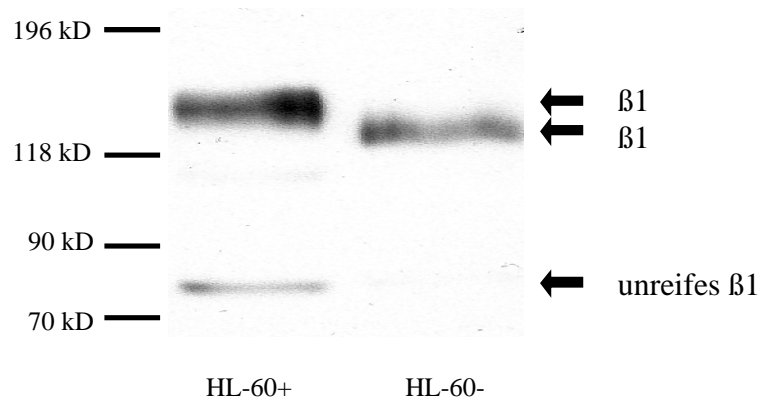


### 3. Ergebnisse

#### 3.1 $\beta$ 1-Integrine hoch- und niedrigsialylierter HL-60-Zellen

##### 3.1.1 $\beta$ 1-Integrinexpression

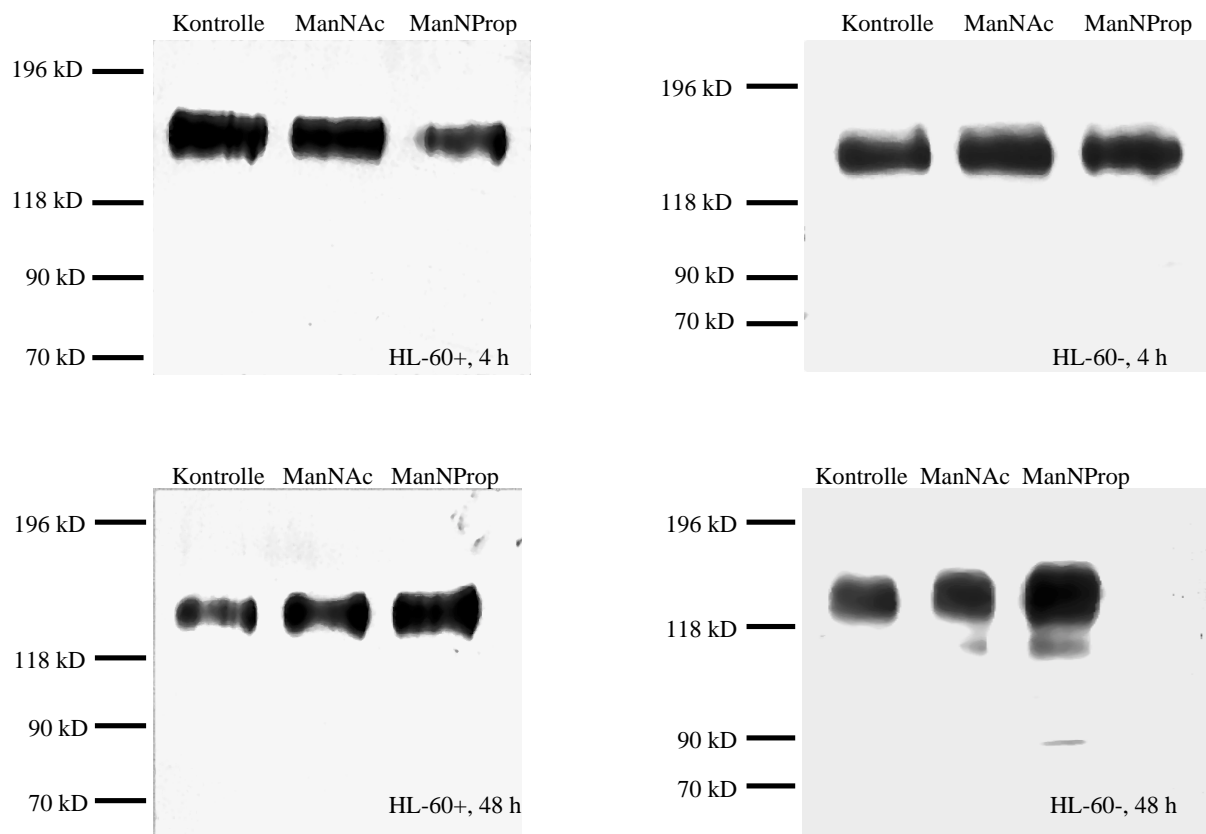
Die Expression des  $\beta$ 1-Integrins wurde in hoch- und niedrigsialylierten HL-60-Zellen mittels Westernblot-Analyse gemessen (Abb. 6). Sowohl in den hochsialylierten als auch in den niedrigsialylierten HL-60-Zellen detektiert der mAk 18  $\beta$ 1-Integrine. Dabei unterscheiden sich die apparenten Molekulargewichte. Hochsialylierte HL-60-Zellen exprimieren das  $\beta$ 1-Integrin bei 130 kD, während niedrigsialylierte HL-60-Zellen es bei 120 kD exprimieren (lit. 130 kD in reduzierter Form). Weiterhin ist zu sehen, daß hochsialylierte Zellen mehr  $\beta$ 1-Integrin exprimieren als niedrigsialylierte.



**Abb. 6: Nachweis von  $\beta$ 1-Integrin in hochsialylierten (+) und niedrigsialylierten (-) HL-60-Zellen mittels Westernblot.** Die Zellen wurden in Triton-X-100 Puffer solubilisiert, und die Lysate durch 7,5%-SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Übertragung auf Nitrozellulose erfolgte der Nachweis von  $\beta$ 1-Integrin mit dem mAk 18.

### 3.1.2 Einfluß von ManNProp auf die $\beta$ 1-Integrinesamtkonzentration

Zunächst sollte mittels Westernblot-Analyse gemessen werden, ob die Applikation von ManNProp und die daraus resultierende Expression von Neu5Prop die  $\beta$ 1-Integrinesamtkonzentration (intrazelluläre und membranäre Konzentrationen) in hoch- und niedrigsialylierten HL-60-Zellen beeinflusst. Hoch- und niedrigsialylierte HL-60-Kulturen wurden 4 h, 24 h, 48 h und 72 h in Gegenwart oder Abwesenheit von 10mM ManNProp bzw. ManNAc kultiviert (Abb. 7).



**Abb. 7: Nachweis von  $\beta$ 1-Integrin mittels Westernblot nach Stimulation mit ManNAc bzw. ManNProp.** Hoch- (+) und niedrigsialylierte (-) HL-60-Zellen wurden 4 h, 24 h, 48 h und 72 h mit 10 mM ManNAc und 10 mM ManNProp inkubiert. Die Zellen wurden in Triton-X100-Puffer solubilisiert, und die Lysate im 7,5%-SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Übertragung auf Nitrozellulose erfolgte der Nachweis von  $\beta$ 1-Integrin mit dem mAk 18. Dargestellt sind die Ergebnisse der 4 h- und 48 h-Experimente.

Die  $\beta$ 1-Integrinesamtkonzentrationen in niedrigsialylierten HL-60-Zellen nach 4 h ManNAc- und ManNProp-Inkubation unterscheiden sich nicht von der Kontrolle. Hingegen mißt man bei hochsialylierten HL-60-Zellen nach 4 h ManNAc- und ManNProp-Inkubation eine deutliche Abnahme der  $\beta$ 1-Integrinkonzentrationen gegenüber der Kontrolle. Wobei der  $\beta$ 1-Integrinkonzentrationsgradient zwischen Kontrolle und ManNAc-behandelten Zellen gering ausfällt und deutlich größer ist zwischen ManNAc- und ManNProp-behandelten Zellen.

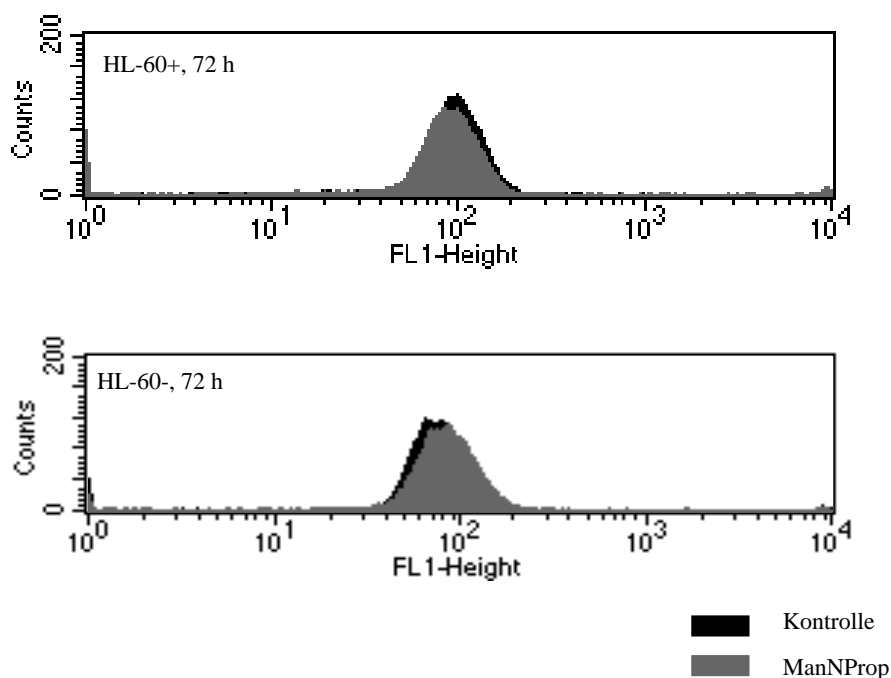
Nach 48 h ManNAc- und ManNProp-Inkubation steigt die  $\beta$ 1-Integrinesamtkonzentration sowohl in den niedrig- als auch in den hochsialylierten HL-60-Zellen an. Im Gegensatz zum 4 h-Ansatz nimmt hier die  $\beta$ 1-Integrinkonzentration graduell nach ManNAc- und ManNProp-Inkubation in beiden Zellreihen zu, wobei das Konzentrationsmaximum durch ManNProp hervorgerufen wird.

Dieser Versuch zeigt, daß die  $\beta$ 1-Integrinesamtexpression durch natürliche und durch N-Acyl-spezifisch modifizierte Sialinsäurevorläufer zeitabhängig beeinflußt wird. Die Kurzzeitinkubation bewirkt eine Konzentrationsabnahme, außer bei niedrigsialylierten HL-60-Zellen, und die Langzeitinkubation führt zu einer Konzentrationszunahme der gesamten  $\beta$ 1-Integrine.

Außerdem zeigt sich auch hier (Abb. 7), daß das Mr des  $\beta$ 1-Integrins niedrigsialylierter HL-60-Zellen niedriger ist als das Mr hochsialylierter HL-60-Zellen (vgl. Abb. 6). In beiden Zellreihen ist die unreife  $\beta$ 1-Integrinform (MG 80-90 kDa) nachweisbar (Abb. 6 und Abb. 7).

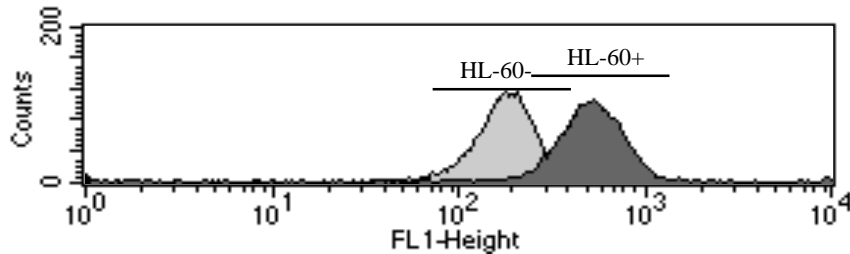
### 3.1.3 Einfluß von ManNProp auf die membranäre $\beta$ 1-Integrinkonzentration

In den folgenden Experimenten sollte mittels FACS-Analyse geprüft werden, ob die in Abb. 7 ermittelten Konzentrationsveränderungen des  $\beta$ 1-Integrins durch ManNProp mit Konzentrationsveränderungen auf der Zelloberfläche einhergehen.



**Abb. 8: Nachweis von membranärem  $\beta$ 1-Integrin in hoch- (+) und niedrigsialylierten (-) HL-60-Zellen mittels FACS-Analyse.**  $2 \times 10^6$  Zellen (nicht konfluent) wurden 4 h, 48 h (nicht gezeigt) und 72 h mit 10 mM ManNAc bzw. 10 mM ManNProp inkubiert und mit dem  $\beta$ 1-Integrin-mAk K20 im FACScan ausgewertet. Dargestellt sind die Verteilungskurven der Fluoreszenzintensitäten aus der Kontrolle und der 72 h-Fraktion.

Die in Abb. 8 dargestellten Verteilungskurven der Fluoreszenzintensitäten spiegeln die Konzentrationsverhältnisse der membranären  $\beta$ 1-Integrine zwischen den Kontrollen und den ManNProp-behandelten Zellen wider. Je intensiver die Fluoreszenz ist, desto höher ist die  $\beta$ 1-Integrinkonzentration. Die  $\beta$ 1-Integrinkonzentration auf der Zelloberfläche bleibt nach 4 h bis 72 h ManNProp-Inkubation in beiden Zellreihen unverändert.



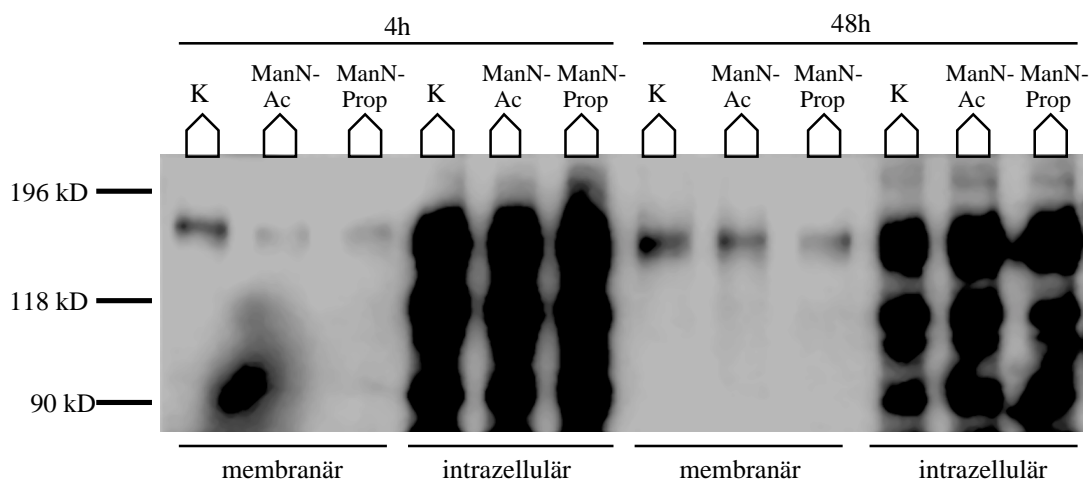
**Abb. 9:** Nachweis von membranärem  $\beta 1$ -Integrin in unbehandelten hoch- (+) und niedrigsialylierten (-) HL-60-Zellen mittels FACS-Analyse.  $5 \times 10^6$  Zellen (konfluent) pro Fraktion wurden mit dem  $\beta 1$ -Integrin-mAk K20 markiert und im FACS analysiert.

Die oberflächliche  $\beta 1$ -Integrinexpression von beiden HL-60-Zelltypen reagiert empfindlich auf Zelldichteverschiebungen in Suspensionskultur. Bis zu einer bestimmten Dichte steigt die  $\beta 1$ -Integrinoberflächenexpression an. Die Zunahme in hochsialylierten HL-60-Zellen ist stärker als in niedrigsialylierten HL-60-Zellen, so daß der  $\beta 1$ -Integrinkonzentrationsunterschied zwischen beiden Zellreihen größer wird (vgl. Zelldichte in Abb. 8 ( $2 \times 10^5$ /ml) und in Abb. 9 ( $5 \times 10^5$ /ml)). Die Fluoreszenzintensitäten beider Populationen sind normalverteilt. Die Fluoreszenzkurvenspitze liegt in der niedrigsialylierten Fraktion bei 200 FL1-Height, während sie in hochsialylierten HL-60-Zellen im Bereich von 500 FL1-Height zu finden ist. Hier wird wie in der Westernblot-Analyse (Abb. 6) deutlich, daß hochsialylierte HL-60-Zellen mehr  $\beta 1$ -Integrin exprimieren als niedrigsialylierte HL-60-Zellen.

### 3.1.4 Getrennter Nachweis membranärer und intrazellulärer $\beta$ 1-Integrinkonzentrationen hochsialylierter HL-60-Zellen nach ManNProp-Inkubation

Bislang konnte mittels Westernblot-Analyse gezeigt werden, daß ManNProp langfristig die  $\beta$ 1-Integrinkonzentration hochsialylierter HL-60-Zellen steigert (Abb. 7), jedoch ohne Zunahme der  $\beta$ 1-Integrinkonzentration auf der Zelloberfläche, wie mittels FACS-Analyse gemessen wurde (Abb. 8). Deshalb sollte in diesem Versuch zur Verifizierung einer rein intrazellulären  $\beta$ 1-Integrinkonzentrationszunahme mittels Streptavidinpräzipitation biotinmarkiertes  $\beta$ 1-Integrin auf der Zelloberfläche von nicht biotin-markiertem intrazellulären  $\beta$ 1-Integrin getrennt und jeweils im Westernblot gemessen werden.

Aus einem Zellpool wurden dazu hochsialylierte HL-60-Zellen entnommen und 48 h lang mit ManNAc bzw. ManNProp inkubiert. Zur zeitgleichen Analyse kurz- und langfristig inkubierter HL-60-Zellen wurden aus demselben Zellpool dann nach 44 h wieder HL-60-Zellen entnommen und für 4 h mit ManNAc bzw. ManNProp inkubiert. Anschließend erfolgte o.g. Trennung, so daß die  $\beta$ 1-Integrinkonzentration sowohl auf der Zelloberfläche als auch intrazellulär mittels Westernblot bestimmt werden konnte (Abb. 10).



**Abb. 10: Nachweis von  $\beta$ 1-Integrin in hochsialylierten HL-60-Zellen mittels Westernblot nach Auftrennung in membranäre und intrazelluläre Fraktionen.** Hochsialylierte HL-60-Zellen wurden 4 h und 48 h mit 10 mM ManNAc bzw. ManNProp inkubiert und auf ihrer Oberfläche mit 1 mg/ml Biotin bei 20°C markiert. Lysate wurden durch Streptavidin präzipitiert, mittels 7,5%-SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem  $\beta$ 1-Integrin-mAk 18 markiert (K = Kontrollen).

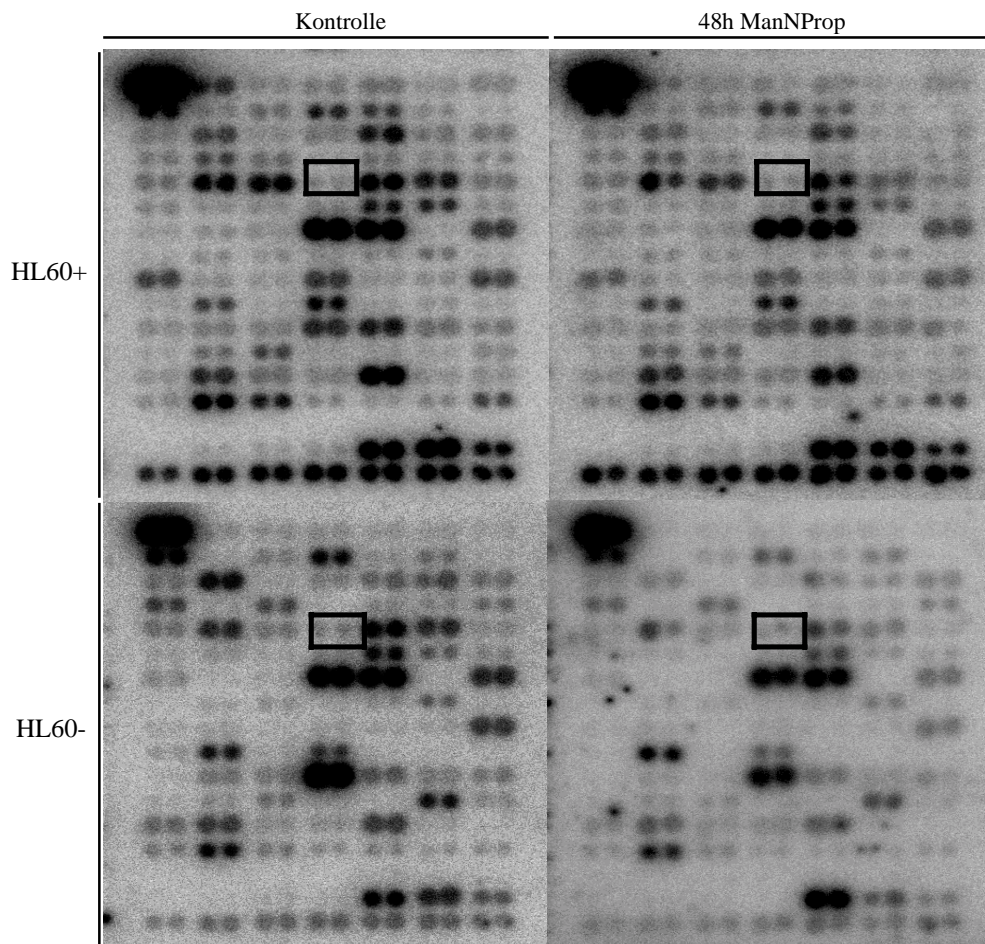
Das Ergebnis zeigt, daß sowohl ManNAc als auch ManNProp langfristig nur die intrazelluläre  $\beta$ 1-Integrinkonzentration steigert. Denn nach 48 h ManNAc bzw. ManNProp-Inkubation bleibt die Konzentration des  $\beta$ 1-Integrins auf der Zelloberfläche unverändert bis leicht erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle, während die intrazelluläre Konzentration deutlich zugenommen hat (Abb. 10).

Hingegen ist die durch kurzfristige ManNAc- bzw. ManNProp-Stimulation hervorgerufene Gesamt- $\beta$ 1-Integrinabnahme (Abb. 7) durch auf der Zelloberfläche stattfindenden  $\beta$ 1-Integrinverlust zu erklären. Denn bereits nach 4 h ManNAc bzw. ManNProp-Inkubation nimmt die membranäre  $\beta$ 1-Integrinkonzentration ab (Abb. 10).

Weiterhin zeigt diese Westernblot-Analyse, daß die hochsialylierten HL-60-Zellen das  $\beta$ 1-Integrin hauptsächlich intrazellulär speichern. Die Banden zwischen 118 kD und 90 kD in den intrazellulären Fraktionen sind vermutlich  $\beta$ 1-Integrinpeptide, die durch die im Vergleich zu vorherigen Westernblotanalysen unterschiedliche Aufarbeitung der HL-60-Zellen entstanden sind (vgl. Abb. 6, Abb. 7).

### 3.1.5 Einfluß von ManNProp auf die $\beta$ 1-Integrin-mRNA

Mittels cDNA-Arrays sollte geprüft werden, ob der bereits nachgewiesene Anstieg der intrazellulären  $\beta$ 1-Integrinkonzentration nach langfristiger ManNProp-Inkubation in hoch- und niedrigsialylierten HL-60-Zellen auf eine erhöhte mRNA-Konzentration zurückzuführen ist. Die in Abb. 11 dargestellten cDNA-Arrays zeigen in den Kontrollfraktionen sehr schwache Hybridisierungssignale für das  $\beta$ 1-Integrin-Gen. Nach 48 h ManNProp-Inkubation ist in beiden Zellreihen keine Erhöhung der  $\beta$ 1-Integrin-mRNA-Konzentration zu messen.



**Abb. 11: cDNA-Arrays hoch (+) und niedrigsialylierter (-) HL-60-Zellen nach ManNProp-Inkubation.**  $2 \times 10^6$  Zellen wurden 48 h mit 10 mM ManNProp inkubiert. Die aus den Lysaten gewonnenen mRNAs wurden mittels RT-PCR zu cDNA umgeschrieben und mit den auf der Arrayplatte für verschiedene Gene spezifischen DNA-Sequenzen hybridisiert. Eingerahmt sind die  $\beta$ 1-Integrin-Hybridisierungssignale, die mittels Phosphor Imager gemessen wurden.