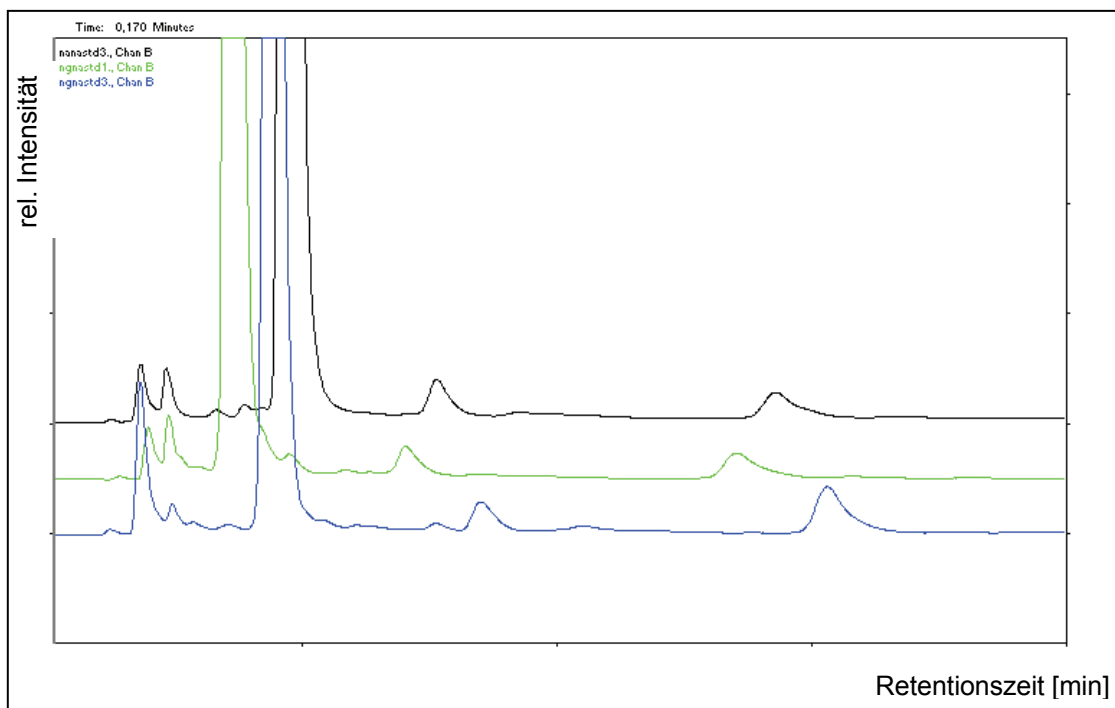


Abb. 32 HPLC mit Fluoreszenzdetektion von Neu5Gc als Standardsubstanz in mehreren aufeinander folgenden chromatographischen Läufen

### 3.2 Ergebnisse der Synthesen

Um Glycolyl-CoA als mögliche Quelle der endogenen Neu5Gc-Synthese identifizieren zu können, mußte dieses für die anstehenden enzymatischen Untersuchungen synthetisiert werden.

#### 3.2.1 Synthese von 1,3-Dioxolan-2,4-Dion

Erstes Ziel bei den Synthesen von Glycolyl-CoA sowie der Glycolylhexosamine war es, das 1,3-Dioxolan-2,4-Dion herzustellen, das in der Lage ist, mit der Thiolgruppe des CoA oder der Aminogruppe des Glucosamin zu reagieren. Das 1,3-Dioxolan-2,4-Dion besitzt keine acidischen Wasserstoffatome, seine Identität konnte also durch direkte Injektion des Syntheseproduktes in die GC/MS verifiziert werden.

#### 3.2.2 Synthese von *N*-Glycolylglucosamin mit 1,3-Dioxolan-2,4-Dion

Zur Identifikation der Produkte der *N*-Glycolylglucosamin-Synthese wurden GC/MS-Analysen mit den Acetylhexosaminen zum Vergleich herangezogen. *N*-Acetylglucosamin eluiert im chromatographischen Lauf nach dem *N*-Acetylmannosamin, ähnliches war also auch für die Glycolylhexosamine zu erwarten. Als charakteristische Massenspur der Glycolylhexosamine in der GC/MS-Analytik wurde das Ion mit  $m/z$  261 verwendet, das dem unten dargestellten Fragment (Abbildung 32) entspricht. Dieses Ion wird aus dem Kohlenstoffatom gebildet, das die Glycolylamidogruppe trägt, sowie aus dem folgenden dritten Kohlenstoffatom des Hexoseringes mit der zugehörigen Hydroxygruppe als TMS-Derivat. Dieses Signal war auch schon im Massenspektrum von Neu5Gc zu finden (vgl.Tab. 14, Fragment G).

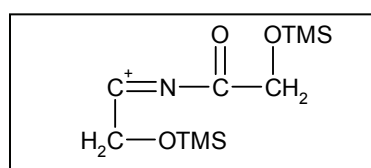


Abb. 33. Vermutete Struktur des Fragments  $m/z$  261 der Glycolylhexosamine

Das ionenspezifische Chromatogramm des Reaktionsproduktes von Glucosamin mit 1,3-Dioxolan-2,4-Dion zeigt bei  $m/z$  261 vier größere Signale, die den beiden Anomeren des *N*-Glycolylglucosamin (bezeichnet als Y und Z in Abbildung 33) sowie denen des C2-Epipimers, *N*-Glycolylmannosamins (W und X), entsprechen.

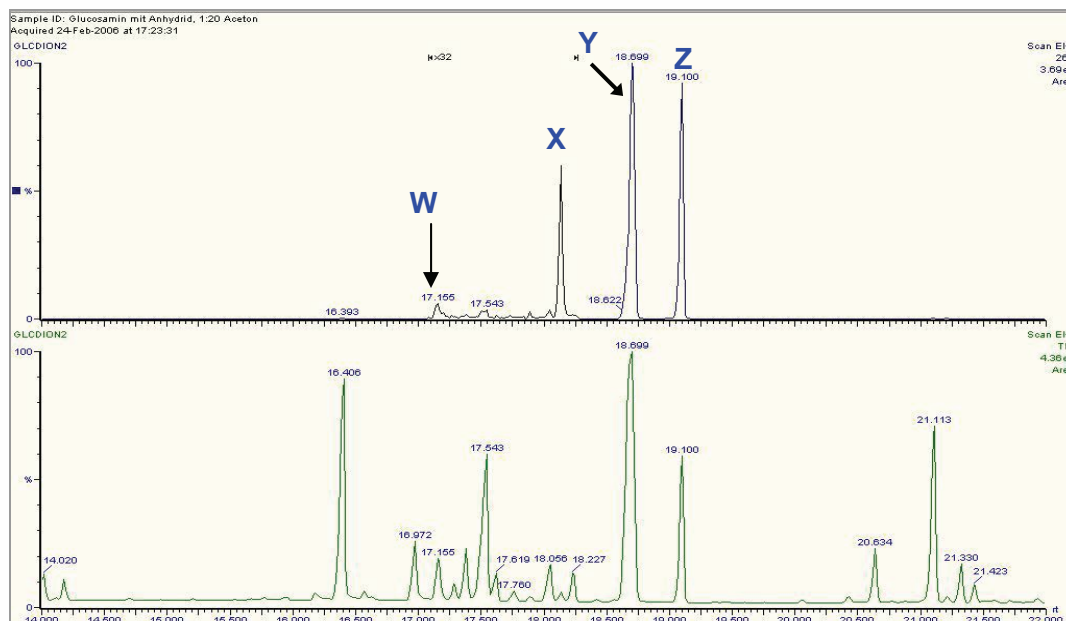


Abb. 34. Chromatogramm des Produktes der *N*-Glycolylglucosamin-Synthese. Unten das Total-Ionen-Chromatogramm, oben das ionenspezifische Chromatogramm bei  $m/z$  261. Zu den Erklärungen der Beschriftungen siehe Text.

### 3.2.3 Synthese von *N*-Glycolylglucosamin mit Acetoxyacetylchlorid

Diese Synthese ergab neben den glycolylierten Hexosaminen die *N*-Acetylglycolylhexosamine. Auch bei diesen eluierte das *N*-Acetylglycolylmannosamin vor dem *N*-Acetylglycolylglucosamin; insgesamt konnte mit dieser Zweitsynthese die Identität des Produkts aus der zuerst dargestellten Synthese bestätigt werden. Abbildung 34 zeigt das Chromatogramm der Produkte. Die Ionenspur bei  $m/z$  582 zeigt Signale bei 17.155 (W) und 17.943 min (X) sowie 18.89 (Y) und 19.312 min (Z). Diese entsprechen den Anomeren von *N*-Glycolylmannosamin (W und X) und *N*-Glycolylglucosamin (Y und Z) und repräsentieren Ionen der Struktur (M-CH<sub>3</sub>), es handelt sich also um Substanzmoleküle, die eine Methylgruppe verloren haben. Die Ionenspur bei  $m/z$  552 zeigt Signale bei 19.393 (G) und 20.262 min (H) sowie 19.515 (K) und 19.862 min (L), die dem *N*-Acetylglycolylmannosamin (G und H) und dem *N*-Acetylglycolylglucosamin (K und L) entsprechen; es handelt sich wieder um Ionen der Struktur (M-CH<sub>3</sub>).

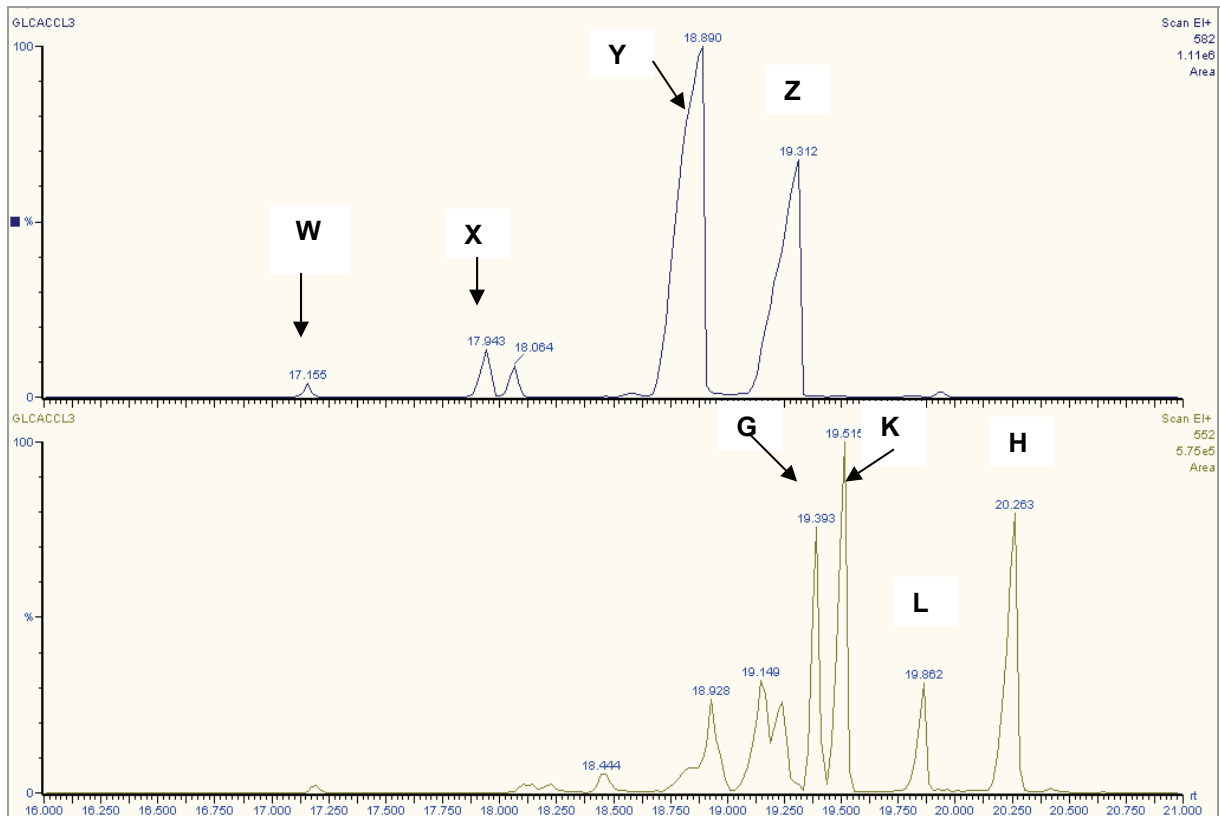


Abb. 35. Chromatogramm des Produktes der *N*-Glycolylglucosamin-Synthese mit Acetoxyacetylchlorid. Unten die Ionenspur bei  $m/z$  552, oben die Ionenspur bei  $m/z$  582. Zu den Erklärungen der Beschriftungen siehe Text.

### 3.2.4 Synthese von Glycolyl-CoA

Die Masse des Glycolyl-CoA (825,9 Da) überstieg die Kapazitäten des GC/MS-Gerätes, zu seiner Identifikation mußte daher auf MALDI-TOF-MS zurückgegriffen werden. Das Massenspektrum des Glycolyl-CoA (Abbildung 35) zeigte neben dem Hauptprodukt Kaliumaddukte in großer Menge (+39 Da), die auf die Synthesebedingungen mit dem Zusatz von Kaliumhydrogencarbonat zurückgehen.

Ein ähnliches Bild lieferte die Analyse der Glycolyl-Synthese mit PDH und Hydroxypyruvat.

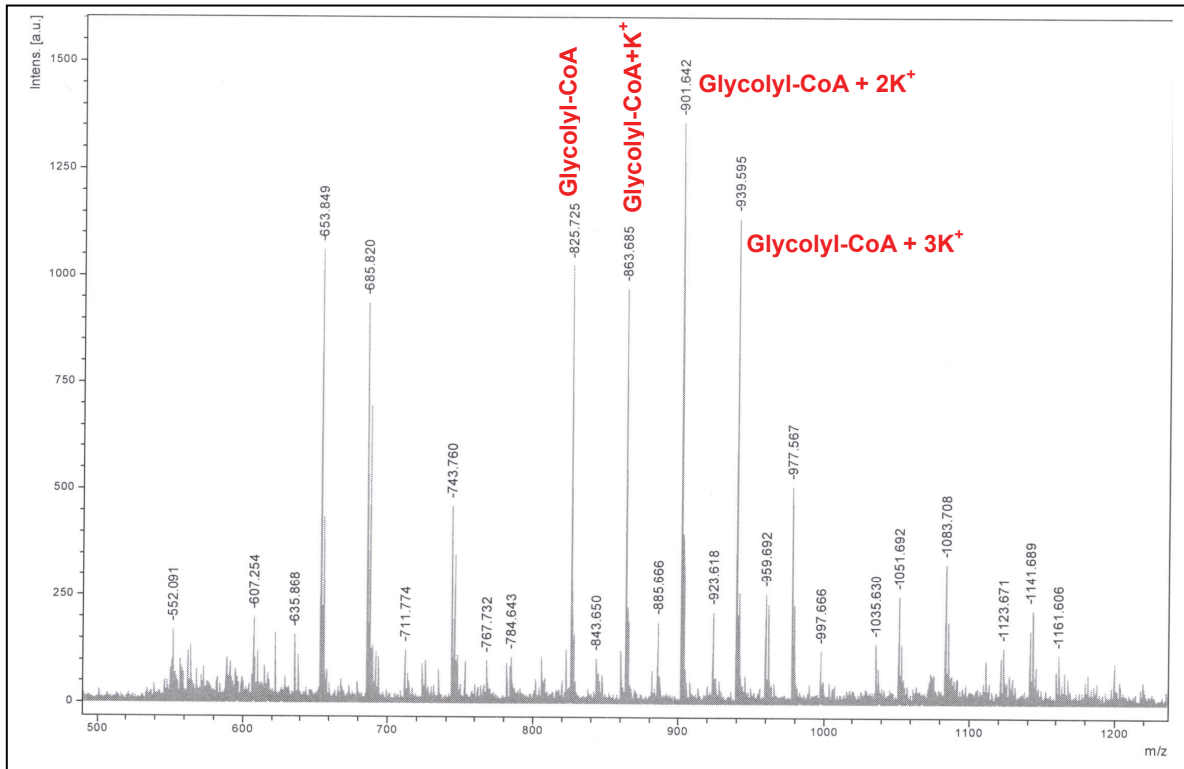


Abb. 36. Massenspektrum des Produkts der Glycolyl-CoA-Synthese

### 3.3 Enzymatische Ansätze

#### 3.3.1 Enzymatische Umsetzung von Hydroxypyruvat zu Glycolyl-CoA mit PDH.

Um zu prüfen, ob Hydroxypyruvat eine Quelle für Glycolyl-CoA sein könnte, wurde ein enzymatischer Ansatz aus Hydroxypyruvat und kommerziell erhältlicher PDH erstellt. Die Bildung von Glycolyl-CoA wurde photometrisch verfolgt (Abbildung 36). Die Positivkontrolle mit Pyruvat ergibt einen identischen Reaktionsverlauf. Von einer Aufreinigung des Glycolyl-CoA aus diesem Ansatz wurde wegen der Schwierigkeit der Abtrennung von Glycolyl-CoA von Glycerol Abstand genommen; die chemische Synthese erwies sich als weitaus einfacher und hinsichtlich der Ausbeute überlegen.

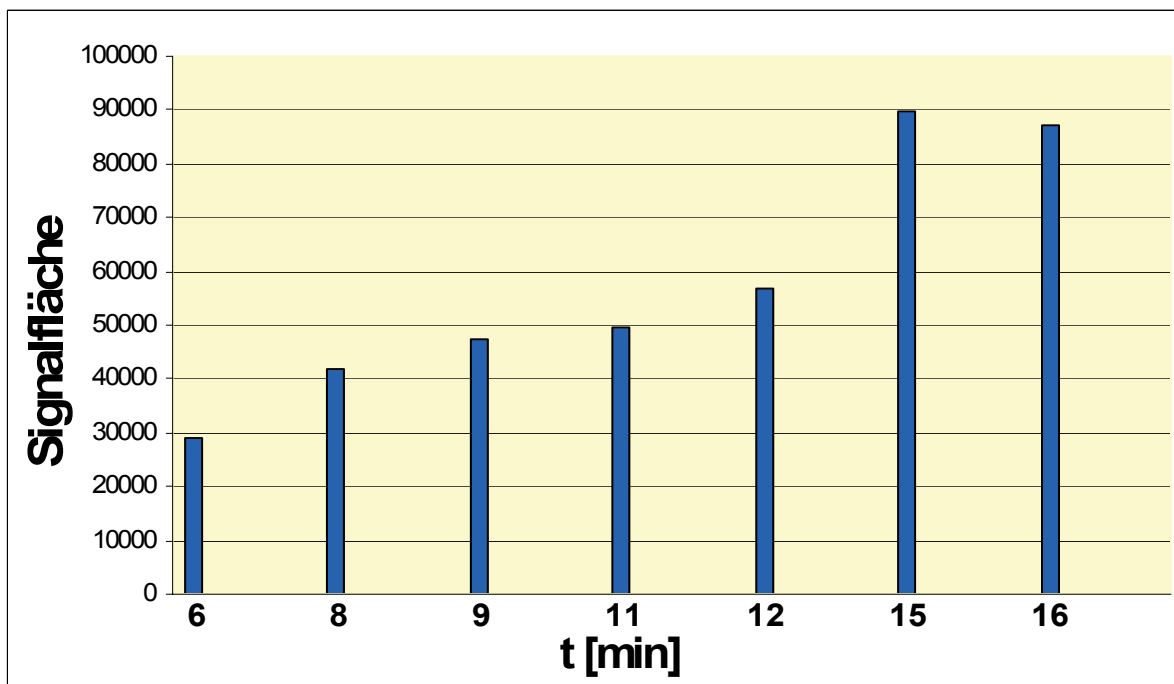


Abb. 37. Kinetik der Reaktion von Lithiumhydroxypyruvat mit PDH aus Schweineherz

### 3.3.2 Enzymatische Umsetzung von Glycolyl-CoA und Glucosamin zu *N*-Glycolylglucosamin

Einer der Schlüsselschritte der endogenen Synthese von Neu5Gc ist die Übertragung eines Glycolylrestes auf den Glucosaminring durch cytosolische Acyltransferasen. Es war daher entscheidend, die Bildung von *N*-Glycolylglucosamin durch chemische Identifikation sicherzustellen und die Kinetik der enzymatischen Synthese zu verfolgen.

Die folgenden Abbildungen (Abbildungen 37 und 38) zeigen die Gaschromatogramme von Aliquots der Enzymsätze nach verschiedenen Zeiten. Neben einer Zunahme des *N*-Glycolylglucosamins kann auch die Bildung von *N*-Glycolylmannosamin beobachtet werden. Das Auftreten von beta- und alpha-Anomeren erklärt sich durch Mutarotation unter den Bedingungen der Analyse.



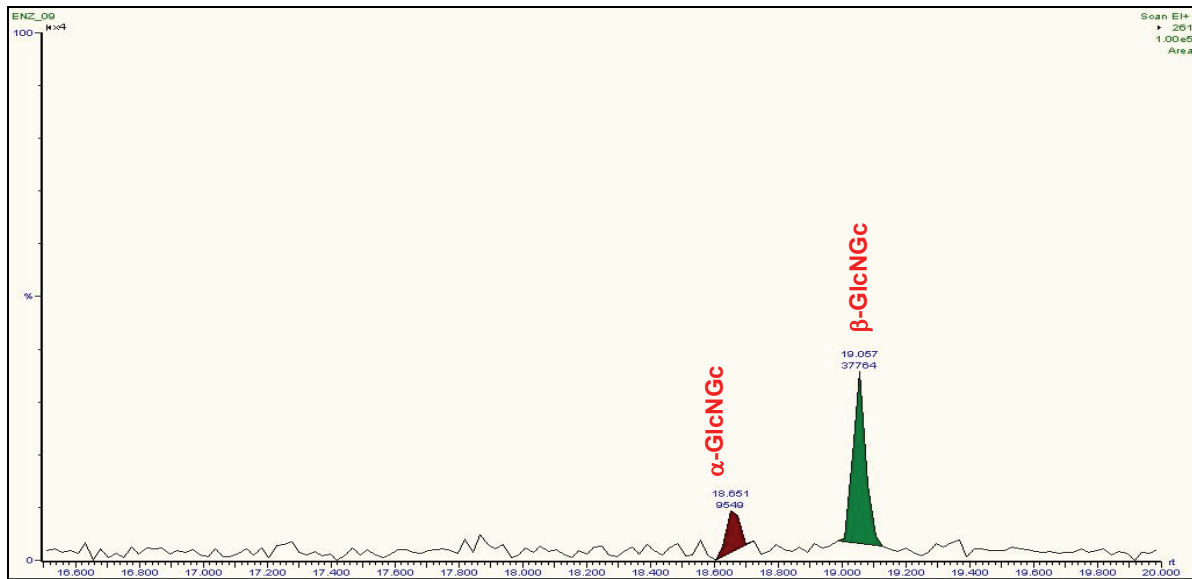


Abb. 38. Total-Ionen-Chromatogramm der Fraktion 6 des Acyltransferaseansatzes

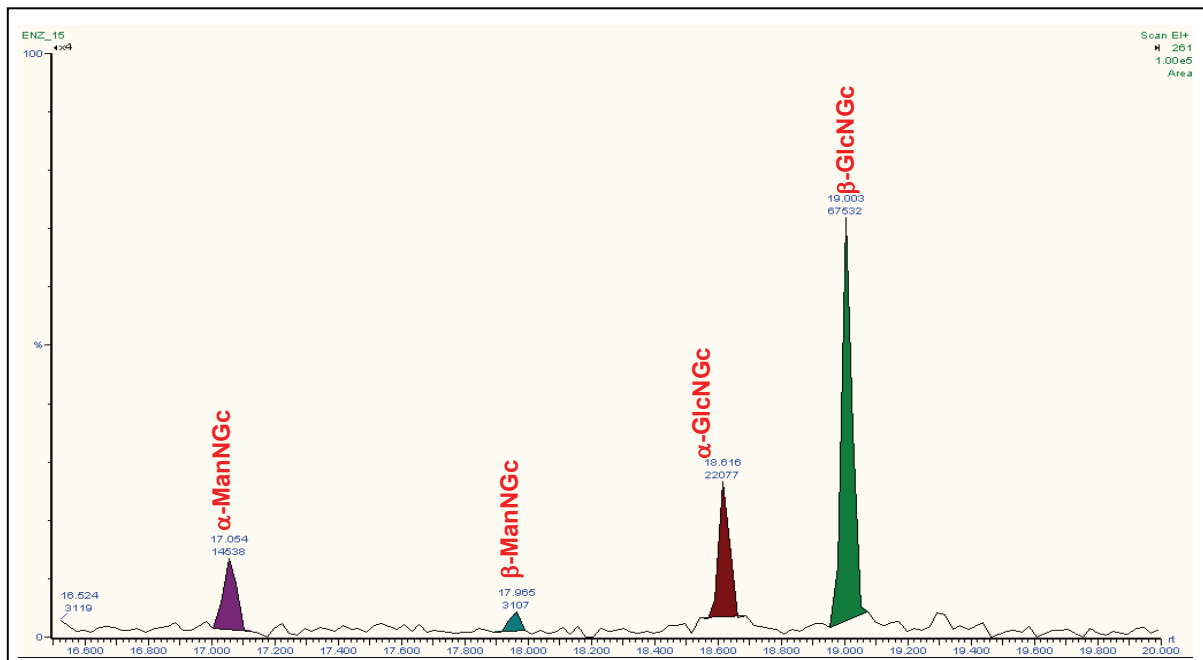


Abb. 39. Total-Ionen-Chromatogramm der Fraktion 15 des Acyltransferaseansatzes

Trägt man die Integrationsflächen der *N*-Glycolylglucosamin-Signale aus den einzelnen Proben des Transferase-Ansatzes gegen die Reaktionszeit auf, erhält man den in Abbildung 39 dargestellten Graphen.

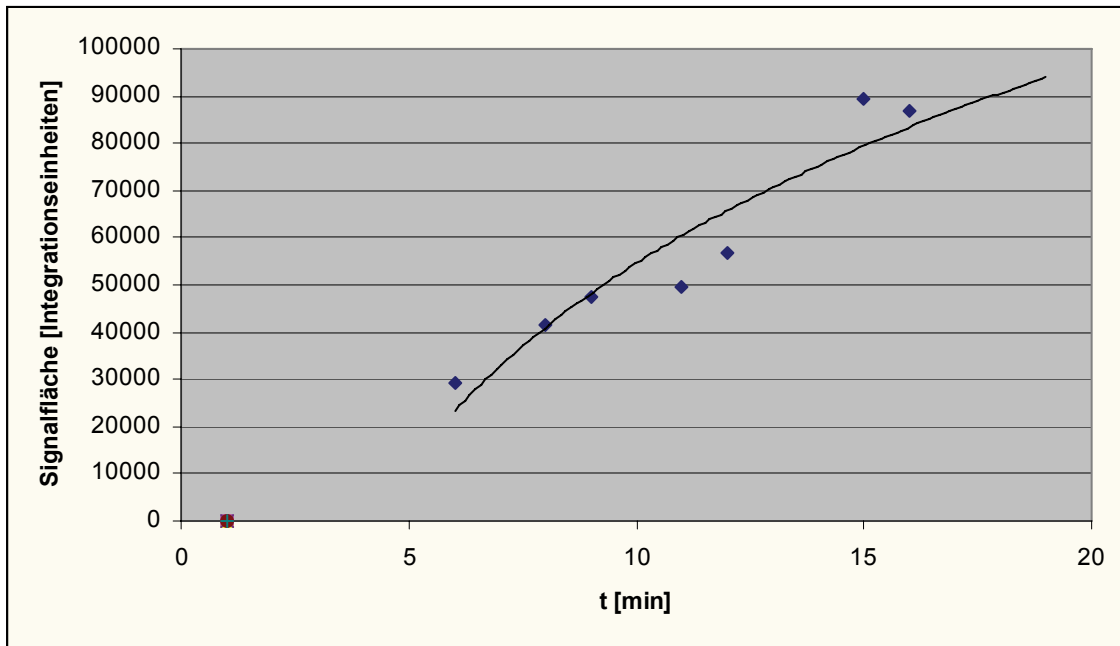


Abb. 40. Abhängigkeit der Fläche des Glycolylglucosaminsignals von der Zeit

### 3.4 GABA und das Auftreten von Neu5Gc

#### 3.4.1 Fütterungsversuche mit GABA und d6-GABA

Beide Fütterungsversuche brachten keine signifikanten Ergebnisse. Insbesondere war es nach Zusatz von d6-GABA zum Medium nicht möglich, eine NeuGc-Spezies zu detektieren, deren Masse aufgrund der mit zwei Deuteriumatomen substituierten Glycolylgruppe um 2 Da erhöht war.

#### 3.4.2. 4-<sup>14</sup>C-GABA

Wie in der Einleitung beschrieben (s.o. Abschnitt 1.3.4), kann ein erhöhtes Angebot an GABA in Krebszellen als eine Ausgangssubstanz für endogen gebildete Neu5Gc angesehen werden. Der Nachweis endogen gebildeter Neu5Gc in Zellen, die mit radiomarkierter GABA gefüttert worden waren, wurde durch Dünnschichtchromatographie kombiniert mit Autoradiographie erbracht.

Die folgende Abbildung 40 zeigt zwei Autoradiogramme des auf Kieselgel-Dünnschichtplatten chromatographierten Zellextraktes im Vergleich mit dem Chromatogramm der Standardsubstanzen, deren Substanzflecken mit Orcinol sichtbar gemacht wurden.

Auf den Filmen des Autoradiogramms sind deutlich zwei Signale zu sehen, deren Rf-Werte denen des Neu5Gc-Standards entspricht, der links auf der

Chromatographieplatte abgebildet ist. Im Vergleich dazu weist das Signal der Neu5Ac auf der Chromatographieplatte einen höheren Rf-Wert auf.

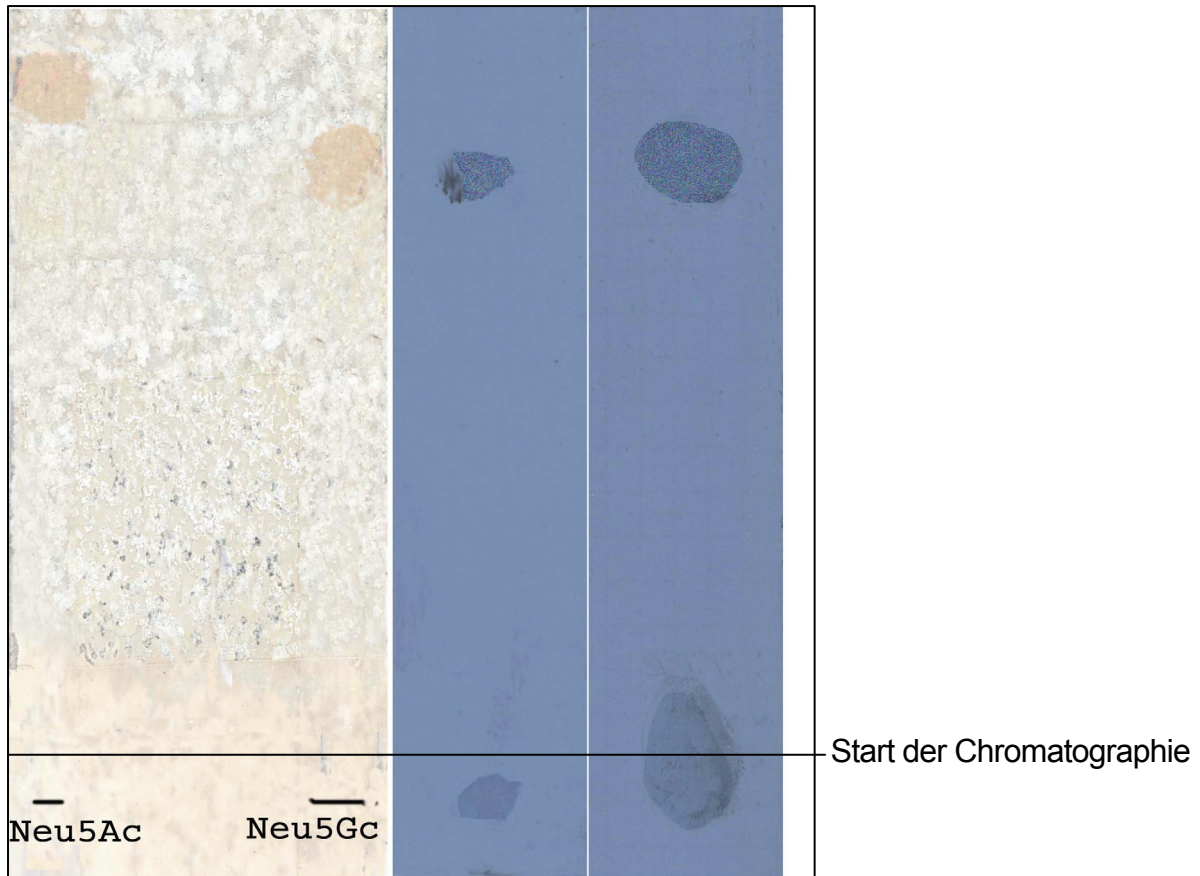


Abb. 41 Dünnschichtchromatographie von Neu5Ac und Neu5Gc sowie von zwei Ansätzen des Zelllysates von T-47D-Zellen (nach  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -GABA-Fütterung) auf Silicagel 60 mit Laufmittel A.

Dieser Befund deutet darauf hin, daß ein Biosyntheseweg vom GABA über Glycolyl-CoA und GlcNGc (s.o., 3.3.2) zu Neu5Gc existieren könnte. Eine weitere Untermauerung dieser Hypothese sollte durch die Expressionsanalysen erfolgen, die in Abschnitt 3.6 dargestellt werden.

Die anderen Laufmittel lieferten Chromatogramme, in denen Neu5Ac und Neu5Gc nicht oder nur sehr schwach getrennt waren. Sie kamen daher nicht für die DC-Analytik der Sialinsäuren zum Einsatz.

### 3.5 Konfokalmikroskopie

Hier sollte überprüft werden, ob der in der Literatur (Devine et al. 1991) als Neu5Gc-spezifisch beschriebene Antikörper 3E1.2 auch bei einem Neu5Gc-Gehalt der Membranfraktion von etwa 1 % noch eine Reaktion mit der Zelloberfläche zeigt. In der konfokalen Laser-Mikroskopie zeigten HMEC keine über den Untergrund hinausgehende Fluoreszenzfärbung (Abbildung 41). Aufgrund von Kontrollansätzen

ist eine diffuse Reaktion des sekundären Antikörpers mit der Zellmembran gegeben. Im Unterschied hierzu findet man bei den mit FCS gezogenen Zellen eine deutliche Reaktion mit präzisen Konturen (Abbildung 42).

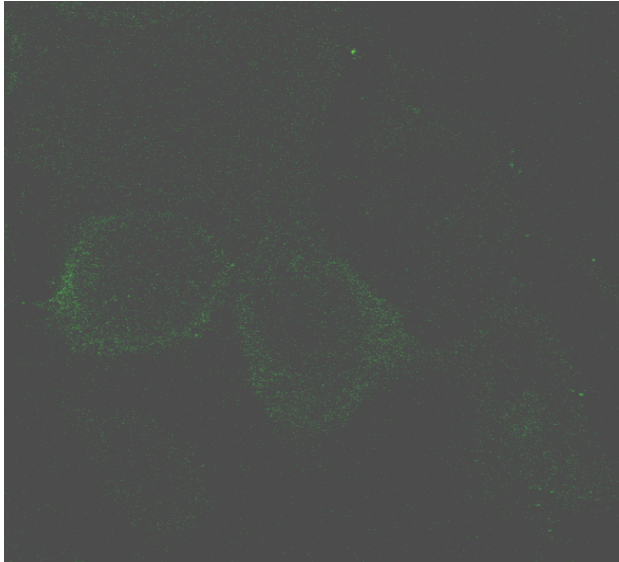


Abb. 42. Konfokalmikroskopie von HMEC gefärbt mit dem primären Antikörper 3E1.2 und dem sekundären Antikörper Alexa488

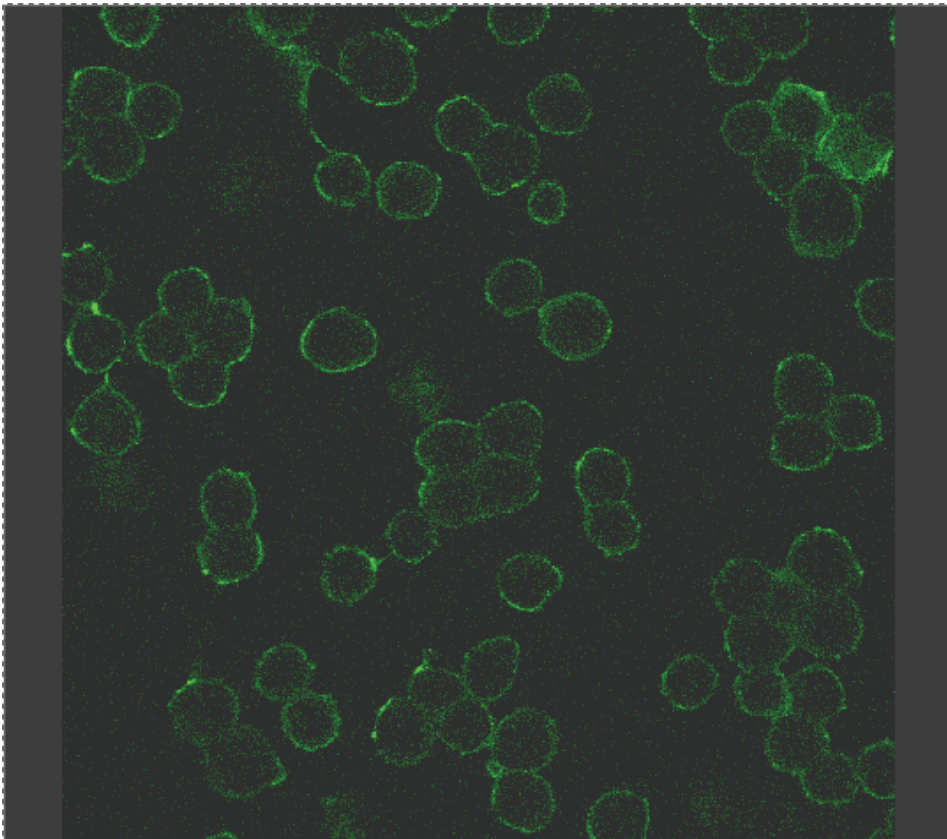


Abb. 43. Konfokalmikroskopie von T-47D-Zellen, gezogen in FCS-haltigem Medium, gefärbt mit dem primären Antikörper 3E1.2 und dem sekundären Antikörper Alexa488

Aufgrund der geringen Empfindlichkeit der Immunodetektion wurde von einem weiteren Einsatz des 3E1.2-Antikörpers bei der Neu5Gc-Analytik abgesehen.

### **3.6 Transkriptomanalyse: *microarray*-Daten und Validierung durch qrt-PCR**

In einer differentiellen, *microarray*-gestützten Transkriptomanalyse sollte die Genexpression der Enzyme untersucht werden, die an der endogenen Neu5Gc-Synthese beteiligt und in den Karzinomzellen heraufreguliert sein können. (Abschnitt 3.6.1). Die so gewonnenen Ergebnisse wurden für ausgewählte Gene in einem unabhängigen Verfahren mit der qrt-PCR einer Validierung unterzogen (Abschnitt 3.6.2).

Die bei der *microarray*-Analyse gewonnenen Daten wurden darüber hinaus für ein *data mining* verwendet, in dem die Expression insbesondere solcher Gene verglichen werden sollte, die Membranproteine oder am Kohlenhydratmetabolismus beteiligte Enzyme kodieren, hier insbesondere Glycosyltransferasen (Abschnitt 3.6.3). Dieses *data mining* sollte Hinweise für die Analyse weiterer aberranter Glykosylierungsphänomene geben, die mit der malignen Transformation einhergehen.

#### **3.6.1 *Microarray*-Analyse: Enzyme in postulierten Neu5Gc-Biosynthesewegen**

Trägt man die differentiellen Daten für RNA aus T47-D und HMEC in ein Diagramm der vermuteten Neu5Gc-Biosynthese ein, erhält man das in der Abbildung 43 wiedergegebene Bild. Die *ABAT*-Transkription in T-47D-Zellen ist etwa vierfach gegenüber den HMEC hochreguliert. Auch das Gen der  $\beta$ -Untereinheit der PDH hat ein zweifach erhöhtes Transkriptionsniveau. Die anderen Gene der  $\beta$ -Oxidation kurzkettiger Fettsäuren (*ACADS*, *EHHAD*), der Glucosamin-Acyltransferase (*GPNAT1*) sowie vor allem der Sialyltransferase (*ST3GAL1*, s. Tab. 16) sind dagegen nicht oder nur in einem Umfang hochreguliert, der an der Grenze der Signifikanz für *microarray*-Analysen liegt. Die Expressionsdaten für den hypothetischen Stoffwechselweg von der GABA zur Neu5Gc (s.o., Abschnitt 3.4.2.3) sollten nun in der qrt-PCR validiert werden.

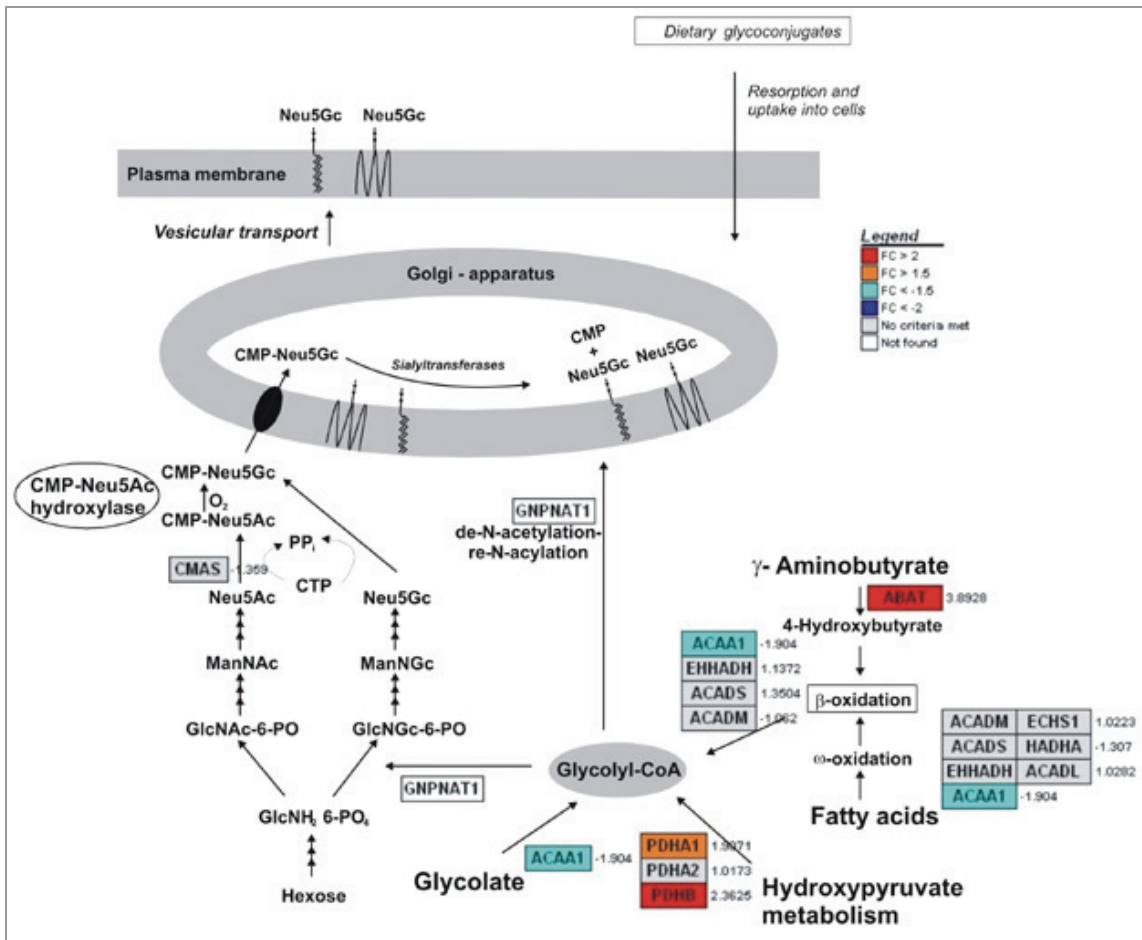


Abb. 44. Stoffwechseldiagramm postulierter Neu5Gc-Biosynthesewege aus den in der Einleitung erwähnten (s.o. Abb. 12) Vorläufersubstanzen GABA,  $\omega$ -hydroxylierte Fettsäuren, Hydroxyypyruvat und Glycolat.

Die folgende Tabelle 16 fasst noch einmal die Expressionswerte der Gene zusammen, deren Produkte am GABA-Katabolismus beteiligt sind.

Name	RefSeq-Nr.	Veränderung des Expressionsniveaus
<i>ABAT</i>	NM_000663	3,89
<i>AKRA</i>	NM_006066	- 1,1
<i>BUCS</i>	AC003034 (NM_052956)	1,22
<i>HADHSC</i>	NM_005327	1,36
<i>EHHADH</i>	NM_001966	1,37
<i>ACADSB</i>	NM_001609	1,5
<i>ACADS</i>	NM_000017	1,35
<i>BDH</i>	BC005844 (NM_004051)	3,34
<i>ST3GAL1</i>	NM_003033	- 1,86

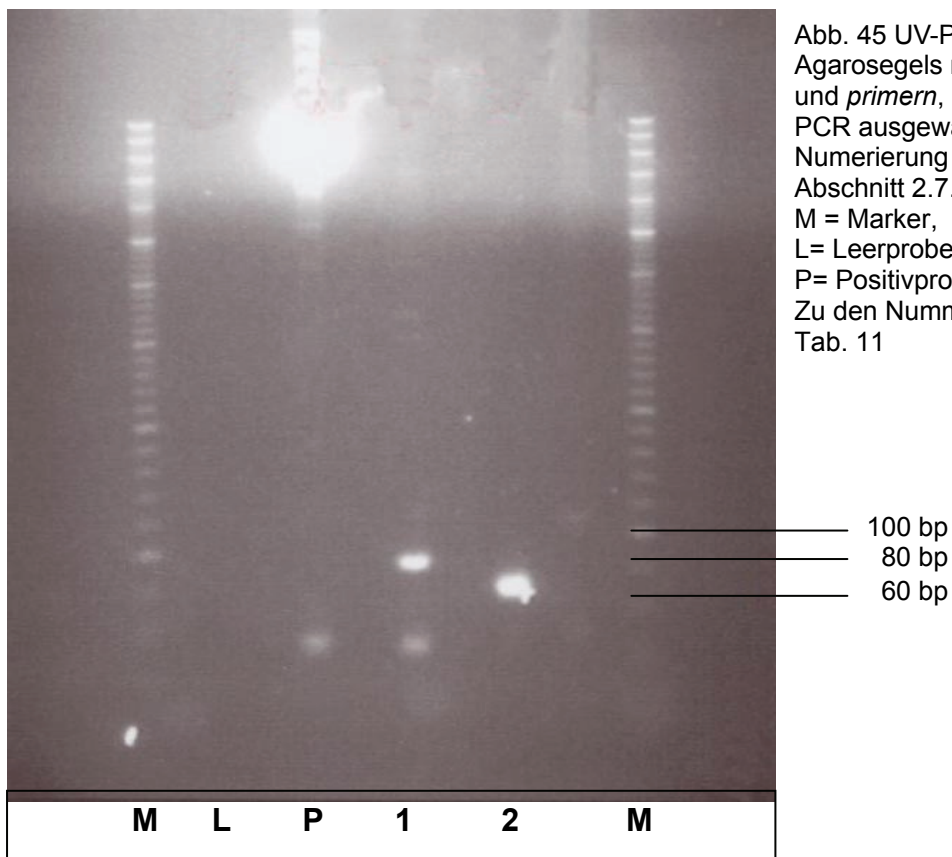
Tab. 16. Regulationsfaktoren der Genexpression (T-47D-Zellen im Vergleich mit HMEC) für Enzyme, die am GABA-Katabolismus bis zur Bildung des Glycolyl-CoA beteiligt sind.



### 3.6.2 *qrt-PCR* der am metabolischen Pfad von der GABA zur Neu5Gc beteiligten Enzyme

#### 3.6.2.1 Validierung der *primer*-Tauglichkeit

Zunächst mußte sichergestellt werden, daß die für die *qrt-PCR* verwendeten *primer* mit der cDNA der entsprechenden Gene hybridisieren konnten. Hierzu wurde eine konventionelle PCR mit *GAPDH* als Positivkontrolle durchgeführt. Abbildung 45 zeigt zunächst das Gelphoto einer konventionellen PCR mit T-47D-cDNA und den *primern* *ABAT* (Bahn 1) und *AKRA* (Bahn 2). Die PCR-Produkte beider *primer* lagen im vorhergesagten Bereich bei 83 bp für *ABAT* und 68 bp für *AKRA*, sie konnten somit für die *qrtPCR* weiter verwendet werden.



Die Abbildung 46 zeigt den PCR-Lauf, der schließlich für die meisten gewählten *primer* positive Ergebnisse mit den für die PCR-Produkte vorhergesagten Längen erbrachte. Der *ST3GAL1\_1-primer* (Bahn 10) führte nicht zu einem positiven Ergebnis, stattdessen wurde dann für die *qrt-PCR* der *ST3GAL1\_2-primer* (Bahn 11) eingesetzt.

Bei allen Ansätzen sieht man eine starke Front aus *primern*, in der im Fall der *ST3GAL1\_2* (Bahn 11) und *ACADS* (Bahn 7) das PCR-Produkt mitläuft (Länge 60

bzw. 66 bp.). Schwächere PCR-Produkte finden sich im Fall der *BUCS* (Bahn 3) und der *EHHAD* (Bahn 5) *primer*. In beiden Gelphotos ist das Produkt des *GAPDH*-*primers* (Bahn P; 950 bp) in großen Mengen vertreten. Der *ST3GAL1\_2* primer führt auch zu längeren PCR-Nebenprodukten, doch können diese in der qrt-PCR nicht entstehen und somit für die weitere Arbeit vernachlässigt werden.

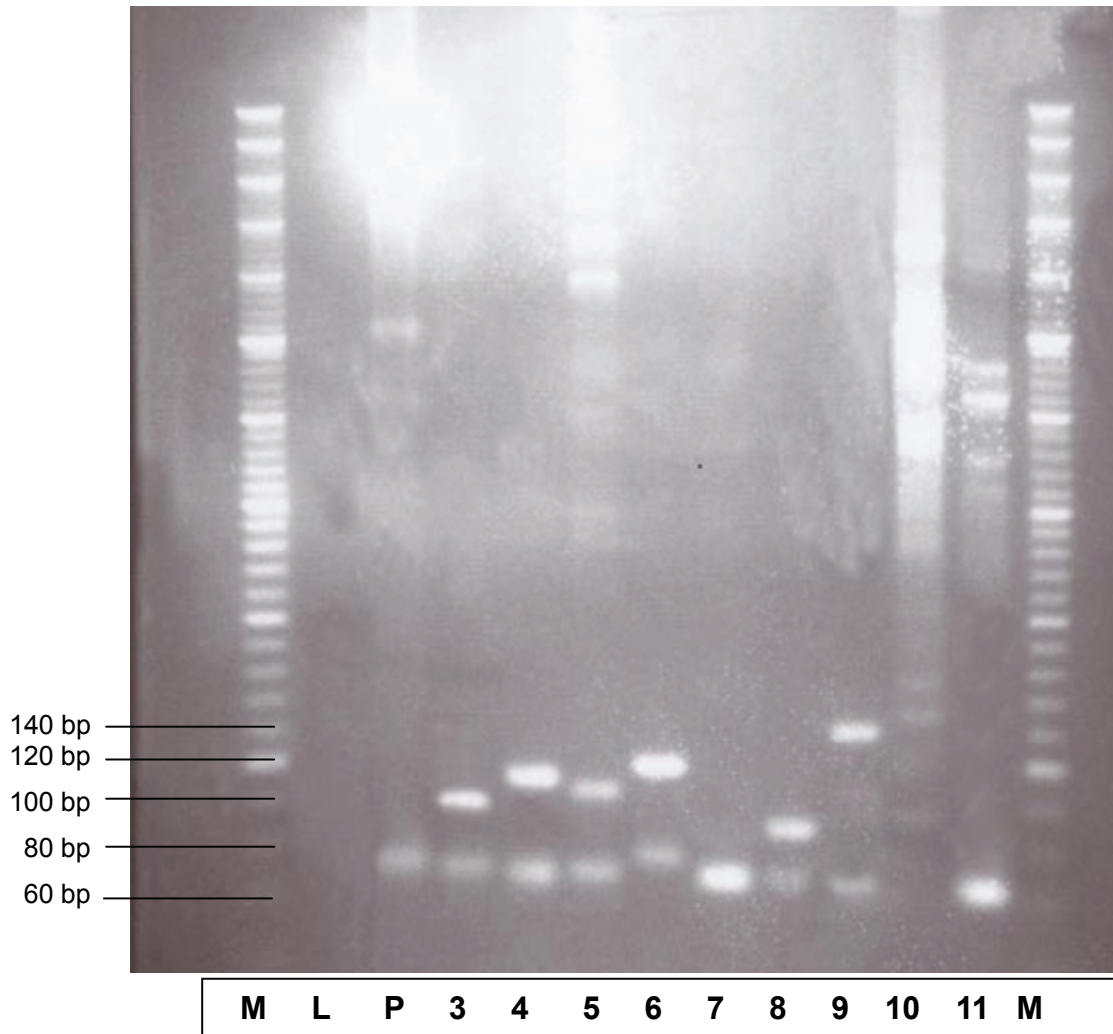


Abb. 46 UV-Photo des Agarosegels mit T-47D-cDNA und *primern*, die für die qrt-PCR ausgewählt wurden. Die Numerierung erfolgte wie in Tabelle 11 angegeben. M, L, P: s. vorhergehende Abb.

### 3.6.2.2 Validierung ausgewählter Ergebnisse der *microarray*-Analyse durch qrt-PCR

Zum Vergleich der Expressionswerte von Genen in verschiedenen Proben wird bei der qrt-PCR als Referenzwert diejenige Anzahl der Zyklen verwendet, die erforderlich ist, um ein vom Hintergrund abgehobenes Fluoreszenzsignal der amplifizierten DNA zu generieren. Dieser Wert wird auch als *Cp*- (*Crossing Point*-) oder *Ct*-Wert bezeichnet (Frank & Bernard 2004). Der *Ct*-Wert hängt selbstverständlich von der Menge der eingesetzten DNA ab. Um Expressionswerte zweier unterschiedlicher



Proben miteinander zu vergleichen, muß daher über die Wahl einer geeigneten Referenz zunächst sichergestellt werden, daß Quantität und Qualität der untersuchten DNA vergleichbar sind.

Bis vor kurzem wurden in vielen Fällen die Gene der GAPDH oder des Actin als Vergleichsgene herangezogen. Insbesondere die Transkription von *GAPDH* als *house keeping*-Gen erwies sich in verschiedenen Arbeiten als konstant (Murphy und Polak 2002). Neure Studien zeigten jedoch (Goidin et al. 2002), daß die Vergleichbarkeit der Genexpression auf der Grundlage dieser Gene keineswegs gegeben ist. Derzeit wird daher das 18s-Fragment der ribosomalen RNA als Vergleichstandard zwischen cDNA-Proben favorisiert (Goidin et al. 2002).

Zunächst wurden Quantität und Qualität der cDNA von T-47D-Zellen und HMEC durch einen qrt-PCR-Lauf mit dem rRNA-*primer* miteinander verglichen. Hierzu wurden Verdünnungsreihen der cDNA beider Zelltypen bis zu einer Verdünnung von  $10^{-7}$  erstellt und der qrt-PCR unterzogen. Die sehr ähnlichen Werte der Fluoreszenz-Detektion zeigten, daß in den gewählten cDNA-Proben volumina vergleichbare Mengen an cDNA vorlagen.

Abb. 47 Abhängigkeit der Ct-Werte in der qrt-PCR mit T-47D-cDNA und dem 18s-rRNA-*primer* von der Verdünnung der cDNA. Die Geradengleichung der Trendlinie lautet  $y = 3,294x + 1,283$

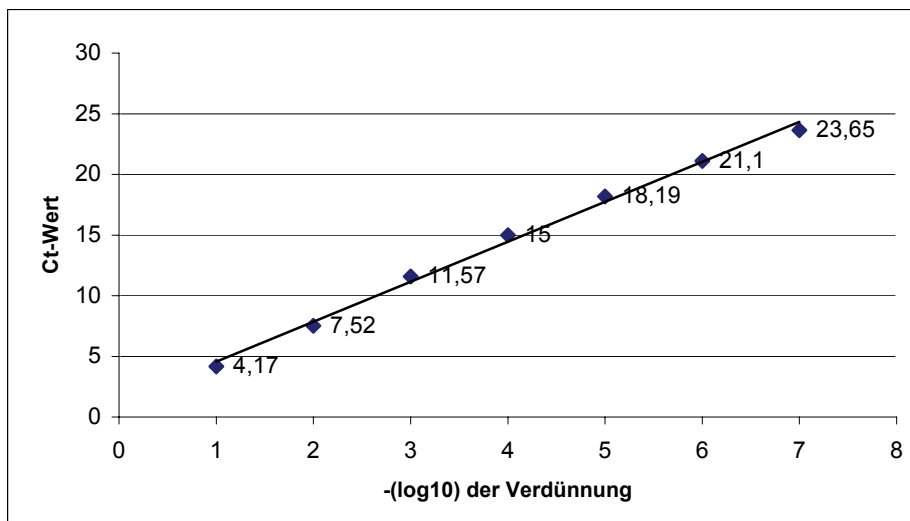
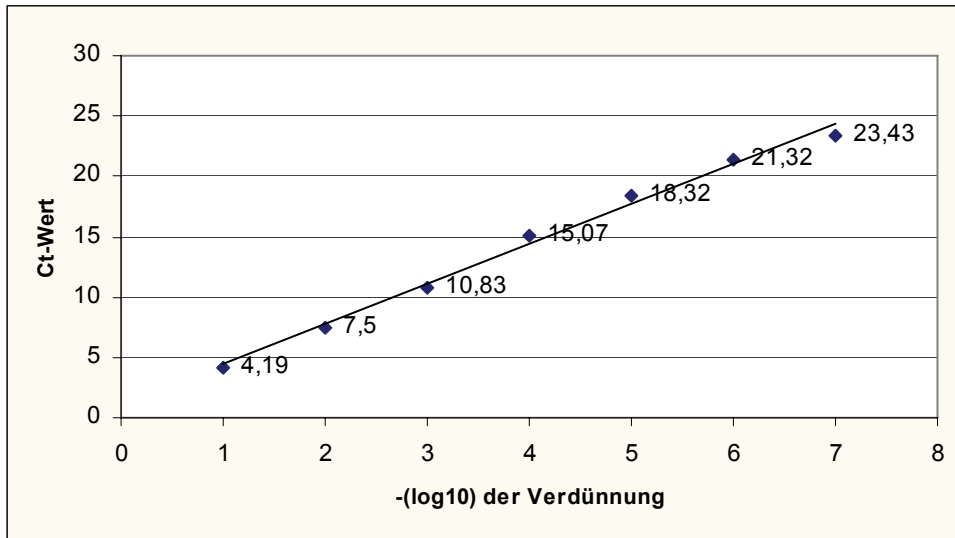


Abb. 48 Abhängigkeit der Ct-Werte in der qrt-PCR der HMEC-cDNA und dem 18s-rRNA-*primer* von der Verdünnung der cDNA. Die Geradengleichung der Trendlinie lautet  $y = 3,316x + 1,116$



Aufgrund dieses Befundes konnte nun in der eigentlichen qrt-PCR davon ausgegangen werden, daß die Unterschiede der Ct-Werte auch tatsächliche Unterschiede im Transkriptionsniveau der untersuchten Gene widerspiegeln. Die PCR wurde für jeden *primer* der Kandidatengene in drei parallelen Läufen durchgeführt, um eine Vergleichbarkeit der Analyse zu gewährleisten.

Die qrt-PCR-Analyse sollte in der vorliegenden Arbeit den Trend der *microarray*-Quantifizierung bestätigen. Da sich im Fall der qrt-PCR mit dem Standard-*primer* beide cDNA-Proben gleich verhalten, kann nicht nur davon ausgegangen werden, das es sich um quantitativ identische Proben handelt, sondern auch, daß die Effizienz der PCR ähnliche Werte hat. Die PCR-Effizienz  $E$  spielt bei der Auswertung der qrt-PCR eine tragende Rolle (Rutledge & Coté 2003; Frank & Bernhard 2004), sie wird durch die Steigung der Geraden der Standardläufe, wie in Abb. 47 und 48 dargestellt, wiedergegeben.  $E$  ist im vorliegenden Experiment jedoch fast identisch und kann aus den folgenden Umformungen daher ausgeklammert werden.

Aus Abb. 47 und 48 geht hervor, daß der Ct-Wert und die Konzentration der vorhandenen cDNA in einem logarithmischen Verhältnis zueinander stehen:

$Ct = -(\log c)$  (1) ergibt umgeformt

$$10^{-Ct} = c \quad (2)$$

und da stets die gleichen Probenvolumina eingesetzt wurden, gilt auch für die absoluten Zahlen der vorhandenen cDNA-Kopien  $N_t$

$$10^{-Ct} = N_t \quad (3)$$

Aus den Standardkurven geht hervor, daß bei den gegebenen cDNA-Proben gleiche Ct-Werte gleichen Werten für  $N_t$  entsprechen. Dann ergibt sich im vorliegenden Experiment für das Verhältnis verschiedener Werte  $N_{ta}$  und  $N_{tb}$

$$N_{ta}/N_{tb} = 10^{-Cta}/10^{-Ctb} \quad (4)$$

Mit der Gleichung (4) lassen sich nun die Verhältnisse der einzelnen Expressionsunterschiede in einer einfachen Weise über die Verhältnisse der Ct-Werte ausdrücken.

Die Graphen der Fluoreszenzdetektion im Verlauf der qrt-PCR werden im Anhang wiedergegeben. Hier folgen nun (Tab. 17) die gemäß der Gleichung (4) errechneten Werte der Expressionsunterschiede (Regulationsfaktoren). Die Parallelen und Abweichungen zu den *microarray*-Daten sind Gegenstand der Diskussion (Abschnitt 4.4). Der Wert für die *EHHAD*-Expression kann dabei ausgeklammert werden, hier funktionierte die qrt-PCR nicht.

Tab. 17. Genexpressionsunterschiede von T-47D-Zellen im Vergleich mit HMEC auf der Grundlage des Mittelwertes von drei qrt-PCR-Analysen, errechnet mit Gleichung (4)

Gen	Verhältnis der Genexpression von T-47D-Zellen im Vergleich mit HMEC
<i>ABAT</i>	3,68
<i>AKRA</i>	1,85
<i>BUCS</i>	2,88
<i>HADHSC</i>	- 1,25
<i>EHHADH</i>	(78,61)
<i>ACADSB</i>	- 2,41
<i>ACADS</i>	- 1,67
<i>BDH</i>	6,15
<i>ST3GAL1</i>	1,91

### 3.6.3 Veränderungen der Genexpression in T47-D

Die folgende Auswahl (Tab. 18) aus den ca. 22000 mit der *microarray*-Methode analysierten Genen soll den Hintergrund für das Auftreten der Neu5Gc illustrieren. Die einzelnen Daten werden in der Diskussion erörtert (s.u., Abschnitt 4.4).

Tab. 18. Auswahl verschiedener Gene der *microarray*-Analyse insbesondere mit Bezug zur Glykosylierung

Gruppe	Name	RefSeq-Nr.	
1. Referenz	$\beta$ -Actin	D50604	1,02
2. Sialyltransferasen	ST8SIA4	NM_005668	1,47
	ST8SIA2	NM_006011	1,38
	ST8SIA5	NM_013305	-1,21
	SIAT1 ( $\beta$ -Galactoside $\alpha$ -2,6-Sialyltransferase) 'diskussion?'	A1743792	2,56
	GD3-Synthase A	L32867	-1,33
3. Glycosyltransferasen	UGT1A3 (UDP-Glycosyltransferase 1-Familie, Polypeptid A3)	NM_019093	-3,29
	UGT1A1	NM_000463	-2,75
	Galactosylceramidase	NM_000153	3,11
	Protein-O-Mannosyltransferase 1	NM_007171	4,03
	UDP-Gal: $\beta$ -GlcNAc $\beta$ -1,3-Galactosyltransferase, Polypeptid 3	AB050856	4,39
4. Zelladhäsion und -kommunikation	NCAM 2	NM_004540	6,42
	NCAM 1	U63041	-1,08
	NCAM 1	M22094	1,05
	transmembranes Muc1	A1610869	9,72
	$\alpha$ 6-Integrin	NM_000210	-21,19
	<i>melanoma cell adhesion molecule</i>	M29277	-4,65
5. Hormonrezeptoren	Prolactinrezeptor	NM_000949	88,47
	Östrogenrezeptor 1	NM_000125	20,04
	Progesteronrezeptor	NM_000926	19,13
	<i>growth hormone</i> -Receptor	NM_000163	13,74

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Neu5Gc in humanen Zellen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Vorkommen und Biosynthese der Neu5Gc in Mammakarzinomzellen zu untersuchen. Neu5Gc gehört zur Gruppe der Sialinsäuren, einer Klasse von acidischen Kohlenhydraten, die fast ausschließlich als terminale Zuckerreste von Glykanen des extrazellulären Anteils auf Membranproteinen vorkommen. Sialinsäuren wirken in vielfältiger Weise bei den Prozessen der Zell-Zell-Kommunikation und der Zelladhäsion mit. Sie sind Liganden für die Gruppe der Selectine und Siglecs, Untergruppen der Lectine als zuckerbindende Proteine. In dieser Funktion beeinflussen Sialinsäuren in vielfältiger Weise Entwicklungs- und Krankheitsprozesse.

Neu5Gc ist zusammen mit Neu5Ac in Zellen von Wirbeltieren die am häufigsten vorkommende Sialinsäure. In Zellen von Vögeln und Menschen fehlt Neu5Gc, weil eine Oxidation der Neu5Ac am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom des *N*-Acetylrestes nicht möglich ist; diese Reaktion bildet den letzten Schritt der Neu5Gc-Synthese in Wirbeltierzellen. In bestimmten humanen Krebszellen wurde jedoch über ein Auftreten der Neu5Gc berichtet, auch dann, wenn die Zellen ohne tierische Zusätze im Kulturmedium wuchsen. Es wurde vermutet, daß menschliche Krebszellen, hier vor allem Mammakarzinomzellen, in der Lage sind, Neu5Gc endogen zu synthetisieren. Möglicherweise spiegelt diese Biosynthese krebszellspezifische Abweichungen des Metabolismus wieder.

Hier kommt vor allem GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) in Betracht, deren Vorkommen in verschiedenen Krebsformen erhöht ist; daneben wurden auch andere Metabolite wie  $\omega$ -Hydroxyfettsäuren als Quellen für die Neu5Gc-Entstehung vermutet. Gemeinsam ist allen möglichen Vorläufern, daß ihr Katabolismus in die Synthese von Glycolyl-CoA mündet, dessen Glykolylgruppe auf einen Hexosaminring übertragen wird. Das Produkt dieser Transferasereaktion würde dann in den Neu5Ac-Bioytheseweg eingespeist werden, dessen Enzyme eine breite Toleranz gegenüber ihren Substraten aufweisen. Die Ergebnisse der metabolischen und enzymatischen Analysen, die auf der Grundlage dieser Hypothesen durchgeführt wurden, wurden durch eine Transkriptomanalyse der beteiligten Enzyme ergänzt.

## 4.2 Evaluation der Methoden zur Sialinsäureanalytik

Bei einer Spurenanalytik, wie im Fall der Neu5Gc-Analyse, sollte stets diejenige Methode gewählt werden, die die betreffende Substanz ohne Nebenprodukte isoliert. In diesem Zusammenhang sprechen die Ergebnisse der methodischen Evaluation für die Anwendung der Säurehydrolyse mit 0,1M TFA und Derivatisierung mit TMSI als Standardmethode für die Sialinsäureanalytik, wie von Kamerling beschrieben (Kamerling *et al.* 1974),.

Die Methanolyse hat den Nachteil, daß das jeweilige Anomer entsteht (vgl. Abb. 20). Hinzu kommt die Sensitivität gegenüber Wasser, die die Ausbeute an Sialinsäuremethylester beeinträchtigen kann. Diese Tatsache sowie eine mögliche Methylierung der Sialinsäuren an ihren Hydroxygruppen sind wohl für die geringere Ausbeute bei der Analyse des BSM als Standardprotein verantwortlich. Gegenüber der Analyse von trimethylsilylierten Methylestern hat die Pertrimethylsilylierung ebenfalls den Vorteil, daß neben dem Basalion bei  $m/z$  356 für Neu5Ac und  $m/z$  444 für Neu5Gc (Struktur D in Tab. 14) ein weiteres Ion bei  $m/z$  300 detektiert werden kann, dessen Intensität bei etwa 75% des Basalions liegt (vgl. Abb. 23 und 24). Diesem Ion, über dessen Vorkommen bisher nicht berichtet wurden, konnte die Struktur E (s. Tab. 14) zugeordnet werden. Die Anwesenheit des Ions E zusammen mit dem Basalion D unterstützt die Identifikation von Sialinsäuren, insbesondere dann, wenn sie in Spuren vorliegen, wie es für den Fall der Neu5Ac8/9Me gezeigt wurde (s. Abb. 25).

Es hat sich ebenso herausgestellt, daß TMSI das Derivatisierungsmittel der Wahl ist, weil die Reaktion mit TMSI für alle untersuchten Sialinsäuren (Neu5Gc, Neu5Ac, daneben auch für KDN, 2,3-Dehydro-Neu5Ac, Neu5Ac8/9Me) durchgängig ein einziges Produkt ergibt. MSTFA führt zu einer geringen Trimethylsilylierung an der Amidofunktion; diese kann zwar weitgehend unterbunden werden (Donike 1969), dennoch ist das Derivatisierungsmittel zu bevorzugen, das eine einzige derivatisierte Form des Analyten erzeugt.

Unklar bleibt, warum die Ansätze mit den anderen organischen Säuren – Ameisen-, Essig- und Propionsäure – zu keinem greifbaren Ergebnis führten. Möglicherweise waren die gewählten Konzentrationen zu schwach oder die Reaktionszeiten zu kurz, um eine Hydrolyse der proteingebundenen Sialinsäuren [drei Genitive] zu erzielen. Die Weiterentwicklung der Methylierungs- bzw. Fluoracylierungsmethode von Bulai (Bulai *et al.* 2003) scheiterte wahrscheinlich an

den chemischen Eigenschaften des TMS-Diazomethans, dessen Reaktionseigenschaften wesentlich komplexer sind als die des Diazomethans; Vorversuche mit dem TSMDM und den Fluoracylanhydriden waren allerdings bei isolierter Anwendung erfolgreich. Rückstände des mit einer Trimethylsilylgruppe derivatisierten Methylierungsmittels führten wohl zu einer Methylierung oder Trimethylsilylierung der Perfluorcarbonsäuren, die hierdurch inaktiviert und als Acylierungsreagenzien unbrauchbar gemacht wurden. Abhilfe schafft hier möglicherweise die Inaktivierung des Methylierungsmittels; aus Zeitgründen konnte hier nicht nach einem geeigneten Reagenz gesucht werden.

Die HPLC-Analytik ohne unmittelbar nachgeschaltete Massenspektrometrie zur Identifizierung erwies sich als untauglich für die Sialinsäureanalytik. Eine LC-MS stand jedoch nicht zur Verfügung [Stimmt nicht]. Die Identifikation der Sialinsäuren über die Retentionszeiten allein kann als ungeeignet für die Sialinsäureanalytik angesehen werden und kann zu falsch positiven Resultaten führen. Hier liegt wahrscheinlich der Grund für die vermeintliche Detektion von Neu5Gc als ausschließliche Sialinsäure in STAV-AB-Zellen (Tzanakakis *et al.* 2005), unsere Analysen sprechen dagegen für das alleinige Vorkommen von Neu5Ac. Ein Auffangen einzelner Fraktionen, Trocknen und ihre anschließende massenspektrometrische Analyse ist, jedenfalls für die Aufgabenstellung dieser Arbeit, zu zeitintensiv und kann insbesondere beim Vorliegen einer überlegenen Methode, wie der GC/MS-Analytik, wegfallen.

### **4.3 Ursprung der Neu5Gc in Karzinomzellen**

#### **4.3.1 Darstellung quantitativer Analytik seltener Sialinsäuren**

Die gefundenen Werte für den Neu5Gc-Gehalt sind nicht einheitlich; auch die Forschung zur Neu5Gc-Analytik in humanen Zellen kommt zu heterogenen Ergebnissen. Tangvoranuntakul *et al.* (2003) fanden für den Fall der Darmkrebszelllinie Caco-2, daß Neu5Gc nach durchschnittlich 4 Tagen nicht mehr nachweisbar ist. Mit der gleichen HPLC-Analysemethode kamen Yin *et al.* (2006) für die Darmkrebszelllinie LS174T zu dem Ergebnis, daß nach 21 Tagen der Neu5Gc-Gehalt immer noch bei etwa 2% der proteinogenen NeuAc verbleibt. Die Autoren formulieren diesen Befund jedoch irreführend als Beleg für die Abwesenheit von Neu5Gc, während man eher davon sprechen sollte, daß der Sialinsäureanteil in Glykoproteinen durch die Kultur in chemisch definiertem

Medium insgesamt sinkt; bezogen auf Neu5Ac geht er nach drei Wochen von fast 400 pmol auf 50 pmol pro mg Protein zurück. Im Zuge dieses Rückgangs geht konzentriert der Neu5Gc-Gehalt in Proteinen zurück, bleibt aber letztlich bei einem Grenzwert von 2% des Neu5Ac-Gehaltes.

An dieser Stelle muß kurz auf einen wichtigen Punkt bei der Darstellung von quantitativen Sialinsäureanalysen hingewiesen werden. In der Sialinsäureforschung wird generell die Darstellung des Gehaltes seltenerer Sialinsäuren als Bruchteil des Neu5Ac-Gehaltes bevorzugt. Die diagnostische oder auch physiologische Relevanz seltener Sialinsäuren wird verschleiert, wenn ihr Gehalt als Konzentration im membranären Proteinanteil angegeben wird, wodurch es zu Größenangaben kommt, die Bruchteile von einem Promille am Proteingehalt betragen. Sialinsäuren bilden jedoch zusammen mit anderen Kohlehydraten eine Hülle um die Zelle, und die Zusammensetzung dieser Hülle beeinflußt ihre physiologischen und immunologischen Eigenschaften, wobei der darunter liegende Proteinanteil bis zu einem bestimmten Grad ausgeblendet bleibt. Deswegen sollten seltenerer Sialinsäurespecies als Anteile am Gesamtsialinsäure-*Pool* (z.B., Bulai *et al.* 2003) oder – allerdings nicht bei tierischen Zellen, in denen Neu5Gc und Neu5Ac in ähnlicher Menge vorkommen - als Bruchteil des Neu5Ac-Gehaltes (z.B., Inoue 1999a) ausgedrückt werden.

#### **4.3.2 Sialinsäuretransport und Ursachen der Neu5Gc-Detektion in Karzinomzellen**

Um das Zusammenspiel von exogener Neu5Gc-Zufuhr und endogener Produktion zu verstehen, muß zunächst auf den Mechanismus der Sialinsäureaufnahme eingegangen werden. Bardor und Kollegen (2005) untersuchten den Sialinsäuretransport aus dem Zellkulturmedium und stellten durch die Inhibition der verschiedenen Endocytosewege fest, daß der Mechanismus der Pinocytose hauptverantwortlich für die Aufnahme von Sialinsäuren ist. Die pinocytotischen Vesikel verschmelzen dann mit dem Lysosom, wo Sialinsäuren von ihren Trägern durch lysosomale Sialidasen freigesetzt werden können. Vom Lysosom werden sie durch einen entsprechenden Transporter ins Cytosol überführt, wo sie einem Transfer auf Glykoproteine zur Verfügung stehen. Bardor und Kollegen schlagen folgendes Modell des Sialinsäuretransportes vor:



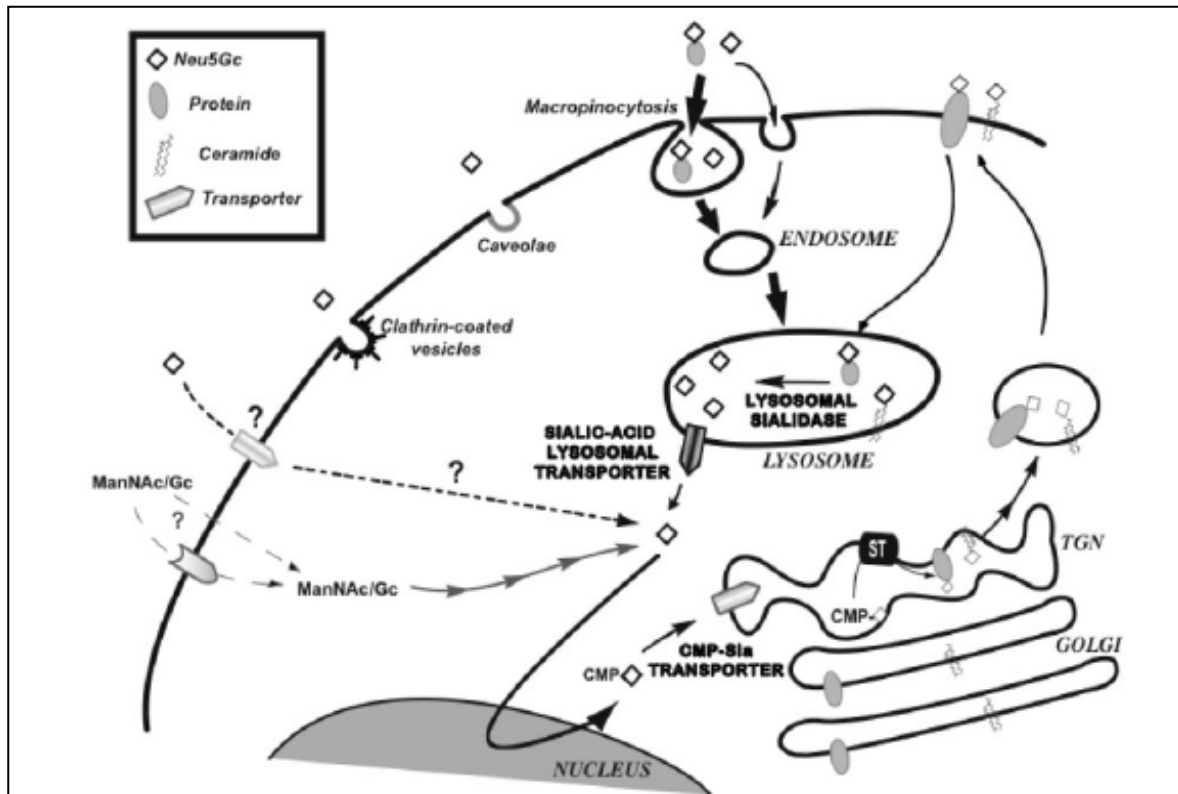


Abb. 47. Modell des Sialinsäuretransportes durch Pinocytose und lysosomalen Transport.  
Nach Bardor (Bardor *et al.* 2003).

Weder Bardor noch Yin und Kollegen gehen allerdings auf die Identität des lysosomalen Transportproteins ein. Diesbezüglich ist das Protein SLC17A5 bekannt, auch als Sialin bezeichnet, das anionische Moleküle, insbesondere anionische Zucker, aus dem Lysosom in das Cytoplasma überführt (Yarovaya *et al.* 2005). Defekte im Gen dieses Kanalproteins führen zu *sialic acid storage diseases*, die vor allem zu neurokognitiven Defiziten führen (Aula *et al.* 2002). Bardor *et al.* (2005) zeigten, daß die Neu5Gc-Inkorporation in Fibroblasten, die defektes Sialin besitzen, von 37% auf 5% reduziert war. Yin und Kollegen untersuchten das Verhalten und den physiologischen Kontext dieses Transportproteins detaillierter. Sie zeigten, daß hypoxische Zellkulturbedingungen zu einer Hochregulierung der Sialintranskription und zu einem stark wachsenden Anteil von Neu5Gc in Proteinen führen. Exprimiert man Sialin überdies in Zellen, die – aus ungeklärten Ursachen – wenig Neu5Gc-haltige Ganglioside aufweisen, so verdoppelt sich der NeuGc-Anteil am Gesamtsialinsäuregehalt der Zellen. Die Autoren zeigten, daß in Tumoren die Sialinexpression dort am höchsten ist, wo die größte Entfernung zu Blutgefäßen besteht. Hierdurch kommt es nach Meinung der Autoren zu einer erhöhten Aufnahme und Verarbeitung von externem Neu5Gc. Da Tumorzellen fern von Blutgefäßen einem hohen Selektionsdruck unterliegen und oft zu besonders

aggressiven Krebszellen mutieren, kann die erhöhte Neu5Gc-Inkorporation und Expression nach Meinung der Autoren zu immuntherapeutischen Ansätzen der Krebsbehandlung benutzt werden, denn die Immunogenität von Neu5Gc-haltigen Epitopen ist bekannt (Haganutziu-Deicher-Antikörper, vgl. Einleitung).

Der Zusammenhang von Sialinexpression und Neu5Gc-Detektion ist auf der Grundlage der Ergebnisse in vorliegender Arbeit jedoch zweifelhaft. Die hier untersuchten Krebszellen wurden unter normalen – d.h. insbesondere normoxischen - Zellkulturbedingungen gezogen, sie wiesen dennoch in vielen Fällen einen deutlich meßbaren Neu5Gc-Anteil auf. Darüber hinaus zeigen die aus drei unterschiedlichen mRNA-Proben gewonnenen Expressionsdaten, daß die Sialinexpression keineswegs hochreguliert ist (der Wert von  $-1$  weist sogar auf eine *Verminderung* der Expression hin, wobei angesichts der Signifikanzschwelle von  $\pm 2$  bei *microarray*-Analysen allerdings nicht von einer relevanten Änderung der Expression ausgegangen werden kann). Zusammengenommen liefert daher die Sialinhypothese keine befriedigende Erklärung der Neu5Gc-Präsenz

Die Daten der vorliegenden Arbeit sowie die Befunde der jüngeren Literatur deuten darauf hin, daß die Neu5Gc-Präsenz in Krebszellen nicht von einem genetischen *setting* verursacht wird, das in Krebszellen aktiviert wird. Auch die Hochregulierung der *ABAT* führt nicht in allen Fällen zur Neu5Gc-Synthese. Stattdessen kann man von einem *quantitativen* Phänomen sprechen, das durch das jeweilige Angebot bestimmter Metabolite und Proteine verursacht wird. Folgende Faktoren können genannt werden:

- Verfügbarkeit von Neu5Gc in der Umgebung der Zelle;
- Wachstumsbedingungen der Zelle, z.B. normoxischer oder hypoxischer Status;
- Metabolische Besonderheiten von Krebszellen, z.B. der hochregulierten GABA-Aminotransferasen, die für ein größeres Angebot an Hydroxybuttersäure als kurzkettiger Fettsäure sorgt;
- Breite Substrattoleranz von Enzymen, so z.B. der Glucosamin-6-phosphat-Acyltransferase und der an der Synthese des Sialinsäuregerüsts beteiligten Enzyme;
- Verfügbarkeit von Glykoproteinträgern. Diesbezüglich könnte die geringere Expression von MUC1 auf der Zelloberfläche dazu führen, daß die möglicherweise gebildete Neu5Gc-Menge unterhalb der Nachweisgrenze liegt.

Die Abhängigkeit der Neu5Gc-Präsenz von vielen Faktoren liefert möglicherweise auch eine Erklärung für die Schwankungsbreite (ein Faktor 17 bei Hanisch *et al.* 1996, ein Faktor 30 in der vorliegenden Arbeit) der Neu5Gc-Präsenz in Krebszellen. So stellt das verwendete AIMV-Medium (dessen genaue Zusammensetzung öffentlich nicht zugänglich ist) der Zelle ein anderes Angebot an metabolisch verwertbaren Stoffen als RPMI supplementiert mit Humanserum. Es kann auch vermutet werden, daß sich durch die wiederholten Passagen der Karzinomzellen das Profil der Membranproteine verändert; mit der zunehmenden Anzahl der Passagen könnte die Menge des auf der Zelloberfläche exprimierten MUC1 abnehmen. Schließlich kann auch in Betracht gezogen werden, daß der Neu5Gc-Gehalt empfindlich auf das Wachstumsstadium der Zellen oder auf den Zustand des Zellmediums reagiert, obwohl stets von einer 80%igen Konfluenz der Zellen ausgegangen wurde und eine zu starke pH-Absenkung des Mediums – erkennbar an der Farbe des Indikators – vermieden wurde.

Hinsichtlich der Studie von Yin und Kollegen (2006) ist klar, daß hypoxische Wachstumsbedingungen zu einer Fülle von genetischen und metabolischen Adaptionen der Zellen führen, von denen die Sialinexpression nur als ein Detail betrachtet werden kann. So zeigen die Autoren z.B., daß hypoxische Bedingung zu einer stärkeren Expression des Glucosetransporters führen. Die Hochregulierung des Glucosemetabolismus in Krebszellen, auch bekannt als Warburg-Effekt, ist eine nicht unumstrittene, letztlich jedoch in vielen Fällen gut belegte Besonderheit von Krebszellen (Matoba *et al.* 2006). Neben dem Hauptstoffwechselweg der Glykolyse kommt es durch einen gegenüber dem Normalzustand erhöhten Transport von Glucose in die Zellen auch zu einer erhöhten Verfügbarkeit des Hexoserings für den Zuckerstoffwechsel (Murell 2004). Hierdurch könnte die Bildung von Kohlehydraten begünstigt werden, die in gesunden Zellen nicht vorkommen.

Es wurde z.B. gezeigt, daß ein erhöhtes Mannoseangebot beim Zellwachstum zur Bildung von KDN führt, die unter normalen physiologischen Umständen nicht oder nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze detektiert werden kann (Inoue *et al.* 1999b); ebenso wie Neu5Gc ist KDN als oncofetales Antigen klassifiziert worden (mehr zu diesem Punkt in Abschnitt 4.5) Ein erhöhtes Angebot an Glucosamin könnte so zusammen mit einem erhöhten Angebot an Glycolyl-CoA zu einer Synthese von endogener Neu5Gc führen. Die vorliegende Arbeit zeigt, daß die

Voraussetzungen für eine solche endogene Synthese über die Bildung von Glycolyl-CoA aus GABA und die Glycolylierung des Glucosamin bestehen. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen aber auch, daß dies keineswegs mit einer Hochregulierung der entsprechenden Enzyme einhergehen muss: Die endogene Neu5Gc-Synthese als Seitenweg des Krebszellmetabolismus kommt, außer im Fall des GABA-Katabolismus, mit den vorhandenen Enzymmengen aus. Auch hierdurch wird deutlich, daß es sich bei der endogenen Neu5Gc-Bildung um ein Phänomen des Metabolismus handelt, das in Krebszellen nicht notwendigerweise durch genetische Abweichungen verursacht wird, eher handelt es sich um synergistische Effekte verschiedener katabolischer Stoffwechselwege, die konzertiert die Bildung von Glykolyl-CoA bedingen und damit ein wenn auch niedriges Neu5Gc-Niveau ermöglichen.

Ein wichtiges Ergebnis der Arbeit ist, daß es mindestens einen alternativen Weg der Neu5Gc-Synthese in Krebszellen gibt, der über den Abbau von GABA und die Addition des entstehenden Glycolylrestes an ein Hexosamin erfolgt. Weiterhin hat sich herausgestellt, daß Glycolyl-CoA durch die Aktivität der PDH auch aus Hydroxypyruvat synthetisiert werden könnte, wodurch eine weitere Möglichkeit für die Auffüllung des Glycolyl-CoA und damit für die Neu5Gc-Synthese besteht. Für die Schwankungen der Neu5Gc-Expression spielt neben den eben genannten Faktoren auch das Profil der in der Zelle vorhandenen Glycosyltransferasen und die von ihnen gebildeten Glykane eine Rolle. Glykane in normalen Zellen weisen 5-10% Sialinsäure auf (gegenüber 30-50% in Krebszellen, s.o. Abschnitt 1.2.3 der Einleitung). Die Detektion seltener Sialinsäurevarianten, wie der Neu5Gc, könnte demnach auch von den höheren Absolutmengen in Karzinomzellen abhängig sein. Alle bisher genannten Faktoren trugen dazu bei, daß bei den Fütterungsversuchen keine erhöhte (oder im Fall der d6-GABA am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom der Glycolylgruppe deuterierte) Neu5Gc auftrat. Zudem stehen die Vorläufermetabolite der Neu5Gc in der Sialinsäurebiosynthese (s. Abb. 10) in Konkurrenz mit den Vorläufermetaboliten der Neu5Ac, was für eine Begrenzung der endogen gebildeten Neu5Gc sorgt.

#### 4.4 Diskussion der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

Genexpressionsdaten wurden nur in Fällen durch qrt-PCR bestätigt, wo die Transkriptionsrate eines Gens in T-47D-Zellen mehr als dreifach gegenüber der in HMEC erhöht war (vgl. Tab. 16 und 17). Hier werden die Signifikanzgrenzen der *microarray*-Analyse (Bustin 1994) deutlich: Ein Wert von weniger als 2 wird durch die Schwankungsbreite der Fluoreszenzmessung während der Analyse annulliert. Es kann in der Realität eine leichte Herunterregulierung oder auch Heraufregulierung der Genexpression vorkommen, wie sie durch die qrt-PCR angedeutet wird, wenn auch aufgrund der geringen Zahl der gemessenen Proben nicht validiert wird. Bestätigt werden jedoch die Werte für die Gene *ABAT* und *BDH*, die an der Einspeisung der GABA in die Fettsäureoxidation beteiligt sind.

Insgesamt zeigen T-47D-Zellen gegenüber HMEC keine signifikanten Abweichungen, soweit der Sialinsäureanabolismus ausgehend vom *N*-Glycolyl- bzw. *N*-Acetylglucosamin betroffen ist. Epimerasen oder Mutasen, die den *pool* der für die Glykosylierung vorhandenen Zucker regulieren (Murell 2004), haben in beiden Zelltypen ebenfalls ein mehr oder weniger gleiches Expressionsniveau. Die Genexpressionsanalyse ist möglicherweise ungeeignet für die Untersuchung metabolischer Randphänomene angesehen werden, stattdessen sollte eine Messung der tatsächlichen Enzymaktivitäten durchgeführt werden. Auch in diesem Fall bleibt der Einwand berechtigt, dass ein metabolisches Randphänomen nicht notwendigerweise in veränderten Expressionsniveaus oder Enzymaktivitäten reflektiert sein muß. Marginale Änderungen können sich, wenn sie konzentriert über einen bestimmten Metaboliten, wie das Glykolyl-CoA laufen, in signifikanten Mengen eines Endproduktes niederschlagen.

Einige über die statistische Schwankungsbreite der *microarray*-Analyse hinausgehende Expressionsunterschiede wurden in Tab. 18 zusammengefaßt. Hier zeigt sich, daß verschiedene Glykosyltransferasen in T-47D-Zellen eine erhöhte Expression aufweisen, so z.B. die Protein-O-Mannosyltransferase oder auch eine Familie der UDP-Glucuronyltransferasen, die eine Glucuronidierung und damit die Bioverfügbarkeit vor allem von Flavonoiden bewirken (Chen *et al.* 2006).

Während sich in T-47D-Zellen keine Expressionsunterschiede der an der Glycolyse beteiligten Enzyme finden lassen, sticht beim Fettsäureabbau die mehr als 25fache Herunterregulierung einer Coenzym-A-Ligase für langkettige Fettsäuren hervor. Es ist jedoch unklar, welche biologische Funktion dieses Phänomen haben könnte;

Forschungsergebnisse liegen diesbezüglich nicht vor. Möglicherweise steht dies im Zusammenhang mit dem Wechsel vom aeroben zum anaeroben Metabolismus in Tumorzellen.

Neben der erwarteten fast 10fachen Hochregulierung der MUC1-Expression, die mit der unpolarisierten Expression von MUC1 auf Krebszellen korreliert (Hanisch 2002), findet sich als weitere Besonderheit im Bereich der Membranproteine in T-47D-Zellen eine mehr als 6fach stärkere Expression des *NCAM2*-Gens. Leider bestand nicht mehr die Möglichkeit, die Expression von NCAM auf der Oberfläche der Zellen zu testen. Die Hochregulierung der *NCAM2*-Expression ist für duktale Karzinome der Brust bisher nicht berichtet worden. Im Fall der recht seltenen Karzinome muzinproduzierender Zellen der Brust kommt es aber oft zur Entwicklung eines neuroendokrinen Zelltyps (Tse *et al.* 2004). Diese Entwicklung findet sich z.B. auch im Fall des Pankreas- und des Lungenkarzinoms (Lantuejoul *et al.* 1998). Beim kleinzelligen Lungenkarzinom (SCLC) wurde PSA zusammen mit NCAM durchgängig detektiert (Komminoth *et al.* 1991, Lantuejoul *et al.* 1998, Zhang *et al.* 1997). Im Fall des SCLC wurden Patienten mit Poly-*N*-Propionylneuraminsäure immunisiert und zeigten anschließend auch eine Immunreaktion gegen Poly-*N*-Acetylneuraminsäure, wie durch Untersuchung der gebildeten Antikörper nachgewiesen wurde (Krug *et al.* 2004). Im Krankheitsbild des Lungenkrebs korreliert das Auftreten von PSA-NCAM auf Lungenkrebszellen mit hohem metastatischem Potential. Dies wird auf der molekularen Ebene wahrscheinlich durch die anti-adhäsiven Eigenschaften des PSA verursacht, das in Neuronen zur Neuritenprogression beiträgt (Freire *et al.* 2002; 2004).

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit könnte ein Anschlußprojekt darin bestehen, NCAM oder PSA-NCAM auf der Zelloberfläche von T-47D- und anderen Brustkrebszellen nachzuweisen, wodurch sich im positiven Fall eine molekulare Ähnlichkeit zu neuroendokrinen Tumoren ergäbe. Wahrscheinlich ist jedoch NCAM ohne PSA-Modifizierung zu detektieren, da die benötigten Sialyltransferasen in T-47D-Zellen nicht hochreguliert sind.

Die Hochregulierung von Hormonzeptoren entspricht den aus der Forschung bekannten Daten zur Genexpression in T-47D-Zellen (Kroll *et al.* 2002); für die Daten zum  $\alpha 6$ -Integrin finden sich in früheren Arbeiten (z.B., Zutter *et al.* 1998) keine einheitlichen Ergebnisse. *MelCAM* (auch als CD146 oder MUC18 bekannt) ist in humanen Melanomen hochreguliert (Nyormoi *et al.* 2003) und fördert hier die

Tumorprogression (McGary *et al.* 2002; Shih 1999). Es wurde jedoch im Kontext des Mammakarzinoms als *tumor suppressor* beschrieben (Shih *et al.* 1997); der in der vorliegenden Arbeit beobachtete leichte Rückgang der Expression steht daher im Einklang mit der verminderten Immunodetektion des Moleküls auf Karzinomzellen (Shih *et al.* 1997).

Der Rückgang der Transkription von Integrinen wie dem  $\alpha 6$ -Integrin steht möglicherweise mit der Überexprimierung von MUC1 in Beziehung (Wesseling *et al.* 1995). Es wurde gezeigt, daß die MUC1-Überexprimierung die Integrin-vermittelte Zelladhäsion verhindert, wobei die Größe des MUC1-Moleküls für die Inhibition der Zelladhäsion verantwortlich sein soll. Möglicherweise führt dies im weiteren Verlauf auch zu einer Herunterregulierung von Integrinen und weiteren Adhäsionsfaktoren wie des MelCAM.

#### **4.5 Neu5Gc und weitere Sialinsäuremodifikationen in Karzinomen**

Das Auftreten von Neu5Gc gehört in den Kontext der mit der malignen Entwicklung von Zellen verbundenen Glykosylierungsphänomene. Im Kontext der Sialinierung wurde in der Einleitung schon der Wechsel vom Disialyl-Lewis<sup>x</sup> zur Monosialylstruktur genannt. Neben verschiedenen N-Acylierungsvarianten können hier noch eine Reihe weiterer Sialinsäuremodifikationen genannt werden, die mit verschiedenen Stadien der Krebsentwicklung einhergehen. Dazu gehört ein bis zu 56fach erhöhter Gehalt an 9-O-acetylierten Sialinsäuren (Fahr und Schauer 2001), ein gesteigerter KDN-Anteil an der Gesamtsialinsäuremenge in Lungen- und Eierstockkrebs (Inoue *et al.* 1996, Inoue *et al.* 1998) und schließlich das Phänomen der *reduzierten* O-Acetylierung von Neu5Ac in Kolonkarzinomzellen (Mann *et al.* 1997, Corfield *et al.* 1999, Shen *et al.* 2004). Mann und Kollegen zeigten weiterhin, daß die „Hypoacetylierung“ mit der verstärkten Bildung der Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Struktur einhergeht (Mann *et al.* 1997). Chemische Modifikationen der Sialinsäurestruktur begleiten also pathologische Entwicklungen, wobei noch nicht klar ist, wie groß der Einfluß dieser strukturellen Änderungen auf den pathologischen Verlauf ist. Inoue und Mitarbeiter (Inoue *et al.* 1998) kommen allerdings zu dem Ergebnis, daß die Höhe des KDN-Gehaltes mit dem malignanten Potential der Zellen korreliert. In der Untersuchung von Zellmaterial sehen sie deswegen die Möglichkeit, KDN als diagnostischen Marker für die Tumorerkrankung zu etablieren.

Diese Möglichkeit ist im Fall der Neu5Gc-Expression in Karzinomzellen schwieriger zu realisieren, weil durch die Nahrung große Mengen dieser Sialinsäure aufgenommen werden. Die Studie von Tangvoranuntakul und Kollegen (2003) hat gezeigt, daß der Neu5Gc-Anteil in Körperflüssigkeiten durch externe Aufnahme der Sialinsäure stark beeinflusst werden kann. Die Spanne der Sialinsäurekonzentrationen im Plasma liegt zwischen 1,5 und 2,5 mM, wobei freie nur etwa 0,1% und lipidgebundene Sialinsäure 0,5 – 2,5 % der Sialinsäuremenge ausmachen (Lamari & Karamanos 2001). Nach den Befunden der Studie von Simpson und Kollegen (1993) wird die gesamte Sialinsäuremenge – d.h. in humanen Zellen weit überwiegend die Menge an Neu5Ac - nicht durch die Nahrungsaufnahme beeinflusst. Nach den Ergebnissen von Tangvoranuntakul (2003) kann dieser Befund nun so interpretiert werden, daß die Neu5Ac-Aufnahme im normalen Organismus einen Sättigungswert erreicht, der durch normale Ernährung nicht beeinflusst wird. Bei seltenen Sialinsäuren, wie der Neu5Gc, liegt dieser Sättigungswert jedoch wahrscheinlich weit höher als der Gehalt, der im gesunden menschlichen Organismus gemessen werden kann. Wie die Experimente von Yin (2006) zeigen, können dementsprechend Darmkrebszellen bei externer Fütterung mit höheren Neu5Gc-Konzentrationen, als sie in Zellkulturmedien angetroffen werden, einen Gehalt an Neu5Gc erreichen, der sich dem der Neu5Ac nähert. Es wird also schwierig sein, für Neu5Gc einen nahrungsunabhängigen Standardwert zu etablieren, der in der klinischen Diagnostik eingesetzt werden könnte.

Mit Blick auf KDN als weitere Sialinsäure, die nicht durch chemische Modifikation der Neu5Ac, sondern durch *de novo*-Biosynthese aus Mannose und Phosphoenolpyruvat entsteht (Angata *et al.* 1999a, Angata *et al.* 1999b), kann davon ausgegangen werden, daß die Neu5Gc ebenso wie KDN Schwellenphänomene in humanen Zellen sind. Die KDN-Expression auf Membranproteinen kann, wie schon erwähnt, durch Wachstum von Zellen in Mannose-reichem Medium stark erhöht werden (Angata *et al.* 1999a).. Da der Biosyntheseweg der KDN wesentlich kürzer ist als der der Neu5Gc, läßt sich durch Spurenanalytik feststellen, daß geringste Mengen von KDN, über den Mannosemetabolismus, auch schon von normalen Zellen, z.B. der Ovarien, gebildet werden (Inoue *et al.* 1998). Möglicherweise liegt in Karzinomzellen der Ovarien und der Lunge eine erhöhte Expression eines Transportproteins für



Mannose oder einer Epimerase vor, wodurch Mannose aus Glucose gewonnen wird. Hierdurch würde dem metabolischen System ein erhöhtes Angebot an Mannose bereitgestellt, die u.a. in die KDN-Synthese abfließen kann. Diese Vermutung zieht eine Parallele zur Neu5Gc-Synthese, wo ein erhöhter Glycolyl-CoA-Pool zur Bildung des Zuckers beiträgt. In diesem Zusammenhang wurde vermutet (Vameq & Draye 1987), daß  $\omega$ -hydroxylierte Fettsäuren zu Glycolyl-CoA verstoffwechselt werden, und daß das entstehende Glycolyl-CoA (in weit geringerem Umfang, jedoch ähnlich wie Mercaptoacetyl- oder Fluoracetyl-CoA) durch Inhibition von Enzymen des Citratzyklus toxisch ist. Die Neu5Gc-Synthese erscheint vor diesem Hintergrund als „Entgiftungsweg“ des Glycolyl-CoA,

Es ist unklar, ob die Neu5Gc- oder KDN-Expression in einer Höhe von etwa einem Prozent der Gesamtsialinsäuremenge auf Tumorzellmembranen eine biologische Funktion haben können. Möglicherweise tragen diese Sialinsäuren zu einem veränderten Interaktionsverhalten der Krebszelle mit Siglecs oder Selectinen bei, wie es für Darm- und Brustkrebszellen (Deman *et al.* 1995) erwähnt wurde. Wahrscheinlich sind sie jedoch nur ein Epiphänomen der veränderten Sialylierung von Krebszellen insgesamt. Bei einer Steigerung der Sialylierung von Membranproteinen (Uslu *et al.* 2003), die als *escape*-Mechanismus gegenüber dem körpereigenen Immunsystem betrachtet wird, werden die Synthese seltener Sialinsäuren und ihr Transfer auf die Glykane von Membranproteinen zusätzlich gefördert. Sie können in diesem Fall, zumindest beim Auftreten von KDN, als Tumormarker zu diagnostischen Zwecken eingesetzt werden.

Im Fall der Hypo-O-Acetylierung von Darmkrebszellen konnte der physiologische Kontext der Modifikation genauer eingegrenzt werden, und zwar auf das frühe Stadium der malignen Entwicklung (Corfield *et al.* 1999). Über die *Konsequenzen* der veränderten Acetylierung im Colonkarzinom oder im Basaliom existieren jedoch nach wie vor nur Hypothesen, so z.B. daß sie das Zellwachstum der Krebszelle beeinflussen (Fahr und Schauer 2001). Aufgrund der Studie von Mann (1997) kann vermutet werden, daß die O-Acetylierung von Neu5Ac die Synthese der Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Struktur beeinträchtigt, möglicherweise ist die acetylierte Form kein gutes Substrat für die entsprechende Sialyltransferase. Hier zeichnet sich ab, daß enzymatische Modifikationen der Neu5Ac selbst in einem direkten funktionalen Zusammenhang mit dem Aufbau von Glykanstrukturen stehen.

Im Gegensatz zu chemischen Modifikationen der Sialinsäure korrelieren, wie schon in der Einleitung dargestellt, *quantitative* Veränderungen des Gesamtsialinsäuregehaltes mit präzisen physiologischen Vorgängen wie dem Öffnungsverhalten von Natriumkanälen (Johnson *et al.* 2004) und dem Neuritenwachstum (Freire *et al.* 2002, 2004). Im Zuge der Entwicklung eines Karzinoms wurde eine gesteigerte Sialylierung vor allem dem beginnenden metastatischen Prozeß zugeordnet. Hier kommt wiederum die Funktion der Sialylierung als „Maskierung“ der Zelle gegenüber Erkennungsmechanismen des Immunsystems in Betracht (Schauer 1985); diese wird besonders wichtig, wenn sich einzelne Krebszellen aus der Tumormasse ablösen und im Gefäßsystem des Körpers durch Immunzellen detektiert werden können. Muzine, die das Sialyl-Tn-Antigen tragen, inhibieren z.B. natürliche Killerzellen (Ogata *et al.* 1992). Schließlich trägt die Bildung von Sialyl-Lewis<sup>x</sup> und Sialyl-Lewis<sup>a</sup>-Strukturen durch Bindung an E- und P-Selectine auch zur Extravasation der Tumorzellen aus den Gefäßen und zum metastatischen Wachstum im Zielorgan bei (Hakomori 1996). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß endogen synthetisierte Sialinsäuren metabolische Fluktuationen darstellen, die immunologisch reaktiv sein können. Diese Eigenschaft kann aber gerade wegen des Status dieser Sialinsäuren als Epiphänomene des metabolischen Systems klinisch – z.B. diagnostisch – nur wenig ausgenutzt werden. Die „postsynthetischen“ Modifikationen der Neu5Ac durch Deaminierung und Derivatisierungen der Hydroxygruppen wie Acetylierung haben größere klinische Relevanz, da sie in einer unmittelbaren Beziehung zur Synthese und Expression physiologisch wichtiger Glykanstrukturen stehen. Endogen *de-novo* synthetisierte Sialinsäuren und „postsynthetisch“ modifizierte Neu5Ac könnten allerdings ein Sialinsäureprofil bilden, das charakteristisch für einen zellspezifischen Entwicklungstyp ist; dies wurde für Erythrocyten unterschiedlicher Blutgruppenzugehörigkeit mittels einer weiterentwickelten GC/MS-Analytik von Zanetta und Mitarbeitern gezeigt (Bulai *et al.* 2003; Zanetta *et al.* 1999).

Die Neuexpression von PSA in verschiedenen Krebsformen scheint ebenfalls Perspektiven für eine klinische Anwendung zu eröffnen, da die PSA-Synthese enzymatisch präzise reguliert ist. Darüber hinaus ist es lohnenswert, die Sialyltransferasen in Krebszellen insgesamt als *targets* der medizinischen

Forschung zu verwenden, da die funktionalen Folgen einer veränderten Sialylierung drastisch sind (Julien *et al.* 2006).

Hinsichtlich der Physiologie der Sialylierung lassen sich Parallelen z.B. zur Funktion der Fucose ziehen, die ebenfalls die terminale Position auf Glykanen einnimmt; Veränderungen der Fucosylierung haben Konsequenzen für die Entwicklung der Zelle, wie z.B. an der Veränderung des *notch-signaling* durch die Fucosyltransferase *fringe* zu sehen ist (Haines & Irvine 2003). Möglicherweise lassen sich ähnliche Phänomene auch bei der Sialylierung finden – wie etwa bei der Steuerung des Natriumkanals (Johnson *et al.* 2004) und bei der Beeinflussung der Aktivität von Glutamatrezeptoren durch PSA-NCAM (Hammond *et al.* 2006) –, wodurch der Sialinsäurebiologie neuartige Perspektiven im Bereich der zellulären Dynamik eröffnet werden würden.

## SUMMARY

N-Glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) belongs to the class of sialic acids, a group of acidic sugars with a nine-carbon atom base structure. Sialic acids are of central importance for cellular functioning because they occupy the terminal position on glycan chains. At this position they are the first molecule encountered by other molecules approaching the cell. Neu5Gc and Neu5Ac (*N*-Acetylneuraminic acid) are the most abundant sialic acids in animals, but human cells do not possess Neu5Gc because the enzyme responsible for the final step of Neu5Gc synthesis is not functional. Because of this, normal human cells do not contain Neu5Gc and the human body develops antibodies against glycan epitopes containing the carbohydrate. However, in specific types of cancers Neu5Gc is reappearing on the cell surface.

The current work addressed the question whether an endogenous cellular biosynthesis of Neu5Gc causes this phenomenon. To elucidate this, cells were grown in medium free of animal components; this was intended to cut off exogenous delivery of Neu5Gc to the cells and to show whether an endogenous source of the carbohydrate exists. Indeed, a subpopulation of breast cancer cells contained Neu5Gc even after long time of growth under serum-free conditions. Next we asked how the cell synthesizes Neu5Gc. It is known that gamma-aminobutyric acid (GABA) is more abundant in cancer cells than in normal cells. Thus, we tried to validate the claim that Neu5Gc is formed by the catabolism of GABA to glycolyl-CoA, after which the glycolyl moiety is transferred to glucosamine and fed into the sialic acid synthesis pathway. We confirmed this hypothesis by enzymatic assays and radiolabelling.

Last we tried to corroborate our findings by a gene expression analysis of cancer vs. normal cells as the occurrence of some types of sialic acids has been shown to be affected strongly by up- or down-regulation of genes. Result of our analysis was that the expression of two enzymes feeding GABA into the fatty acid oxidation are up-regulated in cancer cells, but no gene of the sugar or sialic acid metabolism showed expression differences.

In sum, Neu5Gc occurrence in human cancer cells depends on several parameters such as GABA abundance and other metabolites present in the cell, activity of glycosyltransferases and amount of glycoproteins expressed on the cell. Neu5Gc turns out to be a metabolic phenomenon which has parallels to another *de novo* synthesized carbohydrate in human cancer cells, i.e. the deaminated sialic acid KDN (2-Keto-3-deoxy-D-glycero-D-galactononic acid). It has been shown that KDN occurrence in cancer cells is caused by high levels of metabolites such as mannose. Neu5Gc seems to be a similar aspect of cancer cell metabolism, while the molecule does not seem to perform those biological functions which it has in animal cells.

## ZUSAMMENFASSUNG

*N*-Glycolylneuraminsäure gehört zur Klasse der Sialinsäuren, einer Gruppe acidischer Zucker mit einem Grundgerüst aus 9 Kohlenstoffatomen. Sialinsäuren sind von zentraler Bedeutung für das zelluläre System, da sie die terminale Position auf Glykanketten einnehmen. In dieser Position sind sie das erste Molekül, mit dem andere Zelloberflächenmoleküle in Berührung kommen. Neu5Gc und Neu5Ac (*N*-Acetylneuraminsäure) sind in tierischen Organismen die am häufigsten vorkommenden Sialinsäuren; im menschlichen Organismus fehlt Neu5Gc, weil das Enzym, das den letzten Schritt der Neu5Gc-Synthese katalysiert, nicht funktional ist. Deswegen enthalten normale menschliche Zellen keine Neu5Gc, und der Organismus entwickelt Antikörper gegen Glykane, die Neu5Gc enthalten. In bestimmten Krebsformen läßt sich Neu5Gc wieder auf der Oberfläche detektieren. Die leitende Frage für die vorliegende Arbeit war es, ob es eine endogene Neu5Gc-Synthese gibt.

Hierzu wurden Mammakarzinomzellen in tierenserumfreien Medium gezogen, um die exogene Zufuhr von Neu5Gc zu stoppen und so einen möglichen endogenen Beitrag am Neu5Gc-Gehalt zu detektieren. Nachdem sichergestellt war, daß auch nach langandauernder serumfreier Kultur ein Teil der Zellen Neu5Gc enthält, bestand der nächste Schritt in einer Suche nach dem endogenen Biosyntheseweg. Es ist hinreichend bekannt, daß gamma-Aminobuttersäure (GABA) in Krebszellen in größerem Umfang vorkommt als in normalen Zellen. Wir versuchten zu verifizieren, ob Neu5Gc durch den Katabolismus des GABA zu Glycolyl-CoA hergestellt wird; nach diesem Abbau könnte die Glycolyl-Gruppe auf Glucosamin übertragen und der Sialinsäurebiosynthese zugeführt werden. Durch Enzymassays und Radiomarkierung von Metaboliten konnte diese Hypothese bestätigt werden.

Anschließend sollten die Befunde durch eine Genexpressionsanalyse validiert werden, da das Vorkommen einiger Formen von Sialinsäuren stark durch eine Hoch- oder Herunterregulierung von Genen beeinflusst wird. Ergebnis der Analyse war, daß zwei der Enzyme, die GABA in den Fettsäuremetabolismus einspeisen, hochreguliert sind; Gene des Zuckerstoffwechsels wiesen allerdings keine Expressionsunterschiede auf.

Resümee der vorliegenden Arbeit ist, daß das Vorkommen von Neu5Gc in Krebszellen von mehreren Parametern abhängt, wie etwa dem Vorkommen von GABA und anderen Metaboliten, der Aktivität der Glykosyltransferasen und der Menge an Glykoproteinen, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Es zeichnet sich ab, daß die endogene Neu5Gc-Synthese Parallelen zur *de novo*-Synthese einer deaminierten Sialinsäure (KDN) in Krebszellen aufweist. Für KDN wurde gezeigt, daß ihr Gehalt in der Zelle direkt von der Verfügbarkeit von Metaboliten wie Mannose abhängt. Neu5Gc könnte sich ebenso als ein Seitenaspekt des Sialinsäuremetabolismus in humanen Krebszellen erweisen - ohne jene biologischen Funktionen zu besitzen, die sie in tierischen Zellen hat.

## 5. Bibliographie

- Altschuler Y, Kinlough CL, Poland PA, Bruns JB, Apodaca G, Weisz OA, Hughey RP. 2000 Clathrin-mediated endocytosis of MUC1 is modulated by its glycosylation state. *Mol Biol Cell*. 2000 Mar;11(3):819-31.
- Andrews GA, Chavey PS, Smith JE, Rich L. *N*-glycolylneuraminic acid and *N*-acetylneuraminic acid define feline blood group A and B antigens. *Blood*. 1992 May 1;79(9):2485-91
- Angata T, Nakata D, Matsuda T, Kitajima K, Troy FA II 1999a Biosynthesis of KDN (2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononic acid). Identification and characterization of a KDN-9-phosphate synthetase activity from trout testis. *J Biol Chem*. 1999 Aug 13;274(33):22949-56.
- Angata T, Nakata D, Matsuda T, Kitajima K. 1999b Elevated expression of free deaminoneuraminic acid in mammalian cells cultured in mannose-rich media. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Aug 2;261(2):326-31
- Angata T, Varki A. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev*. 2002 Feb;102(2):439-69
- Aula N, Jalanko A, Aula P, Peltonen L. Unraveling the molecular pathogenesis of free sialic acid storage disorders: altered targeting of mutant sialin. *Mol Genet Metab*. 2002 Sep-Oct;77(1-2):99-107
- Angata K, Fukuda M. Polysialyltransferases: major players in polysialic acid synthesis on the neural cell adhesion molecule. *Biochimie*. 2003 Jan-Feb;85(1-2):195-206
- Baldus SE, Engelmann K, Hanisch FG. MUC1 and the MUCs: a family of human mucins with impact in cancer biology. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2004;41(2):189-231.
- Bardor M, Nguyen DH, Diaz S, Varki A. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid *N*-glycolylneuraminic acid into human cells. *J Biol Chem*. 2005 Feb 11;280(6):4228-37
- Blix, G. 1936. Über die Kohlenhydratgruppen des Submaxillarismucins. *Z. Physiol. Chem*. 240: 43-54.
- Blix G, Lindberg E, Odin I, Werner I. Sialic acids. *Nature* 175, 340 (1955).
- Bouhours JF, Bouhours D. Hydroxylation of CMP-NeuAc controls the expression of *N*-glycolylneuraminic acid in GM3 ganglioside of the small intestine of inbred rats. *J Biol Chem*. 1989 Oct 15;264(29):16992-9
- Brinkman-Van der Linden EC, Sjöberg ER, Juneja LR, Crocker PR, Varki N, Varki A. Loss of *N*-glycolylneuraminic acid in human evolution. Implications for sialic acid recognition by siglecs. *J Biol Chem*. 2000 Mar 24;275(12):8633-40

- Brockhausen I 1999. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Dec 6;1473(1):67-95.
- Brockhausen I. Sulphotransferases acting on mucin-type oligosaccharides. *Biochem Soc Trans*. 2003 Apr;31(2):318-25
- Brockhausen I. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep*. 2006 Jun;7(6):599-604
- Brooks SC, Locke ER, Soule HD. Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem*. 1973 Sep 10;248(17):6251-3
- Bruses JL, Rutishauser U. Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development. *Biochimie*. 2001 Jul;83(7):635-43
- Bulai T, Bratosin D, Pons A, Montreuil J, Zanetta JP. Diversity of the human erythrocyte membrane sialic acids in relation with blood groups. *FEBS Lett*. 2003 Jan 16;534(1-3):185-9.
- Bustin, SA (ed.) A-Z of Quantitative PCR. IUL Biotechnology, 2004
- Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst*. 1974 Sep;53(3):661-74
- Casals-Stenzel J, Buscher HP, Schauer R. Gas-liquid chromatography of N- and O-acetylated neuramic acids. *Anal Biochem*. 1975 May 12;65(1-2):507-24.
- Chambers RE, Clamp JR 1971. An assessment of methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials *Biochem J*. 1971 December; 125(4): 1009-1018
- Chen Y, Chen S, Li X, Wang X, Zeng S. Genetic variants of human UGT1A3: functional characterization and frequency distribution in a Chinese Han population. *Drug Metab Dispos*. 2006 Sep;34(9):1462-7
- Cheng X, Cole RN, Zaia J, Hart GW. 2000 Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of the murine estrogen receptor beta. *Biochemistry*. 2000 Sep 26;39(38):11609-20
- Chou TY, Hart GW, Dang CV. c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J Biol Chem*. 1995 Aug 11;270(32):18961-5
- Collins BE, Fralich TJ, Itonori S, Ichikawa Y, Schnaar RL. Conversion of cellular sialic acid expression from N-acetyl- to N-glycolylneuraminic acid using a synthetic precursor, N-glycolylmannosamine pentaacetate: inhibition of myelin-associated glycoprotein binding to neural cells. *Glycobiology*. 2000 Jan;10(1):11-20
- Corfield AP, Myerscough N, Warren BF, Durdey P, Paraskeva C, Schauer R. Reduction of sialic acid O-acetylation in human colonic mucins in the adenoma-carcinoma sequence. *Glycoconj J*. 1999 Jun;16(6):307-17

- Crocker PR. Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling. *Curr Opin Struct Biol.* 2002 Oct;12(5):609-15
- Dahlquist, K. D., Salomonis, N., Vranizan, K., Lawlor, S. C., Conklin, B. R. GenMAPP, a new tool for viewing and analyzing microarray data on biological pathways. *Nat Genet* 2002; **31**: 19-20.
- DeDuve C (1975). Exploring cells with a centrifuge. *Science* 189, 186-194.
- Degroote S, Wolthoorn J, van Meer G. The cell biology of glycosphingolipids. *Semin Cell Dev Biol.* 2004 Aug;15(4):375-87
- Deicher, H. (1926). Über die Erzeugung heterospezifischer Hämagglutinine durch Injektion artfremden Serums. *Z. Hyg. Infekt. Krankh.*, 106, 561-57
- Deman JJ, Van Larebeke NA, Bruyneel EA, Bracke ME, Vermeulen SJ, Vennekens KM, Mareel MM. Removal of sialic acid from the surface of human MCF-7 mammary cancer cells abolishes E-cadherin-dependent cell-cell adhesion in an aggregation assay. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1995 Sep;31(8):633-9
- Devine PL, Clark BA, Birrell GW, Layton GT, Ward BG, Alewood PF, McKenzie IF. The breast tumor-associated epitope defined by monoclonal antibody 3E1.2 is an O-linked mucin carbohydrate containing N-glycolylneuraminic acid. *Cancer Res.* 1991 Nov 1;51(21):5826-36.
- Donike M. N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamid, ein neues Silylierungsmittel aus der Reihe der silylierten Amide. *J Chromatogr*, 42 (1969) 103.
- Endo T. Aberrant glycosylation of alpha-dystroglycan and congenital muscular dystrophies. *Acta Myol.* 2005 Oct;24(2):64-9
- Durbec P, Cremer H. Revisiting the function of PSA-NCAM in the nervous system. *Mol Neurobiol.* 2001 Aug-Dec;24(1-3):53-64
- LW Engel, NA Young, TS Tralka, ME Lippman, SJ O'Brien and MJ Joyce Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas *Cancer Research*, Vol 38, Issue 10 3352-3364
- Engelmann K, Baldus SE, Hanisch FG. Identification and topology of variant sequences within individual repeat domains of the human epithelial tumor mucin MUC1. *J Biol Chem.* 2001 Jul 27;276(30):27764-9
- Engelmann K, Kinlough CL, Muller S, Razawi H, Baldus SE, Hughey RP, Hanisch FG. Transmembrane and secreted MUC1 probes show trafficking-dependent changes in O-glycan core profiles. *Glycobiology.* 2005 Nov;15(11):1111-24



- Fahr C, Schauer R. Detection of sialic acids and gangliosides with special reference to 9-O-acetylated species in basalomas and normal human skin. *J Invest Dermatol.* 2001 Feb;116(2):254-60
- Frank SG, Bernard PS 2004. Profiling breast cancer using real-time quantitative PCR, in: Wittwer C, Hahn M, Kaul K., *Rapid-cycle real-time PCR*, Springer, 95-106.
- Franz S, Frey B, Sheriff A, Gaipf US, Beer A, Voll RE, Kalden JR, Herrmann M. Lectins detect changes of the glycosylation status of plasma membrane constituents during late apoptosis. *Cytometry A.* 2006 Apr;69(4):230-9.
- Freire E, Gomes FC, Linden R, Neto VM, Coelho-Sampaio T. Structure of laminin substrate modulates cellular signaling for neuritogenesis. *J Cell Sci.* 2002 Dec 15;115(Pt 24):4867-76
- Freire E, Gomes FC, Jotha-Mattos T, Neto VM, Silva Filho FC, Coelho-Sampaio T. Sialic acid residues on astrocytes regulate neuritogenesis by controlling the assembly of laminin matrices. *J Cell Sci.* 2004 Aug 15;117(Pt 18):4067-76
- Furukawa K, Yamaguchi H, Oettgen HF, Old LJ, Lloyd KO. Analysis of the expression of N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides in cells and tissues using two human monoclonal antibodies. *J Biol Chem.* 1988 Dec 5;263(34):18507-12
- Go S, Sato C, Furuhashi K, Kitajima K. Oral ingestion of mannose alters the expression level of deaminoneuraminic acid (KDN) in mouse organs. *Glycoconj J.* 2006 Jul;23(5-6):411-21
- Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem.* 2001 Aug 1;295(1):17-21.
- Haines N, Irvine KD. Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Oct;4(10):786-97
- Hakomori S. 1986 Tumor-associated glycolipid antigens, their metabolism and organization. *Chem Phys Lipids.* 1986 Dec 15;42(1-3):209-33
- Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 6;99(16):10231-3
- Hakomori S. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res.* 1996 Dec 1;56(23):5309-18
- Hammond MS, Sims C, Parameshwaran K, Suppiramaniam V, Schachner M, Dityatev A. Neural Cell Adhesion Molecule-associated Polysialic Acid Inhibits NR2B-containing N-Methyl-D-aspartate Receptors and Prevents Glutamate-induced Cell Death. *J. Biol. Chem.* 281, 34859-34869 (2006).

Hang HC, Bertozzi CR. The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorg Med Chem*. 2005 Sep 1;13(17):5021-34

Hanganutziu, M. (1924). Hémagglutinines hétérogénétiques après injection de sérum de cheval. *C. R. Séances Soc. Biol.*, 91, 1457–1459.

Hanisch FG. O-glycosylation of the mucin type. *Biol Chem*. 2001 Feb;382(2):143-9

Hanisch FG, Müller S. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology*. 2000 May;10(5):439-49

Hanisch FG, Ninkovic T. Immunology of O-glycosylated proteins: approaches to the design of a MUC1 glycopeptide-based tumor vaccine. *Curr Protein Pept Sci*. 2006 Aug;7(4):307-15

Hanisch FG, Stadie TR, Deutzmann F, Peter-Katalinic J. MUC1 glycoforms in breast cancer-cell line T47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation. *Eur J Biochem*. 1996 Feb 15;236(1):318-27

Hanisch FG, Witter B, Crombach GA, Schänzer W, Uhlenbruck G 1992. N-glycolylneuraminic acid is a chemical marker of gangliosides from human breast cancer, in: Klapdor R (ed.), Tumor associated antigens, oncogenes, receptors, cytokines in tumor diagnosis and therapy at the beginning of the nineties, Zuckschwerdt, 367 – 370.

Higashi, H., Naiki, M., Matsuo, S., and Okouchi, K. (1977) Antigen of "serum sickness" type of heterophile antibodies in human sera: Identification as gangliosides with JV-glycolylneuraminic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 79, 388-395

Higashi H, Sasabe T, Fukui Y, Maru M, Kato S. Detection of gangliosides as N-glycolylneuraminic acid-specific tumor-associated Hanganutziu-Deicher antigen in human retinoblastoma cells. *Jpn J Cancer Res*. 1988 Aug;79(8):952-6

Higashi H, Hirabayashi Y, Fukui Y, Naiki M, Matsumoto M, Ueda S, Kato S. Characterization of N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides as tumor-associated Hanganutziu-Deicher antigen in human colon cancer. *Cancer Res*. 1985 Aug;45(8):3796-802

Hoffmann K. Studien zur Bedeutung des neuralen Zelladhäsionsmoleküls und der Polysialinsäure in der Entstehung von Valproinsäure-induzierten Neuralrohrdefekten. Diss. Hannover, Tierärztliche Hochschule, 2004

Hoppe-Seyler F. *Physiologische Chemie*, August Hirschwald Verlag, 1887-1881

Horwitz KB, Zava DT, Thilagar AK, Jensen EM, McGuire WL. Steroid receptor analyses of nine human breast cancer cell lines. *Cancer Res*. 1978 Aug;38(8):2434-7

Inoue S, Kitajima K, Inoue Y. Identification of 2-keto-3-deoxy-D-glycero-galactononic acid (KDN, deaminoneuraminic acid) residues in mammalian tissues and human lung carcinoma cells. Chemical evidence of the occurrence of KDN glycoconjugates in mammals. *J Biol Chem*. 1996 Oct 4;271(40):24341-4.

- Inoue S, Kanamori A, Kitajima K, Inoue Y. KDN-glycoprotein: a novel deaminated neuraminic acid-rich glycoprotein isolated from vitelline envelope of rainbow trout eggs. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988 May 31;153(1):172-6
- Inoue S, Kitajima K. KDN (Deaminated neuraminic acid): Dreamful past and exciting future of the newest member of the sialic acid family. *Glycoconj J.* 2006 Jul;23(5-6):277-90
- Iwasaki M, Inoue S, Troy FA. A new sialic acid analogue, 9-O-acetyl-deaminated neuraminic acid, and alpha -2,8-linked O-acetylated poly(N-glycolylneuraminy) chains in a novel polysialoglycoprotein from salmon eggs. *J Biol Chem.* 1990 Feb 15;265(5):2596-602
- Johnson D, Montpetit ML, Stocker PJ, Bennett ES. The sialic acid component of the beta1 subunit modulates voltage-gated sodium channel function. *J Biol Chem.* 2004 Oct 22;279(43):44303-10
- Jourdian GW, Roseman S. The sialic acids. II. Preparation of N-glycolylhexosamines, N-glycolylhexosamine-6-phosphates, glycolyl coenzyme A, and glycolyl glutathione. *Journal of Biological Chemistry* 1958, 237 (8), 2442- 2453.
- Julien S, Adriaenssens E, Ottenberg K, Furlan A, Courtand G, Vercoutter-Edouart AS, Hanisch FG, Delannoy P, Le Bourhis X. ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumourigenicity. *Glycobiology.* 2006 Jan;16(1):54-64
- Kamerling, JP; Vink, J.; Vliegthart, JFG 1974 Mass spectrometry of pertrimethylsilyl neuraminic acid derivatives. *Carbohydr. Res.* 33, 297-306
- Kamerling JP, Vliegthart JFG 1989. *Carbohydrates*, in:Lawson AM (ed.), *Mass spectrometry.* DeGruyter, 175-263
- Kawai T, Kato A, Higashi H, Kato S, Naiki M. Quantitative determination of N-glycolylneuraminic acid expression in human cancerous tissues and avian lymphoma cell lines as a tumor-associated sialic acid by gas chromatography-mass spectrometry. *Cancer Res.* 1991 Feb 15;51(4):1242-6
- Kitazume S, Kitajima K, Inoue S, Haslam SM, Morris HR, Dell A, Lennarz WJ, Inoue Y. The occurrence of novel 9-O-sulfated N-glycolylneuraminic acid-capped alpha2-->5-Oglycolyl-linked oligo/polyNeu5Gc chains in sea urchin egg cell surface glycoprotein. Identification of a new chain termination signal for polysialyltransferase. *J Biol Chem.* 1996 Mar 22;271(12):6694-701
- Klenk, E. 1941. Neuraminsäure, das Spaltprodukt eines neuen Gehirnlipoids. *Z. Physiol. Chem.* 268: 50-58.
- Klenk HD, Wagner R, Heuer D, Wolff T. 2002 Importance of hemagglutinin glycosylation for the biological functions of influenza virus. *Virus Res.* 2002 Jan 30;82(1-2):73-5.

Klominek J, Robert KH, Hjerpe A, Wickstrom B, Gahrton G. Serum-dependent growth patterns of two, newly established human mesothelioma cell lines. *Cancer Res.* 1989 Nov 1;49(21):6118-22

Knapp DR, *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*, Wiley and Sons, 1979

Koda T, Aosasa M, Asaoka H, Nakaba H, Matsuda H. Application of tyramide signal amplification for detection of N-glycolylneuraminic acid in human hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol.* 2003 Oct;8(5):317-21.

Kolter T, Sandhoff K. Sialic acids - why always alpha-linked? *Glycobiology.* 1997 Oct;7(7):vii-ix

Komminoth P, Roth J, Lackie PM, Bitter-Suermann D, Heitz PU. Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule distinguishes small cell lung carcinoma from carcinoids. *Am J Pathol.* 1991 Aug;139(2):297-304

Kozarsky K, Kingsley D, Krieger M. Use of a mutant cell line to study the kinetics and function of O-linked glycosylation of low density lipoprotein receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jun;85(12):4335-9

Kroll T, Odyvanova L, Clement JH, Platzer C, Naumann A, Marr N, Hoffken K, Wolfl S. Molecular characterization of breast cancer cell lines by expression profiling. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2002 Mar;128(3):125-34

Kuboki, A., Okazaki, H., Sugai, T., and Ohta, H. (1997) An expeditions route to N-glycolylneuraminic acid based on enzyme-catalyzed reaction. *Tetrahedron*, 53, 2387–2400

Kudoh S, Sato T, Okada H, Kumakura H, Nakamura H. Simultaneous determination of granisetron and 7-hydroxygranisetron in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1994 Oct 3;660(1):205-10

Lamari FN, Karamanos NK. Separation methods for sialic acids and critical evaluation of their biologic relevance. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002 Dec 5;781(1-2):3-19

Lantuejoul S, Moro D, Michalides RJ, Brambilla C, Brambilla E. Neural cell adhesion molecules (NCAM) and NCAM-PSA expression in neuroendocrine lung tumors. *Am J Surg Pathol.* 1998 Oct;22(10):1267-76

Lawrence SM, Huddleston KA, Pitts LR, Nguyen N, Lee YC, Vann WF, Coleman TA, Betenbaugh MJ. Cloning and expression of the human N-acetylneuraminic acid phosphate synthase gene with 2-keto-3-deoxy-D-glycero- D-galacto-nononic acid biosynthetic ability. *J Biol Chem.* 2000 Jun 9;275(23):17869-77

Li, C., Wong, W. H. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 31-6.

- Love DC, Hanover JA. The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code". *Sci STKE*. 2005 Nov 29;2005(312):re13
- Luchansky SJ, Bertozzi CR. Azido sialic acids can modulate cell-surface interactions. *ChemBiochem*. 2004 Dec 3;5(12):1706-9
- Luchansky SJ, Goon S, Bertozzi CR. 2004 Expanding the diversity of unnatural cell-surface sialic acids. *ChemBiochem*. 2004 Mar 5;5(3):371-4.
- Malykh YN, King TP, Logan E, Kelly D, Schauer R, Shaw L. Regulation of N-glycolylneuraminic acid biosynthesis in developing pig small intestine. *Biochem J*. 2003 Mar 1;370(Pt 2):601-7
- Malykh YN, Schauer R, Shaw L. N-Glycolylneuraminic acid in human tumours. *Biochimie*. 2001 Jul;83(7):623-34.
- Mann B, Klussmann E, Vandamme-Feldhaus V, Iwersen M, Hanski ML, Riecken EO, Buhr HJ, Schauer R, Kim YS, Hanski C. Low O-acetylation of sialyl-Le(x) contributes to its overexpression in colon carcinoma metastases. *Int J Cancer*. 1997 Jul 17;72(2):258-64
- Martin MJ, Rayner JC, Gagneux P, Barnwell JW, Varki A. Evolution of human-chimpanzee differences in malaria susceptibility: relationship to human genetic loss of N-glycolylneuraminic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 6;102(36):12819-24
- Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science*. 2006 Jun 16;312(5780):1650-3
- Matuszek M, Jesipowicz M, Kleinrok Z. GABA content and GAD activity in gastric cancer. *Med Sci Monit*. 2001 May-Jun;7(3):377-81
- Mawhinney TP, Chance DL. Hydrolysis of sialic acids and O-acetylated sialic acids with propionic acid. *Anal Biochem*. 1994 Nov 15;223(1):164-7
- Mazurkiewicz M, Opolski A, Wietrzyk J, Radzikowski C, Kleinrok Z. GABA level and GAD activity in human and mouse normal and neoplastic mammary gland. *J Exp Clin Cancer Res*. 1999 Jun;18(2):247-53
- Medzihradsky KF. Characterization of protein N-glycosylation. *Methods Enzymol*. 2005;405:116-38
- Merrick JM, Zadarlik K, Milgrom F. Characterization of the Hanganutziu-Deicher (serum-sickness) antigen as gangliosides containing n-glycolylneuraminic acid. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1978;57(5):477-80
- Mitra N, Sinha S, Ramya TN, Surolia A. 2006 N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends Biochem Sci*. 2006 Mar;31(3):156-63

- Miwa Y, Kobayashi T, Nagasaka T, Liu D, Yu M, Yokoyama I, Suzuki A, Nakao A. Are N-glycolylneuraminic acid (Hanganutziu-Deicher) antigens important in pig-to-human xenotransplantation? *Xenotransplantation*. 2004 May;11(3):247-53.
- Miyazaki K, Ohmori K, Izawa M, Koike T, Kumamoto K, Furukawa K, Ando T, Kiso M, Yamaji T, Hashimoto Y, Suzuki A, Yoshida A, Takeuchi M, Kannagi R. Loss of disialyl Lewis(a), the ligand for lymphocyte inhibitory receptor sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-7 (Siglec-7) associated with increased sialyl Lewis(a) expression on human colon cancers. *Cancer Res*. 2004 Jul 1;64(13):4498-505
- Muchmore EA, Milewski M, Varki A, Diaz S. Biosynthesis of N-glycolylneuraminic acid. The primary site of hydroxylation of N-acetylneuraminic acid is the cytosolic sugar nucleotide pool. *J Biol Chem*. 1989 Dec 5;264(34):20216-23
- Müller S, Hanisch FG. Recombinant MUC1 probe authentically reflects cell-specific O-glycosylation profiles of endogenous breast cancer mucin. High density and prevalent core 2-based glycosylation. *J Biol Chem*. 2002 Jul 19;277(29):26103-12
- Murphy CL, Polak JM. GAPDH, but neither HPRT nor beta-tubulin is suitable as an internal standard for measuring RNA levels. *Tissue Eng*. 2002 Aug;8(4):551-9.
- Nadano D, Iwasaki M, Endo S, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y A naturally occurring deaminated neuraminic acid, 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid (KDN). Its unique occurrence at the nonreducing ends of oligosialyl chains in polysialoglycoprotein of rainbow trout eggs. *J Biol Chem*. 1986 Sep 5;261(25):11550-7.
- O'Neill PA, Shaaban AM, West CR, Dodson A, Jarvis C, Moore P, Davies MPA, Sibson DR, Foster CS. Increased risk of malignant progression in benign proliferating breast lesions defined by expression of heat shock protein 27 *British Journal of Cancer* (2004) 90, 182-188.
- Nicholson-Guthrie CS, Guthrie GD, Sutton GP, Baenziger JC. Urine GABA levels in ovarian cancer patients: elevated GABA in malignancy. *Cancer Lett*. 2001 Jan 10;162(1):27-30
- Nyormoi O, Bar-Eli M. Transcriptional regulation of metastasis-related genes in human melanoma. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20(3):251-63
- Oetke C, Brossmer R, Mantey LR, Hinderlich S, Isecke R, Reutter W, Keppler OT, Pawlita M. 2002 Versatile biosynthetic engineering of sialic acid in living cells using synthetic sialic acid analogues. *J Biol Chem*. 2002 Feb 22;277(8):6688-95
- Ogata S, Maimonis PJ, Itzkowitz SH. Mucins bearing the cancer-associated sialosyl-Tn antigen mediate inhibition of natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res*. 1992 Sep 1;52(17):4741-6

- Opolski A, Mazurkiewicz M, Wietrzyk J, Kleinrok Z, Radzikowski C. The role of GABA-ergic system in human mammary gland pathology and in growth of transplantable murine mammary cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2000 Sep;19(3):383-90
- Ohtsubo K, Marth JD. 2006 Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell.* 2006 Sep 8;126(5):855-67.
- Peter-Katalinic J. Methods in enzymology: O-glycosylation of proteins. *Methods Enzymol.* 2005;405:139-71
- Qu B, Ziak M, Zuber C, Roth J. Poly (alpha 2,8-deaminoneuraminic acid) is expressed in lung on a single 150-kDa glycoprotein and is an oncodevelopmental antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Aug 20;93(17):8995-8
- Reuter G, Schauer R, Determination of sialic acids, in: Lennarz, WJ and Hart, GW, *Guide to Techniques in Glycobiology*, Academic Press 1994, 168-199.
- Rimmer DA, Johnson PD, Brown RH. Determination of phenoxy acid herbicides in vegetation, utilising high-resolution gel permeation chromatographic clean-up and methylation with trimethylsilyldiazomethane prior to gas chromatographic analysis with mass-selective detection. *J Chromatogr A.* 1996 Dec 6;755(2):245-50
- Rosenberg A (ed.), *Biology of the sialic acids*, Plenum 1994
- Rutledge RG, Cote C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res.* 2003 Aug 15;31(16):e93
- Sato C, Kitajima K, Tazawa I, Inoue Y, Inoue S, Troy FA 2nd. Structural diversity in the alpha 2-->8-linked polysialic acid chains in salmonid fish egg glycoproteins. Occurrence of poly(Neu5Ac), poly(Neu5Gc), poly(Neu5Ac, Neu5Gc), poly(KDN), and their partially acetylated forms. *J Biol Chem.* 1993 Nov 5;268(31):23675-84
- Schauer R. Sialic acids and their role as biological masks. *Trends. Biochem. Sc,* 1985, 10, 357-360
- Schauer R. (2004). Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology (Jena)*, 107, 49-64
- Schauer R, Schmid H, Pommerencke J, Iwersen M, Kohla G. Metabolism and role of O-acetylated sialic acids. *Adv Exp Med Biol.* 2001;491:325-42
- Schauer R. Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconj J.* 2000 Jul-Sep;17(7-9):485-99
- Schauer R, de Freese A, Gollub M, Iwersen M, Kelm S, Reuter G, Schlenzka W, Vandamme-Feldhaus V, Shaw L. Functional and biosynthetic aspects of sialic acid diversity. *Indian J Biochem Biophys.* 1997 Feb-Apr;34(1-2):131-41

- Schauer R. Biosynthesis and function of N- and O-substituted sialic acids. *Glycobiology*. 1991 Nov;1(5):449-52.
- Schauer R, Stoll S, Reuter G. Differences in the amount of N-acetyl- and N-glycoloylneuraminic acid, as well as O-acylated sialic acids, of fetal and adult bovine tissues. *Carbohydr Res*. 1991 Jun 25;213:353-9
- Schauer R., Sialic acids as antigenic determinants of complex carbohydrates. *Adv Exp Med Biol*. 1988;228:47-72
- Schauer R. (ed.), Sialic acids 1988: Proceedings of the Japanese German Symposium on Sialic Acids, May 18 - 21, 1988, Verlag Wissenschaft und Bildung
- Schauer und Corfield
- Schauer R. (ed.), Sialic acids : Chemistry, metabolism and function, Springer
- Schwarzkopf et al. 2002
- Semenza GL, Artemov D, Bedi A, Bhujwala Z, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Ravi R, Simons J, Taghavi P, Zhong H. 'The metabolism of tumours': 70 years later. *Novartis Found Symp*. 2001;240:251-60
- Shaw L, Schauer R. The biosynthesis of N-glycoloylneuraminic acid occurs by hydroxylation of the CMP-glycoside of N-acetylneuraminic acid. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1988 Jun;369(6):477-86
- Shen Y, Tiralongo J, Kohla G, Schauer R. Regulation of sialic acid O-acetylation in human colon mucosa. *Biol Chem*. 2004 Feb;385(2):145-52
- Sherblom AP, Dahlin CE. N-Acetylneuraminic acid and N-glycoloylneuraminic acid in the O-linked oligosaccharides of a tumor cell glycoprotein. Incorporation and distribution. *J Biol Chem*. 1985 Feb 10;260(3):1484-92
- Shih LM, Hsu MY, Palazzo JP, Herlyn M. The cell-cell adhesion receptor Mel-CAM acts as a tumor suppressor in breast carcinoma. *Am J Pathol*. 1997 Sep;151(3):745-51.
- Simon P, Spilcke-Liss E, Wallaschofski H. Endocrine tumors of the pancreas. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2006 Jun;35(2):431-47
- Simpson H, Chusney GD, Crook MA, Pickup JC. Serum sialic acid enzymatic assay based on microtitre plates: application for measuring capillary serum sialic acid concentrations. *Br J Biomed Sci*. 1993 Jun;50(2):164-7.
- Smits SL, Gerwig GJ, van Vliet AL, Lissenberg A, Briza P, Kamerling JP, Vlasak R, de Groot RJ. Nidovirus sialate-O-acetyl esterases: evolution and substrate specificity of coronaviral and toroviral receptor-destroying enzymes. *J Biol Chem*. 2005 Feb 25;280(8):6933-41
- Smythe C, Cohen P. The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis *European Journal of Biochemistry*, 1991, Vol 200, 625-631



- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51: 1409•1416
- Stampfer MR, Yaswen P, Taylor-Papadimitriou J 2002. Culture of human mammary epithelial cells, in: Freshney RI, Freshney MG, *Culture of epithelial cells*, Wiley, 95-136.
- Tang L; Deng L, Dynamic kinetic resolution via dual-function catalysis of modified cinchona alkaloids: Asymmetric synthesis of alpha- hydroxy carboxylic acids. *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY* 124(12):2870-2871
- Tangvoranuntakul P, Gagneux P, Diaz S, Bardor M, Varki N, Varki A, Muchmore E. Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 14;100(21):12045-50
- Tiralongo J, Schmid H, Thun R, Iwersen M, Schauer R. Characterisation of the enzymatic 4-O-acetylation of sialic acids in microsomes from equine submandibular glands. *Glycoconj J*. 2000 Dec;17(12):849-58
- Tse GM, Ma TK, Chu WC, Lam WW, Poon CS, Chan WC. Neuroendocrine differentiation in pure type mammary mucinous carcinoma is associated with favorable histologic and immunohistochemical parameters. *Mod Pathol*. 2004 May;17(5):568-72
- Tzanakakis GN, Syrokou A, Kanakis I, Karamanos NK. Determination and distribution of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acids in culture media and cell-associated glycoconjugates from human malignant mesothelioma and adenocarcinoma cells. *Biomed Chromatogr*. 2006 May;20(5):434-9.
- Uslu C, Taysi S, Akcay F, Sutbeyaz MY, Bakan N. Serum free and bound sialic acid and alpha-1-acid glycoprotein in patients with laryngeal cancer. *Ann Clin Lab Sci*. 2003 Spring;33(2):156-9
- Vamecq J, Draye JP. Interactions between the omega- and beta-oxidations of fatty acids. *J Biochem (Tokyo)*. 1987 Jul;102(1):225-34
- Vamecq J, Draye JP, Poupaert JH. Studies on the metabolism of glycolyl-CoA. *Biochem Cell Biol*. 1990 May;68(5):846-51
- Vamecq J, Mestdagh N, Henichart JP, Poupaert J. Traitement métabolique du cancer. *J Pharm Belg*. 1990 Nov-Dec;45(6):361-74
- Varki A. Loss of N-glycolylneuraminic acid in humans: Mechanisms, consequences, and implications for hominid evolution. *Am J Phys Anthropol*. 2001;Suppl 33:54-69.
- Varki, A. (1994). Selectin ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 91: 7390-97
- Varki A. 2006 Nothing in glycobiology makes sense, except in the light of evolution. *Cell*. 2006 Sep 8;126(5):841-5.
- Varki A. N-glycolylneuraminic acid deficiency in humans. *Biochimie*. 2001 Jul;83(7):615-22

- Varki A, Diaz S. The release and purification of sialic acids from glycoconjugates: methods to minimize the loss and migration of O-acetyl groups. *Anal Biochem.* 1984 Feb;137(1): 236-47
- Varki A, Angata T. Siglecs--the major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology.* 2006 Jan;16(1):1R-27R
- Veiga SS, Chammas R, Cella N, Brentani RR, Glycosylation of beta-1 integrins in B16-F10 mouse melanoma cells as determinant of differential binding and acquisition of biological activity. *Int. J. Cancer* **61** (1995), pp. 420-424.
- Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J Biol Chem.* 1959 Aug;234(8): 1971-1975
- Wesseling J, van der Valk SW, Vos HL, Sonnenberg A, Hilkens J. Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *J Cell Biol.* 1995 Apr;129(1):255-65
- Westley B, Rochefort H. A secreted glycoprotein induced by estrogen in human breast cancer cell lines. *Cell.* 1980 Jun;20(2):353-62
- Yin J, Hashimoto A, Izawa M, Miyazaki K, Chen GY, Takematsu H, Kozutsumi Y, Suzuki A, Furuhashi K, Cheng FL, Lin CH, Sato C, Kitajima K, Kannagi R. Hypoxic culture induces expression of sialin, a sialic acid transporter, and cancer-associated gangliosides containing non-human sialic acid on human cancer cells. *Cancer Res.* 2006, 66(6), 2937-4
- Zanetta JP, Pons A, Iwersen M, Mariller C, Leroy Y, Timmerman P, Schauer R. Diversity of sialic acids revealed using gas chromatography/mass spectrometry of heptafluorobutyrate derivatives. *Glycobiology.* 2001 Aug;11(8):663-76.
- Zanetta JP, Srinivasan V, Schauer R. Analysis of monosaccharides, fatty constituents and rare O-acetylated sialic acids from gonads of the starfish *Asterias rubens* *Biochimie* 2006 Feb;88(2):171-8.
- Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jun 16;259(3):523-6.
- Zhu A, Hurst R. Anti-N-glycolylneuraminic acid antibodies identified in healthy human serum. *Xenotransplantation.* 2002 Nov;9(6):376-81
- Ziak M, Meier M, Novak-Hofer I, Roth J. Ceruloplasmin carries the anionic glycan oligo/poly alpha2,8 deaminoneuraminic acid. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jul 19;295(3):597-602
- Ziak M, Roth J. Expression of oligo/poly  $\alpha$ 2,8-linked deaminoneuraminic acid and megalin during kidney development and maturation: mutually exclusive distribution with







polyalpha2,8-linked N-acetylneuraminic acid of N-CAM. *Histochem Cell Biol.* 1999 Aug;112(2):169-78

Ziak M, Qu B, Zuo X, Zuber C, Kanamori A, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y, Roth J. Occurrence of poly( $\alpha$ 2,8-deaminoneuraminic acid) in mammalian tissues: widespread and developmentally regulated but highly selective expression on glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 2;93(7):2759-6

Zutter MM, Sun H, Santoro SA. Altered integrin expression and the malignant phenotype: the contribution of multiple integrated integrin receptors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1998 Apr;3(2):191-200

## Abkürzungen

### 1. Moleküle

Fuc	Fucose, Farbsymbol:	
Gal	Galactose, Farbsymbol:	
GalN	Galactosamin	
GalNAc	N-Acetylgalactosamin, Farbsymbol:	
Glc	Glucose, Farbsymbol:	
GlcN	Glucosamin	
GlcNAc	N-Acetylglucosamin, Farbsymbol:	
GlcNAc	N-Glycolylglucosamin	
KDN	<i>2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid</i>	
Man	Mannose	
ManN	Mannosamin	
ManNAc	N-Acetylmannosamin	
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure, Farbsymbol:	
Neu5Ac8Me	8-Methyl-N-Acetylneuraminsäure	
Neu5Gc	N-Glycolylneuraminsäure	
NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>	
PSA	<i>Polysialic acid</i>	
MUC1-S	sezerniertes MUC1	
CoA	Coenzym A	
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>	

## 2. Verfahren

GC/MS	gekoppelte Gaschromatographie-Massenpektrometrie
HPLC	<i>High Pressure (oder: Performance) Liquid Chromatography</i>
MALDI-TOF MS	<i>Matrix assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry</i>
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>

## 3. Genetik

ABAT	<i>4-aminobutyrate aminotransferase</i>
ACADSB	<i>Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain</i>
ACADS	<i>Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain</i>
AKRA	<i>Aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase)</i>
BDH	<i>3-hydroxybutyrate dehydrogenase</i>
BUCS	<i>Butyryl Coenzyme A synthetase 1</i>
EHHADH	<i>Enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase</i>
HADHSC	<i>L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain</i>
ST3GAL1	<i>ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1</i>
qrt-PCR	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i>

## 4. Sonstiges

FCS	<i>Fetal calf serum</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

## Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit -einschließlich Tabellen und Abbildungen -, die anderen Werke im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht ist, sowie, dass ich eine Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Franz-Georg Hanisch betreut worden.

Köln, den 12.09.2006.

Frühere Veröffentlichungen:

von Elstermann M, Hanisch FG. Endogenous biosynthesis of *N*-glycolylneuramate in human mammary carcinoma cells. Poster presented at the Joint meeting of the Society for Glycobiology, Wageningen, 28.- 30.11.2004

von Elstermann M, Malykh Y, Hanisch FG. Endogenous synthesis of *N*-glycolylneuramate in human breast cancer cells. Poster presented at Mucin in Health and Disease, 8th International Workshop on Carcinoma-associated Mucins, Robinson College, Cambridge (UK), 8 – 13 July 2005.

**Lebenslauf****Persönliche Daten:**

Name,Vorname: von Elstermann, Mirko  
 Anschrift: Kapitelstr 21  
 51103 Köln  
 Geburtsdatum: 12.07.1970  
 Geburtsort: Bergisch Gladbach  
 Staatsangehörigkeit: deutsch  
 Familienstand: ledig  
 Eltern: Wilhelm-Peter von Elstermann und Gerda von Elstermann geb. Rosell

**Schulbildung**

1976-1980 Kath. Grundschule Berg. Gladbach-Paffrath  
 1980-1989 Nicolaus-Cusanus-Gymnasium Berg. Gladbach

**Zivildienst**

1989-1991 Caritashaus Margarethenhöhe, Berg. Gladbach

**Studium**

1991/92 – Jan. 1997 Philosophie, Allgemeine Sprachwissenschaften und Geschichte  
 an der Universität zu Köln, Abschluß: Magister Artium

1996/97- Sept. 2002 Biologie mit den Schwerpunkten Biochemie, Genetik und  
 Organische Chemie im Haputstudium, Abschluß: Diplom

April 2003 -Okt 2006 Dissertation bei Prof. Dr. Franz-Georg Hanisch am Institut für  
 Biochemie der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln mit dem  
 Ziel derPromotion an der Math. Nat. Fakultät der Universität zu Köln

Köln, den 12.09.2006