

Aus der Robert Rössle Klinik , Abteilung für Chirurgie und Onkologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Molekulargenetische Analyse der Splicingvarianten der  
ST6Gal-I in humanen kolorektalen Karzinomen und gesunder  
kolorektaler Mukosa

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nikolai Klein  
aus Münster

Namen der Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. h. c. P. M. Schlag
2. Prof. Dr. med. W. Reutter
3. Priv. Doz. Dr. med. G. Pecher

Datum der Promotion: 19.05.2008

# 1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis .....	1
2	Einleitung.....	4
2.1	Das Kolonkarzinom .....	4
2.1.1	Klassifizierung des Kolonkarzinoms .....	6
2.1.2	Vom Polyp zum Karzinom .....	8
2.1.3	Screening .....	9
2.2	Zelloberflächenmoleküle in kolorektalen Karzinomen .....	10
2.3	Sialylierung und Metastasierung von Tumorzellen .....	12
2.3.1	Sialyltransferasen.....	13
2.3.2	Die Splicingvarianten und Regulation der ST6Gal-I.....	15
2.4	Problemstellung .....	18
3	Material und Methodik .....	20
3.1	Probenmaterial .....	20
3.2	Geräte.....	21
3.2.1	Das FACSCalibur .....	22
3.2.2	Computerprogramme .....	23
3.3	Verwendete Substanzen.....	23
3.4	Die semiquantitative RT-PCR .....	27
3.4.1	Nachweisgrenze der semiquantitativen RT-PCR .....	28
3.5	Probenvorbereitung für den Cell-Sorter .....	30
3.6	High Performance Liquid Chromatography (HPLC) .....	30
4	Ergebnisse.....	33
4.1	Semiquantitative RT-PCR der ST6Gal-I Splicingvarianten aus Kolonkarzinomzellen und nicht veränderten Mukosazellen .....	33
4.1.1	Statistische Auswertung der Daten.....	43
4.1.2	Expression.....	43
4.1.3	Tumor-Stadium.....	47
4.1.4	Regionärer Lymphknotenbefall (N).....	47
4.1.5	Grading .....	48

---

4.2	RT-PCR Analyse der ST6Gal-I von Koloskopiebiopsaten gesunder Personen 49	
4.3	Analyse der Tumorproben nach Depletion der Lymphozyteninfiltrate.....	51
4.4	HPLC-Analyse der ST6Gal-I Enzymaktivität in den Tumorbiopsaten .....	54
4.5	Zusammenfassung der statistischen Auswertung .....	59
5	Diskussion.....	60
5.1	Die Rolle der ST6Gal-I in kolorektalen Karzinomen.....	60
5.1.1	Methodik.....	61
5.1.2	Die Splicingvarianten der ST6Gal-I .....	62
5.1.3	Regulation.....	63
5.1.4	T-stadium .....	65
5.1.5	Lymphknotenmetastasen .....	65
5.1.6	Metastasen .....	66
5.1.7	Grading .....	66
5.2	Untersuchung von Koloskopiebiopsaten gesunder Personen .....	67
5.3	Untersuchung der Enzymaktivität .....	68
5.4	ST6Gal-I Expression nach Depletion der Lymphozyten aus den Tumorbiopsaten .....	70
6	Zusammenfassung .....	72
7	Literaturverzeichnis .....	74
8	Abkürzungsverzeichnis.....	83

## 2 Einleitung

### 2.1 Das Kolonkarzinom

Das kolorektale Karzinom stellt mit einer Mortalität von 25,5 Toten pro 100 000 Einwohner und Jahr nach dem Bronchialkarzinom die zweithäufigste karzinombedingte Todesursache in Deutschland dar<sup>1</sup>. Gewöhnlich tritt die Erkrankung bei Patienten auf, die älter als 50 Jahre sind. Über die Hälfte der Todesfälle ereignen sich in der Altersgruppe der über 75-jährigen.

#### Umweltbedingte Risikofaktoren

Ätiologisch scheinen die meisten Fälle von kolorektalen Karzinomen an Umweltfaktoren geknüpft zu sein. Die Erkrankung tritt häufiger in höheren sozialen Schichten auf, die in städtischer Umgebung wohnen. So zeigen Studien aus verschiedenen Ländern einen direkten Zusammenhang zwischen dem pro Kopf Konsum von Kalorien, Fett und tierischem Protein sowie der Inzidenz für kolorektale Karzinome<sup>2</sup>. Geografische Unterschiede gehen anscheinend nicht auf genetische Unterschiede zurückzugehen, sondern vielmehr auf Ernährungsgewohnheiten, da Immigranten die Inzidenz ihrer Einwanderungsländer übernehmen, wenn sie sich den dortigen Lebensgewohnheiten anpassen<sup>3</sup>. In Japan stieg z.B. die Inzidenz der kolorektalen Karzinome mit Übernahme von „westlichen“ Ernährungsgewohnheiten<sup>4</sup>. Demgemäß kann man davon ausgehen, daß Ernährungsgewohnheiten eine gewisse Rolle bei der Entwicklung von kolorektalen Karzinomen spielen. Es existieren zahlreiche Hypothesen, die diesen Zusammenhang zu erklären versuchen.

Eine bedeutende Rolle wird den Ballaststoffen beigemessen. Die Untersuchung südafrikanischer Bantus, die einerseits aufgrund des hohen Faseranteils in der Nahrung besonders viele und voluminöse Stühle produzieren und andererseits zugleich eine geringere Inzidenz von kolorektalen Karzinomen aufweisen<sup>5</sup>, legt den Rückschluß nahe, daß Ballaststoffe die intestinale Transitzeit verkürzen und damit die Mukosa weniger potentiellen Karzinogenen ausgesetzt ist, zumal der Stuhl durch Fasern noch

verdünnt wird. Wenn Fasern auch das Stuhlvolumen erhöhen, bleibt der Beweis, daß Fasern die intestinale Transitzeit verkürzen, noch aus. Andererseits führt eine faserarme Diät zu chronischer Obstipation und weiter zu Divertikulose. Wäre nun ein geringer Anteil von Fasern in der Nahrung ein signifikanter Faktor für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms, müssten Patienten mit Divertikulose ein höheres Risiko haben, daran zu erkranken, was jedoch nicht zutrifft. Nach Ergebnissen der Nurses Health Study übt der Fasergehalt der Ernährung keinen Einfluss auf die Inzidenz der kolorektalen Karzinome aus. Sicher kann man sagen, daß eine Ernährung bestehend aus einem großen Anteil von Früchten und Gemüse bei geringem Konsum von Kalorien und Alkohol sowie einem niedrigem Anteil von Fleisch und tierischem Fett, eine protektive Wirkung bezüglich der Entwicklung eines Kolonkarzinomes hat<sup>6</sup>, wenngleich die Wirkung der einzelnen Nahrungskomponenten wie z.B. die der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe, noch nicht endgültig geklärt ist.

#### Hereditäre Prädispositionen

Abgesehen von Umweltfaktoren existieren eine Reihe von verschiedenen hereditären Prädispositionen. Zu nennen wären die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), das einem ähnlichen Gendefekt zugrunde liegende Gardner-Syndrom oder das von Tumoren des zentralen Nervensystems begleitete Turcot-Syndrom. Eine andere von Polyposis begleitete Erkrankung ist das Peutz-Jehgers-Syndrom, einhergehend mit Tumoren des Ovars, der Mamma, des Pankreas und des Endometriums.

Aus der Gruppe der nicht polypösen Syndrome wäre das Lynch-Syndrom (I & II) zu nennen, welches mit Mutationen in der Keimbahn assoziiert ist, das hMSH2-Gen auf Chromosom 2 und das hMLH1-Gen auf Chromosom 3. Diese Mutation führt zu Fehlern in der DNA-Replikation aufgrund von defekter Reparatur der DNA.

#### Entzündliche Darmerkrankungen

Colitis ulcerosa stellt einen Risikofaktor für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms dar: das Risiko ist abhängig von Ausdehnung, Manifestation und Dauer der Erkrankung, dabei kann das Risiko medikamentös beeinflusst werden<sup>7,8</sup>. Morbus Crohn als Prädisposition für das Auftreten eines Kolonkarzinoms wird in der Literatur kontrovers diskutiert; einige Autoren gehen von einem erhöhten Risiko lediglich für für

den oberen Gastrointestinaltrakt aus<sup>9,10</sup>, während neuere Studien das Risiko, ein kolorektales Karzinom bei Morbus Crohn zu entwickeln, dem der Colitis ulcerosa gleichsetzen<sup>11</sup>.

### 2.1.1 Klassifizierung des Kolonkarzinoms

Die Prognose für Patienten mit kolorektalem Karzinom hängt im wesentlichen von der Infiltrationstiefe des Tumors, dem Befall von Lymphknoten und der Metastasierung ab. Zur Einteilung des Kolonkarzinoms wird die TNM- und die Dukes-Klassifikation verwendet. Die TNM-Klassifikation der UICC (Union internationale contra cancerum, Internationale Union gegen den Krebs) wurde zuletzt 2003 herausgebracht (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms der UICC 2003**

<b><u>Tumorstadium</u></b>
<b>T</b> -Primär Tumor
<b>TX</b> Tumor kann nicht beurteilt werden
<b>T0</b> Kein Anhalt für Tumor
<b>Tis</b> Carcinoma in situ: intraepithelial oder Invasion der Lamina propria
<b>T1</b> Tumor infiltriert Submukosa
<b>T2</b> Tumor infiltriert Muscularis propria
<b>T3</b> Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht-peritonealem perikolischem oder perirektalem Gewebe
<b>T4</b> Tumor infiltriert direkt Nachbarorgane oder Strukturen und/oder perforiert viscerales Peritoneum

**N-Regionale Lymphknoten**

**NX** Regionaler LK kann nicht beurteilt werden

**N0** Keine regionalen LK Metastasen

**N1** Metastasen in 1 bis 3 regionären LK

**N2** Metastasen in 4 oder mehr regionären LK

**M-Fernmetastasen**

**MX** Fernmetastasen können nicht beurteilt werden

**M0** Keine Fernmetastasen

**M1** Fernmetastasen

**Tabelle 2: Histopathologisches Grading**

**G-Histopathologisches Grading**

**GX** Grad der Differenzierung kann nicht bestimmt werden

**G1** Gut differenziert

**G2** Mäßig differenziert

**G3** Schlecht differenziert

**G4** Undifferenziert

Bei Kenntnis des TNM-Stadiums und des histopathologischen Gradings erfolgt eine Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms.



**Tabelle 3: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms**

<b>TNM</b>				<b>Dukes</b>
Stadium 0	Tis	N0	M0}	<b>A</b>
Stadium I	T1	N0	M0}	
	T2	N0	M0}	
Stadium II	T3	N0	M0}	<b>B</b>
	T4	N0	M0}	
Stadium III	Jedes T	N1	M0}	<b>C</b>
	Jedes T	N2	M0}	
Stadium IV	Jedes T	Jeder N	M1}	

### 2.1.2 Vom Polyp zum Karzinom

Die meisten kolorektalen Karzinome entwickeln sich, unabhängig von ihrer Ätiologie, aus adenomatösen Polypen.

Eine Reihe von molekularbiologischen Veränderung in der DNA von adenomatösen Polypen, epithelialen Dysplasien und Polypen, welche mikroskopisch kleine Foki von Tumorzellen enthalten (*Carcinoma in situ*), repräsentieren einen Multistep-Prozeß, der in dem Tumorprogressionmodell nach Vogelstein und Mitarbeitern dargestellt wird.

Diesem Modell zufolge kommt es im Normalepithel zunächst zu einer Mutation bzw. einem Verlust des APC-Tumorsuppressor-Gens, desweiteren zu einer Mutation im K-RAS-Onkogen, Hypomethylation der DNA, einem Verlust/Mutation des DCC (deleted in colorectal cancer)-Tumorsuppressor Gens und schließlich zu einem Verlust/Mutation des p53-Suppressor-Gens.

Diese Veränderungen in der Proliferation des Epithels vom Polypen zum Karzinom entwickeln sich aus der Aktivierung eines Onkogens gefolgt und kombiniert mit dem

Verlust von Genen, die normalerweise die Tumorgenese unterdrücken. Während dieses Modell lediglich fünf solcher molekularen Veränderungen beinhaltet, erscheint es durchaus denkbar, daß noch weitere Veränderungen an der Karzinogenese beteiligt sind. Auch ist es noch unklar, ob diese genetischen Veränderungen immer in derselben Weise stattfinden müssen. Man geht davon aus, daß bei einer kritischen Gesamtzahl von genetischen Veränderungen das anfangs noch kontrollierte Wachstum eines Polypen in ein unkontrolliertes malignes Wachstum übergehen kann.

### 2.1.3 Screening

Aufgrund der hohen Inzidenz des kolorektalen Karzinoms und der Tatsache, daß sich etwa 90% der Karzinome aus benignen adenomatösen Polypen entwickeln, führt eine konsequente Polypektomie zu einer Risikoreduktion um bis zu 90% hinsichtlich der Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms<sup>12</sup>.

Man geht davon aus, dass die Karzinomentstehung aus einem Polypen etwa zehn Jahre benötigt<sup>13</sup>. Die Prognose des kolorektalen Karzinoms hängt im wesentlichen vom Stadium der Erkrankung bei der Diagnose ab. Somit kommt der Früherkennung eine wichtige Bedeutung durch eine frühzeitigere Entdeckung prognostisch günstigerer Stadien zu. Früherkennungsmaßnahmen müssen das individuelle Risiko der Person berücksichtigen. Dabei spielen Risikofaktoren wie eine positive Familienanamnese für das kolorektale Karzinom oder prädisponierende Erkrankungen wie Colitis ulcerosa eine entscheidende Rolle.

Eine geeignete Screeningmaßnahme stellt die fäkale okkulte Bluttestung (FOBT) dar. Durch ihren Einsatz konnte eine Senkung der durch das kolorektalen Karzinom bedingten Mortalität um 23% erreicht werden<sup>14</sup>. Die Minnesota-Studie beschreibt sogar eine Senkung der Mortalität um 33% nach 18 Jahren<sup>15</sup>. Zur zuverlässigeren Erkennung von kolorektalen Karzinomen sollte die Testung wiederholt werden, da zwei Drittel aller Karzinome im Verlauf einer Woche bluten<sup>16</sup>.

Bereits bei einmalig positivem Testergebnis auf okkultes Blut im Stuhl ist eine komplette endoskopische Darstellung des Dickdarmes nach digitaler rektaler

Untersuchung erforderlich. Dieses beinhaltet ebenfalls den sicheren Ausschluss eines Anal- oder distalen Rektumkarzinoms mittels Proktoskopie. Aufgrund der deutlichen Zunahme des kolorektalen Karzinoms ab dem 50. Lebensjahr wird dieses Alter als sinnvoller Beginn des Screenings angesehen<sup>13</sup>.

Die Effizienz der Sigmoidoskopie als Screeningverfahren kann als gesichert gelten. Denn die Sigmoidoskopie führt zu einer Senkung der Mortalität der Karzinome des Rektumsigmoids um etwa 60-80%<sup>17</sup>. Zusätzlich zur Sigmoidoskopie empfiehlt sich eine jährliche fäkale okkulte Bluttestung, um proximal gelegene Tumoren zu entdecken. Die Kombination aus Sigmoidoskopie und FOBT ist der alleinigen Sigmoidoskopie überlegen<sup>18</sup>.

Eine vollständige Koloskopie ist eine sinnvolle Alternative zur alleinigen Screeninguntersuchung bezüglich der Früherkennung eines kolorektalen Karzinoms<sup>12</sup>. Zusätzlich bietet dieses Screeningverfahren die Möglichkeit der Diagnose und endoskopischen Therapie, das heißt Abtragung präneoplastischer Läsionen im gesamten Kolon. Die Altersverteilung des kolorektalen Karzinoms lässt den Beginn der Untersuchung ab dem 55. Lebensjahr als sinnvoll erscheinen. Bei unauffälligem Untersuchungsbefund ist erst nach Ablauf von zehn Jahren eine Kontrolle notwendig, da die Entwicklung vom Polypen zum Karzinom zehn Jahre nicht unterschreitet<sup>13, 19</sup>.

## **2.2 Zelloberflächenmoleküle in kolorektalen Karzinomen**

Um die durch kolorektale Karzinome verursachte Mortalität zu senken, ist es wichtig, die Mechanismen der Metastasierung vom Primärtumor in andere Organe zu verstehen. Obwohl die Pathogenese Gegenstand zahlreicher Studien in der Grundlagenforschung und in der klinischen Forschung ist, steht die Erklärung, warum eine Tumorzelle metastasiert, noch aus. Tumorzellen aus demselben Karzinom mit unterschiedlichen metastatischen Eigenschaften zeigen einen polyklonalen Charakter<sup>20</sup>. Zudem weisen metastasierte Tumorzellen eine phänotypische Instabilität auf, welche zu graduellen Veränderungen in ihrem Wachstum sowie zu einer Differenzierung und der Herausbildung von heterogenen Subpopulationen führt, die sich wiederum in ihren metastatischen Eigenschaften unterscheiden<sup>21</sup>.

Kolorektalen Karzinomzellen unterziehen sich einer Differenzierung als Produkt von quantitativen Veränderungen in der Gen-Expression. Während sich die Tumorzellen differenzieren, beginnen bestimmte Zellklone aufgrund ihrer Wachstumsgeschwindigkeit die Zellpopulation zu dominieren. Die unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten führen zu Wellen in der klonalen Zellproliferation<sup>22</sup>.

Klonale Selektion und Differenzierung und die damit verbundene Heterogenität des Tumors stellen das Hauptproblem hinsichtlich der Etablierung prognostischer Parameter für kolorektale Karzinome dar.

Das Tumorprogressionsmodell beinhaltet folgende Stadien für die Entwicklung von Metastasen: Das Tumorwachstum, die Neovaskularisation und die Invasion des Primärsitzes, gefolgt von der Penetration in die Lymph- und Blutgefäße oder das Peritoneum. Am Ende dieses Prozesses müssen zirkulierende Tumorzellen an den Gefäßwänden der entsprechenden Organe adherieren, umliegendes Gewebe penetrieren, überleben und wachsen. Während dieser Schritte kann man Interaktionen zwischen Tumorzellen und der extrazellulären Matrix sowie umliegenden Zellen beobachten. Verschiedene Moleküle auf der Zelloberfläche vermitteln diese Interaktionen, entweder durch direkten Kontakt mittels Integrinen oder anderen Adhäsionsmolekülen oder über Rezeptoren für lösliche Proteine, Hormone oder verschiedenen Wachstumsfaktoren. Gewöhnlich findet man die gleichen Moleküle auch auf normaler Kolonmukosa, wo sie der Erhaltung und Regeneration des Gewebes dienen.

Ereignisse in der Zelladhäsion von Karzinomzellen spielen eine interessante Rolle bei der Metastasierung. Die multiplen Oberflächenmoleküle, die diese Interaktionen vermitteln, sind die Lektine, Glykosyltransferasen, Integrine und nonintegrine Adhäsionsmoleküle sowie Glykolipide. Das Loslösen einer Tumorzelle von ihrem Primärsitz charakterisiert sich durch den Verlust der Zelladhäsion; dabei spielt das Cadherin-Katenin System offenbar eine entscheidende Rolle. In schlecht differenziertem Gewebe kann man regelmäßig den Verlust der epithelialen Zellkontakte beobachten; dieser Verlust erlaubt den Zellen den Primärtumor zu verlassen, umliegendes Gewebe zu penetrieren und in die Lymph- und Blutzirkulation zu gelangen.

Adhäsion von zirkulierenden Tumorzellen an endotheliale Zellen von anderen Organen und subendothelialer Extrazellulärmatrix wird durch verschiedene Adhäsionssysteme vermittelt, die den endothelialen Zelloberflächenrezeptoren von Leukozyten entsprechen. So stehen Kontakte zwischen Karzinomzellen und dem mikrovaskulären Endothelium in Beziehung zu der Expression von Selektinen, Sialyl-LewisX und anderen Kohlenwasserstoffen und intrazellulären Adhäsionsmolekülen.

Für die Penetration vom Primärsitz des Tumors in die Zirkulation und die Extravasation in das zu metastasierende Organ wird die Freisetzung oder Aktivierung von Enzymen wie Metalloproteasen, Kathepsinen, Plasminogenaktivatoren und Endoglykosidasen sowie Heparanase benötigt. Haben die Tumorzellen einmal ihren Sekundärsitz in einem anderen Organ erreicht und erfolgreich invasiert, müssen sie die lokalen Gefäße zum Wachstum stimulieren.

Neovaskularisation ist induziert und reguliert durch verschiedene Angiogenesemoleküle, die sich an bestimmte Oberflächenrezeptoren binden (z.B. vascular endothelial growth factor receptor[VEGF-R], platelet –derived growth factor receptor[PDGF-R] ). Schließlich muss der neovaskularisierte Tumor wachsen; in diesem Prozeß sind parakrine und autokrine Wachstumsfaktoren anscheinend von zentraler Bedeutung. Autokrine und parakrine Wachstumsfaktorenrezeptoren, zu denen beispielsweise epidermal growth factor receptor, fibroblast growth factor receptor, insulin -like growth factor zählen interagieren mit intrazellulären Proteinen, welche an der Signaltransduktion beteiligt sind und das Verhalten der Zelle bestimmen.

### **2.3 Sialylierung und Metastasierung von Tumorzellen**

Die Expression von Zelloberflächen-Kohlenhydratgruppen ist Veränderungen während der Entwicklung, Differenzierung und onkogenetischer Transformation unterworfen. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei der Zellmotilität oder der zellulären Interaktion.

Terminale Strukturen von Zelloberflächen-Kohlenhydraten sind von verschiedenen Parametern abhängig; dazu gehören unter anderem die unterschiedliche Expression verschiedener Transferasen, das Verhältnis der Enzyme, die um das gleiche Substrat konkurrieren, und die Spezifität der Enzyme für die entsprechende Kohlenhydratkette.

Sialinsäuren sind saure Kohlenhydrate mit neun Kohlenstoffatomen, die oft endständig an Oligosaccharidketten von Glykoproteinen und Glykolipiden gebunden sind. Bei diesen Zuckern handelt es sich um Neuraminsäurederivate. Zwei der am häufigsten auftretenden Sialinsäuren sind die N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) und die N-Glykolylnneuraminsäure (Neu5Gc), an deren Aminogruppe entweder eine Acetyl- oder Glykolylgruppe gebunden sind. Durch unterschiedliche Substitution der Hydroxylgruppen der Sialinsäure mit Acetyl-, Lactyl-, Methyl-, Sulfat- und Phosphatresten entstehen eine Vielzahl natürlicher unterschiedlicher Sialinsäuren. Sialinsäuren spielen eine wichtige Rolle bei biologischen Prozessen wie z.B. Leukotaxis<sup>23</sup>, Lymphozytendifferenzierung<sup>24</sup>, Embryonalentwicklung<sup>25</sup>, und Metastasierung von Tumoren<sup>26, 27</sup>.

### 2.3.1 Sialyltransferasen

Die Verknüpfung von Sialinsäure mit Oligosaccharidketten wird durch Sialyltransferasen katalysiert. Dabei differenziert man eine Familie von 20 oder mehr Enzymen, die sich dadurch unterscheiden, welche Kohlenhydratkette einerseits als Akzeptor fungiert und welche Art Verbindung sie andererseits mit dem sub-terminalen Zuckerrest eingehen.

Sialyltransferasen gehören zu den Glykosyltransferasen, die Sialinsäure von CMP-NeuAc(Cytidin-5-Monophospho-N-acetylneuraminsäure) der aktivierten Donorform auf Glykoproteine oder Glykolipide der Zellmembran transferieren. Sialinsäuren werden von Sialyltransferasen mit Zuckerresten über  $\alpha 2,3$ ,  $\alpha 2,6$  und  $\alpha 2,8$  Verbindungen verknüpft.

Die  $\beta$ -Galaktosid  $\alpha 2,6$ -Sialyltransferase (Gal $\beta 1,4$ GlcNAc $\alpha 2,6$ -Sialyltransferase, ST6Gal-I) ist mit ihren Splicingvarianten Gegenstand dieser Arbeit. Diese katalysiert die Verbindung von Sialysäure an das N-Ende der Oligosaccharidstruktur Gal $\beta 1,4$ GlcNAc-R, wobei R eine Protein- oder Lipidstruktur darstellt. Das Produkt ergibt die Zuckerstruktur NeuAc $\alpha 2,6$ Gal $\beta 1,4$ GlcNAc-R. Das Enzym findet sich in den *trans* Zisternen des Golgi-Apparates<sup>28</sup> und im *trans*-Golgi Netzwerk, wo es einer posttranslationalen Modifikation von sekretorischen und Zelloberflächenproteinen unterworfen ist<sup>29</sup>. Das lösliche Enzym kann im Serum und in anderen

Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden, sezerniert von Hepatozyten in das Plasma während der akuten-Phase-Reaktion als proteolytisches Fragment der Sialyltransferase<sup>30, 31</sup>. In humanen B-Lymphozyten wird die Aktivität gesteigert, und das lösliche Enzym wird nach der Aktivierung in das Medium entlassen<sup>32</sup>.

Eine entscheidene Rolle kommt der Sialyltransferase bei der Adhäsion von Zellen untereinander zu. In reifen B-Lymphozyten dienen  $\alpha$ 2,6-Sialylstrukturen als Liganden für die Erkennung der Adhäsionsmoleküle CD22 $\beta$  auf B-Lymphozyten und CD45 auf T-Lymphozyten<sup>33</sup>. Bei Zellen eines Mammakarzinoms mit einer durch cDNA-Transfektion vermehrten Expression der ST6Gal-I konnten sich die Zellen vermehrt an Kollagen binden und wiesen eine verminderte Adhäsion untereinander auf<sup>34</sup>. Untersuchungen an Kolonkarzinomzellen ergaben eine Korrelation zwischen der Expression von ST6Gal-I und non-adherentem Wachstum in der Zellkultur<sup>35</sup>. Dabei führt Hypersialylierung aufgrund einer erhöhten Enzymaktivität zu einer reduzierten Adhäsion der Zellen untereinander<sup>36</sup> und/oder einer verstärkten Adhäsion der Tumorzellen an die Basalmembran<sup>37</sup> und kann so die Immunantwort behindern<sup>38</sup>. Die Hochregulation der ST6Gal-I ist wahrscheinlich die Ursache der verstärkten  $\alpha$ 2,6-Sialylierung der Tumorzellmembranen, was durch die Bindung mit dem Lektin von *Sambucus nigra* (SNA) gezeigt werden konnte<sup>39</sup>. Diese Veränderungen konnten mit einem invasiveren Phänotyp in Zusammenhang gebracht werden, sowohl in klinischen<sup>26</sup> wie auch in experimentellen Studien<sup>35</sup>.

Vierbuchen et al. konnten nachweisen, daß ein hoher Level von SNA-Reaktivität ein unabhängiger Parameter für eine schlechte Prognose bei kolorektalem Karzinom ist<sup>40</sup>. Während die Aktivität der ST6Gal-I in normaler Kolonmukosa nur gering oder gar nicht nachweisbar ist, gelingt der Nachweis in metastasierten Kolonkarzinomen in besonders hohem Maße<sup>41, 42</sup>.

### 2.3.2 Die Splicingvarianten und Regulation der ST6Gal-I

Die Beziehung zwischen  $\alpha$ 2,6-Sialylierung und der Progression in kolorektalen Karzinomen macht deutlich, wie wichtig es ist, die molekularen Mechanismen der Regulation der ST6Gal-I aufzuklären.

Das Gen SIAT1 kodiert die ST6Gal-I, es befindet sich auf dem Chromosom 3 (q21-q28)<sup>46</sup>. Vergleichende Analysen mit der Sequenz des Gens bei Ratten ergaben eine genaue Konservierung der Intron/Exon-Grenzen. Die Expression der ST6Gal-I wird in der Leber bei Ratten durch Glukokortikoide moduliert<sup>44</sup>. Ähnliche m-RNA Isoformen wurde auch bei Menschen gefunden<sup>53</sup>.

Dabei werden verschiedene m-RNA Isoformen beschrieben, die sich in der 5'-untranslatierten Region unterscheiden: Die Isoformen X, Y und U sind lymphozytenspezifisch und Gegenstand der vorliegenden Arbeit; eine weitere leberspezifische Isoform besteht aus einer kurzen Sequenz vor dem Exon I und wurde zuerst in der Hepatom-Zelllinie HepG2 beschrieben<sup>54</sup>. Die Isoform X tritt in reifen B-Lymphozyten auf und steht in Zusammenhang mit der Sialylierung der Liganden CD22 $\beta$  und CD45<sup>48</sup>. Sie wird nur in Jok-1, Daudi und Louckes, das heißt ausschließlich in Zelllinien mit einem reifen B-Lymphozyten Phänotyp auf einem hohen Level synthetisiert, nicht aber die Exons Y und Z. Der hohe Level der ST6Gal-I Transkripte in Jok-1, Daudi und Loukes scheint sich durch die verhältnismäßig kleine mRNA der X-Isoform zu erklären<sup>45</sup>. Die Expression in reifen B-Lymphozyten wird mit dem Epitop CDw75 in Zusammenhang gebracht, ein Ligand für CD22; dieses Epitop gehört zur Immunglobulin-Superfamilie der integralen Membranproteine und spielt eine Rolle in der B-Lymphozyten Interaktion<sup>33</sup>.

Eine andere Isoform Y konnte in der Plazenta beschrieben werden; die Expression dieser Form wurde auch in B-Lymphozyten dokumentiert<sup>53</sup>. Diese m-RNA-Spezies beinhaltet die 5'-untranslatierten Exons Y und Z und kann in vielen Geweben nachgewiesen werden, sie repräsentiert die basal- oder „housekeeping“-Expression des Gens<sup>47</sup>.

Neben den beschriebenen Formen existiert eine weitere Isoform U, die Neng- Wen Lo und Joseph T. Y. Lau neben anderen m-RNA Isoformen in der menschlichen B-



Lymphoblastoid Zelllinie Louckes gefunden haben, und welche einen erheblichen Anteil am mRNA-Pool dieser Zelllinie bildet<sup>48</sup>. Diese Isoform wurde mittels 5'-RACE beschrieben und tritt nach Meinung der Autoren wahrscheinlich zusammen mit der Y-Isoform auf und nimmt an der Regulierung der Transkription teil.

Die fehlende Übereinstimmung in der 5'-untranslatierten Region bei den unterschiedlichen ST6Gal-I-m-RNA-Isoformen führte zu der Hypothese, daß jeweils unterschiedliche Promoter-Regionen und Transkriptions-Initiations-Stellen für die verschiedenen Isoformen verantwortlich seien. Neng-Wen Lo und Joseph T.Y. Lau konnten 1996 für die leberspezifische und die B-Lymphozyten spezifische mRNA-Isoform unterschiedliche Promoter-Regionen und verschiedene Transkriptions-Initiationstellen nachweisen. In allen untersuchten B-Lymphoblastoidzellen wurde der Nachweis über einen basalen Level von ST6Gal-I -mRNA mit der Isoform, die die Exons Y und Z enthält, erbracht. Die Transkription der 3 Isoformen startet an unterschiedlichen Stellen auf dem ST6Gal-I-Gen und wird durch verschiedene Promoter reguliert. Dieser Mechanismus erlaubt der Zelle, die Transkription der ST6Gal-I zu modulieren und so auf unterschiedliche Stimuli zu reagieren. Fabio Dall'Olio et al. unterscheiden Kolonkarzinom-Zelllinien anhand der alleinigen Expression der Y+Z-Form sowie der zusätzlich hepatischen Form. Allen Isoformen gemeinsam ist die verhältnismäßig lange 5'-untranslatierte Region, die Anlass zu intensiver Forschung gab. Die 5'-untranslatierte Region erlaubt die Bildung von Sekundärstrukturen sowie die Bindung von regulatorischen Proteinen. Die Expression von unterschiedlichen mRNA-Formen in Kolongewebe reflektiert die Möglichkeit des Gewebes durch promoter-spezifische Transkriptionsfaktoren, abhängig vom Entwicklungsstadium oder von der neoplastischen Transformation, die Transkription zu regulieren.

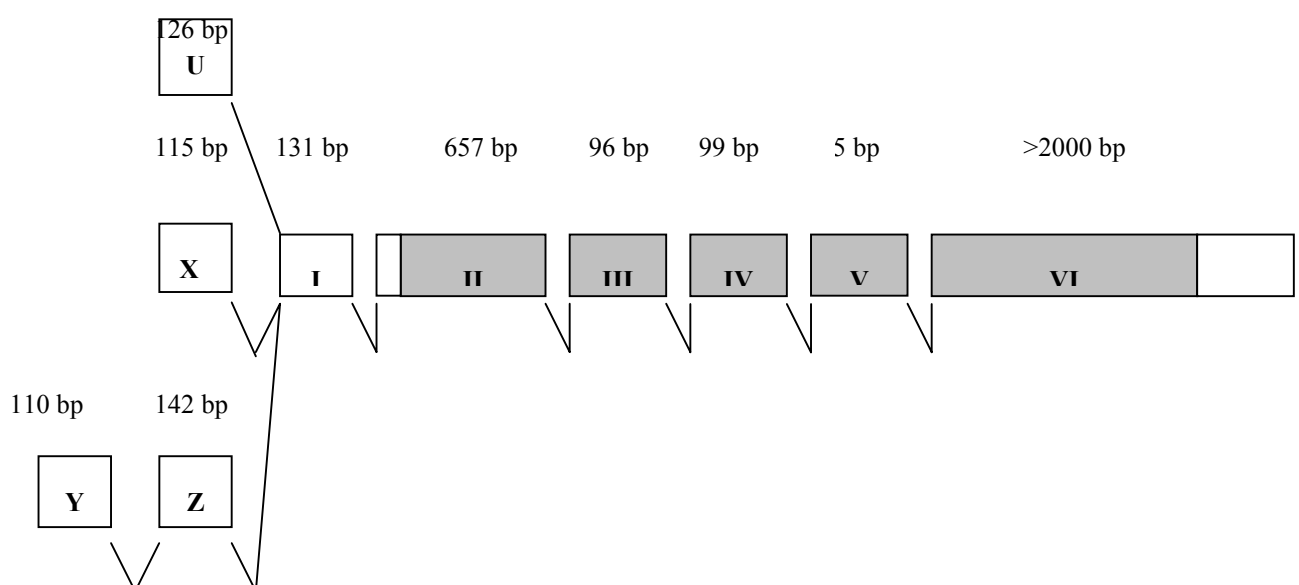
Dabei ist die Regulation der Zellglykosylierung multifaktoriell bedingt, sowohl auf der Ebene der Synthese als auch auf der Ebene des Abbaus. Das Entfernen der Sialinsäure vom Glykokonjugat erfolgt durch die Neuraminidase, ein Enzym das im Lysosom lokalisiert ist aber auch in der Plasmamembran<sup>49</sup>.

In Rattenhepatozyten wird die Expression der ST6Gal-I durch verschiedene Transkriptionsfaktoren reguliert<sup>50</sup>. Bei menschlichen Mammakarzinomzellen konnte

gezeigt werden, daß die Expression ST6Gal-I durch Estradiol abnimmt, während die Expression eines verwandten Enzyms, der ST3Gal-III, zunimmt<sup>51</sup>.

Die Abhängigkeit der ST6Gal-I Expression vom Entwicklungsstadium konnte in menschlichen Kolonzelllinie Caco-2 von Dall'Olio und im Rattendarm dokumentiert werden<sup>52</sup>. Eine andere Möglichkeit, die Expression zu regulieren, besteht auf der Translationsebene. Aasheim et al. konnten zeigen, daß die verschiedenen Isoformen mit unterschiedlicher Effektivität *in vitro* translatiert werden<sup>53</sup>. Dieses deckt sich mit der Beobachtung von Dall'Olio et al., derzufolge Zelllinien, die hauptsächlich das Y-Transkript aufweisen (SW480, SW1417, LoVo), sowohl das Transkript mit der geringsten Translationseffektivität *in vitro* als auch die Zelllinien mit der geringsten Enzymaktivität/mRNA Ratio sind. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte sich aus dem relativ hohen Anteil von G und C (74,5%) in dem Y-Transkript ergeben. Die Anwesenheit von einer langen 5'-untranslatierten Region mit einem derartig hohen G- und C- Anteil erlaubt die Bildung von extensiven Sekundärstrukturen, die mit einer beeinträchtigten Translation assoziiert sind.

Eine andere Möglichkeit der Regulation besteht in der unterschiedlichen Halbwertszeit der mRNAs; Beobachtungen in Bezug auf die unterschiedliche Stabilität der mRNA Isoformen zeigten allerdings keine Unterschiede<sup>54</sup>.



**Abbildung 1: Organisation der ST6Gal-I mit ihren Isoformen; die Exons sind als Balken dargestellt, Protein kodierende grau, über den Exons ist die Anzahl der Basenpaare angegeben.**

**Tabelle 4: Zusammenfassende Darstellung der untersuchten Exons der ST6-Gal1 bezüglich Vorkommen und Bedeutung, Quellen werden der Übersicht halber im Text zitiert.**

ST6Gal-I mRNA-Isoform	X	Y	U
<b>Vorkommen</b>	Zelllinien mit reifen B-Lymphozyten Phänotyp: Jok-1, Daudi, Louckes Kolonkarzinome	Zuerst in Plazenta entdeckt, verschiedenste Organe und B-Lymphozyten, Kolonkarzinome	Durch 5'-RACE in der Lymphoblastoidzelllinie Louckes gefunden
<b>Bedeutung</b>	Relativ kleine mRNA , wird auf hohem Level synthetisiert bei Aktivierung von B-Lymphozyten, steht im Zusammenhang mit Sialylation der Liganden: CDw75, CD22, CD45	Kann zusätzliche Exons beeinhalt, stellt die basal- oder housekeeping Expressions des Gens dar. Durch hohen G u. C Anteil (74,5%) wahrscheinlich geringste Enzymaktivität/mRNA Ratio, geringste Translationseffektivität <i>in vitro</i>	Wird durch alternatives Splicing oder durch den Gebrauch von transkriptionalen Promoter in die mRNA eingebaut, weitgehend undokumentiert, tritt mit anderen Exons auf

## 2.4 Problemstellung

Das Kolonkarzinom ist nach dem Bronchialkarzinom bei Männern und dem Zervixkarzinom bei Frauen das häufigste Karzinom mit steigender Inzidenz. Da die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms mit zunehmenden Alter wächst, muss mit der zunehmenden Lebenserwartung in den westlichen Industrienationen auch weiterhin mit einer steigender Inzidenz des Kolonkarzinoms gerechnet werden.

Man geht davon aus, daß die Entwicklung eines Kolonkarzinoms aus einem Polypen etwa 10 Jahre benötigt, so daß Früherkennungsmaßnahmen die Prognose für den Patienten verbessern können. Screeningmethoden wie der FOBT (fäkale okkulte Bluttestung) und die Koloskopie konnten die durch Kolonkarzinome bedingte Mortalität

deutlich senken, wenn der Tumor in einem prognostisch günstigeren Stadium entdeckt wird.

Einer der Hauptgründe für die hohe Mortalität des Kolonkarzinoms liegt sicher in den durch Metastasen bedingten Komplikationen und der damit häufig verbundenen Inoperabilität.

Der Prozess der Metastasierung zieht eine Reihe molekularbiologischer Veränderungen mit sich, von denen viele noch ungeklärt sind. Das Verständnis solcher Vorgänge eröffnet der Medizin langfristig die Möglichkeit, diese Vorgänge zum Wohle des Patienten zu beeinflussen. Zur Zeit gibt es einige vielversprechende Ansätze, z.B. die Neovaskularisation von Tumoren so zu beeinflussen, daß diese von der Blutzufuhr abgeschnitten werden und so an ihrer Ausdehnung gehindert werden.

Wie in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, hängt die Fähigkeit einer Tumorzelle, zu metastasieren, mit dem Level der Sialylation zusammen; speziell die Sialyltransferase ST6Gal-I steht in engem Zusammenhang mit non-adherentem Wachstum in der Zellkultur und einem invasiven Phänotyp in der Klinik der Kolonkarzinome.

Die Entdeckung von Lymphozyten-spezifischen Isoformen der ST6Gal-I in Kolonkarzinomen weckte das Interesse, diese zu analysieren, da Lymphozyten genau wie metastasierende Tumorzellen in der Lage sind, ihren Primärsitz zu verlassen, in die Zirkulation einzutreten und in das zu metastasierende Organ zu invasieren.

Ziel dieser Arbeit ist es, diese lymphozytenspezifischen Isoformen in kolorektalen Karzinomen zu dokumentieren und Korrelationen zwischen dem Auftreten der verschiedenen Isoformen und dem Metastasierungsverhalten aufzudecken, um so einen Beitrag zum besseren Verständnis der Vorgänge im Metastasierungsprozess zu leisten.

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Probenmaterial

Die Gewebeproben stammen von chirurgisch entfernten Tumoren und angrenzender Mukosa aus der Robert Rössle-Klinik, Abteilung für Chirurgie und Onkologie aus dem Max-Delbrück-Centrum, Berlin. Die Tumoren wurden klassifiziert und charakterisiert nach dem WHO/UICC System: T, N, M, Dukes Stadien sowie grading und typing (siehe Tabelle 5 und 6). Nach sorgfältiger Trennung von maligner und benigner Mukosa wurde das Gewebe bis zur RNA-Extraktion in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Ein anderer Teil der Proben sind Biopsate von Patienten, die einer Koloskopie in einer niedergelassenen Praxis in Bad Freienwalde unterzogen wurden. Die Koloskopien waren alle unauffällig, d.h. ohne pathologischen Befund. Mit den Biopsaten wurde genauso verfahren wie mit den chirurgisch entfernten Proben.

**Tabelle 5 : Gewebeproben aufgeteilt nach Geschlecht, Alter, TNM- Stadien sowie grading and typing und Angabe von Tod (1=verstorben, 0=zum Zeitpunkt der Untersuchung lebend)**

Probe Nr.	Sexus	Alter	T	N	M	G	Tod
546	M	72	4	1	1	2	1
864	F	78	3	0	0	2	0
983	M	63	3	0	0	2	0
1005	M	62	3	0	0	2	0
1033	F	71	3	2	1	2	0
1036	M	62	1	0	0	1	0
1101	F	62	2	0	0	2	0

**Tabelle 6 : Fortsetzung vorangegangener Seite, Gewebeproben aufgeteilt nach Geschlecht, Alter, TNM- Stadien sowie grading and typing und Angabe von Tod**

Probe Nr.	Sexus	Alter	T	N	M	G	Tod
1447	M	75	3	0	0	2	0
1517	M	63	3	2	1	2	1
1702	M	75	3	1	0	2	0
1719	M	84	3	0	0	2	0
1760	F	78	3	1	0	2	0
1947	F	59	3	1	0	3	0
2001	M	78	3	0	0	2	0
2164	M	37	2	0	0	2	0
2760	M	74	4	2	1	2	1

## 3.2 Geräte

Bei den Untersuchungen kamen folgende Geräte zum Einsatz:

- Cycler: Trio-Thermoblock, (Biometra, Göttingen, BRD)
- Zentrifuge: - Biofuge 28 RS, (Heraeus Sepatech, Berlin, BRD)  
 - Centrifuge 5415 C, (Eppendorf, Eppendorf, BRD)
- Magnetrührer: Janke & Kunkel, (IKA-Labortechnik, Staufen, BRD)
- Vortex: Vortex-Genie 2™, (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz)
- Waage: Kern 510, (Gottlieb Kern & Sohn, Albstadt, BRD)
- Thermomixer: Thermo 5436, (Eppendorf, Eppendorf, BRD)
- HPLC-Pumpe: S1100, (Sykam)  
 - UV-Detektor (ERC-7215)  
 - Fraktionssammler (BIO-Rad)

- Counter (LS 6000 IC, Beckmann)
- Mikro-Dismembrator U, (B. Braun, Biotech International, Melsungen, BRD)
- Speedvac: Univapo 150 H + Unijet II, (Uniquip, A.N. Krampa, Martinsried, BRD)
- Spektrometer: Spectronic 1201, (Milton-Roy Company, Werkstätte Chemie Photo, Berlin, BRD)
- Fluorimager: Vistra™ Fluorescence, (Molecular Dynamics GmbH, Krefeld, BRD)
- Gelkammer: M.A.K.I., (Bächler Feintech, Hölstein, BRD)
- Stromversorger: Pherostab. 500, Elektrophoresis powersupply, (Biotech Fischer, Reiskirchen, BRD)
- Pipetten: AbiMED, (Langenfeld, BRD)
- Pipettenspitzen: Roth, (Karlsruhe, BRD)
- Tubes: 1,5 Lock, (Eppendorf, Eppendorf, BRD)

### 3.2.1 Das FACSCalibur

Bei der Durchflußzytometrie mit dem FACSCalibur (*fluorescent activated cell sorting*) werden suspendierte Einzelzellen an einem fokussierten Lichtstrahl (Laser) vorbeigeführt. Dabei senden die Zellen in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Probenvorbereitung charakteristische Lichtsignale aus, die mittels geeigneter Detektoren nachgewiesen werden. Gemessen werden die Vorwärts-Streuung als Maß für die Zellgröße und die Seitwärtsstreuung als Maß für die Zellgranularität sowie das Fluoreszenzlicht, das von dem mit Fluoreszenz-Farbstoff markierten Antikörper abhängig ist. Mittels des FACSCalibur ist es möglich, Zellpopulation zu trennen, um sie so getrennten Untersuchungen zuzuführen. Die gewünschten Einzelzellen mit entsprechender Oberflächenmarkierung werden dabei aus der Zellsuspension durch das Ablenken des Flüssigkeitsstrahls im FACS aussortiert (Abb.2)

Das FACSCalibur ist aus einer Messeinheit aufgebaut, bestehend aus dem Flüssigkeitssystem, der Optik des Anregungslichts, der Detektionsoptik und der

Signalverarbeitung sowie der Workstation, welche wiederum den Computer zur Speicherung und Auswertung der Messungen beinhaltet.

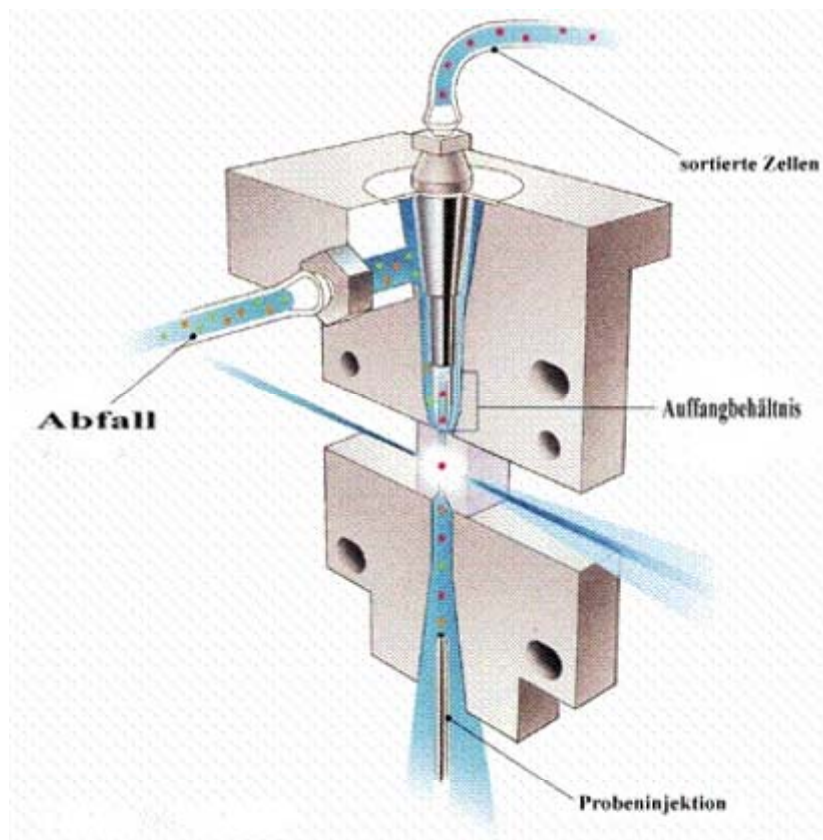


Abbildung 2: schematische Darstellung des Zellsorters

### 3.2.2 Computerprogramme

Microsoft Word 2000 (Microsoft, Redmont, USA)

SPSS Version 9,0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA)

Endnote Version 5,0 (ISI Research Soft, Berkeley, CA, USA)

ImageQuant (Amersham Bioscience AB, Uppsal, Schweden)

## 3.3 Verwendete Substanzen

### PCR

Wasser, Nuclease-Free, sterile, (Biometra, Göttingen, BRD)



Taq-Polymerase, AmpliTaq, AmpliTaq-Gold, (Perkin-Elmer, Distribution Weiterstadt, BRD)

Masteramp-Enzyme-Sample Kit, (Biozym Diagnostik, Oldendorf, BRD)

PCR-Buffer

MgCl<sub>2</sub>, 25mM, (Perkin-Elmer, Distribution Weiterstadt, BRD)

Primer, (BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Berlin, BRD)

β-Actin: forward GGC ATC GTG ATG GAC TCC G

reverse GCT GGA AGG TGG ACA GCG A

ST6Gal-I

Exon U: forward GCT CCA AGA ACT TAC GGC

reverse TGG TTG GTA GGT CCT TCC

Exon X: forward AAG CTC TGC ATC CCT TCT C

reverse AGG CCT TCA GGT CCT CAG

Exon Y: forward AAC AAA GGG AGC CGA TAC

reverse GCC CAT TTT TCT CAG GAT

Coding Region: forward ACT TCC AAC AAG ATG TGG GC

reverse AGT CTT GCG CTT GGA TGG

dNTP-Set, 100 mM Solution, (Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD)

Mineral Oil, (Sigma-Aldrich Chemie, Dreisenhofen, BRD)

### **RNA-Extraktion**

GITC: Guanidinisothiocyanat (Roth, Karlsruhe, BRD)

Natriumcitrat (Roth, Karlsruhe, BRD)

Natrium-laurolyl-sarcosinat (Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD)

Mercaptoethanol (Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD)

Natriumacetat, (Roth, Karlsruhe, BRD)

Roti-Phenol/Chloroform, (Roth, Karlsruhe, BRD)

Isopropanol, (Rotipuran, Roth, Karlsruhe, BRD)

Glykogen, (Boehringer Mannheim, Mannheim, BRD)

Ethanol, (Rotipuran, Roth, Karlsruhe, BRD)

### **DNase-Behandlung**

Inkubationspuffer: Tris-HCL, Magnesiumchlorid, (Roth, Karlsruhe, BRD)

RNasin, Ribonuklease-Inhibitor, 40 U/ $\mu$ l, (Promega Deutschland GmbH, BRD)

DNase1, RNase-free, 10 U/ $\mu$ l, (Boehringer Mannheim, Mannheim, BRD)

### **cDNA-Synthese**

Hexamer Random Primer, (BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Berlin, BRD)

M-MLV Reverse Transkriptase, (Promega Deutschland GmbH, BRD)

M-MLV Reverse Transkriptase 5 x Buffer, (Promega Deutschland GmbH, BRD)

Bovine Serum Albumin, acetyliert, (Promega Deutschland GmbH, BRD)

### **Gel-Elektrophorese**

Ethidiumbromid, (Amresco, Solon, Ohio, USA)

Agarose Gel NEE0, (Roth, Karlsruhe, BRD)

TBE-Puffer: 0,45 M Tris-Borat, Tris-Hydrochlorid, Borsäure, (Roth, Karlsruhe, BRD)

0,01 M EDTA, (Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD)

Ladepuffer: Glycerin, (Roth, Karlsruhe, BRD)

Bromphenolblau, (Roth, Karlsruhe, BRD)

Ficoll Typ 400, (Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD)

Xylane Cyomate FP, (Biorad Laboratories GmbH, München, BRD)

DNA-Standard VII, (Boehringer Mannheim, Mannheim, BRD)

### **HPLC**

Herstellung des Testpuffers (pH=6,5):

0,5M Na-Cacodylat (Sigma-Aldrich, Steinheim)

0,13M N-Acetyllaktosamin (Chess, Mannheim)

20mM MnCl<sub>2</sub> (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)

2mM CDP-Cholin (Cytidine 5'-Diphosphocholine; Sigma Chemical Co.)

1mM PMSF (Phenylmethansulfonsäurefluorid; Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Herstellung der 2 mM CMP-3[H]-NeuAc-Lösung (Substrat):

200µl 4mM CMP-NeuAc nativ (Oxford GlycoSystems)

160µl dest.H<sub>2</sub>O

80µl 3[H]-CMP-NeuAc (Du Pont, Men Products, Boston, 788,1 GBq/mmol)

Herstellung der 77%- und 85%-igen Laufmittel:

Acetonitril (Merck, Darmstadt)

15mM Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer (Merck, Darmstadt), pH=6,5

Proteinbestimmung (Bio-Rad, München):

BSA-Standard

Farbstoff

PS-Küvetten (Faust, Berlin)

### 3.4 Die semiquantitative RT-PCR

Die PCR dient zur Analyse der DNA, mithilfe der RT-PCR ist es jedoch auch möglich, Untersuchungen an der RNA und somit an der Genexpression vorzunehmen. Dabei dient die RNA als Ausgangsmaterial. Mit dem Enzym Reverse Transkriptase wird eine DNA-Kopie hergestellt, die als Ausgangsmatrix für die Amplifikation dient.

Nach der RNA-Extraktion mit Guanidin-Isothiocyanat und Phenol-Chloroformlösung wurde die gewonnene RNA einer DNase-Behandlung unterzogen, um genomische DNA abzubauen. RNA -Quantität und -Qualität sind spektrophotometrisch gemessen worden. Fünf Mikrogramm der zellulären mRNA wurden mit M-MLV Reverse Transkriptase und Random Hexamere Primern inkubiert. Die gewonnene cDNA konnte dann der eigentlichen PCR zugeführt werden. Jede Probe wurde getrennt auf jedes Exon untersucht, einschließlich der Coding-Region. Um die mRNA semiquantitativ bestimmen zu können, ist  $\beta$ -Actin in jedem Tube mitamplifiziert worden.  $\beta$ -Actin ist ein Protein des Zytoskeletts und kommt als sogenanntes „*housekeeping gene*“ ubiquitär im menschlichen Organismus vor. Unter der Annahme, daß *housekeeping genes* konstant auf einem basalen Level exprimiert werden, dienen diese als interner Standard, der ebenso wie die zu untersuchenden RNA-Proben von allen Versuchsschritten beeinflusst wird.

Für alle Proben wurden folgende Cycler- Einstellungen verwendet: 1 min bei 94°C, 1 min bei 59°C, 2 min bei 72°C, für die Extension 10 min bei 72°C, bei insgesamt 30 Schleifen.

Das PCR-Reaktionsgemisch enthielt jeweils 1,5  $\mu$ l PCR buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl), 1-3 mM  $MgCl_2$ ; 5  $\mu$ l Proben-cDNA; 1,5  $\mu$ l 2 mM dNTPs; 0,2  $\mu$ l AmpliTaq; 0,2  $\mu$ l  $\beta$ -Actin Primer (Konzentration 0,25  $\mu$ M); Primer für die unterschiedlichen 5'-untranslatierten Regionen und Primer für die Coding-Region. Für das Exon U wurde 1  $\mu$ l pro Primer eingesetzt, (alle Konzentrationen mit 50  $\mu$ M) das Exon X 0,6  $\mu$ l, das Exon Y 0,6  $\mu$ l, die Coding-Region 0,6  $\mu$ l. Das Volumen von 15  $\mu$ l pro Tube wurde mit  $H_2O$  erreicht.

Die Amplifikation mit dem für das Exon U spezifischen Primer ergibt ein Produkt von 110 Basenpaaren (bp). Demgegenüber stellte sich bei der Amplifikation mit dem für das Exon X spezifischen Primer eine 198 bp lange Sequenz heraus, die im Exon X beginnt

und im Exon I aufhört. Die Isoform Y wurde mit einer Sequenz von 271 bp nachgewiesen, welche im Exon Y startet und im Exon Z endet. Die für die Coding-Region spezifischen Primer amplifizieren eine 398 bp lange Sequenz von Exon II bis zum Exon III.

Die Reaktionsprodukte wurden der Gel-Elektrophorese mit einem 3% Agarose Gel mit Ethidium-Bromid zugeführt. Fluoreszenzmessungen wurden an einem Fluor-Imager vorgenommen. Für die semiquantitative Analyse der RT-PCR Daten wurde die Fluoreszenz für jede Probe mit der Fluoreszenz von dem im gleichen Tube mitamplifizierten  $\beta$ -Actin verglichen. Der Wert resultierte sich aus dem Verhältnis der Fluoreszenz des jeweiligen ST6Gal-I Exons und der Fluoreszenz des  $\beta$ -Actins.



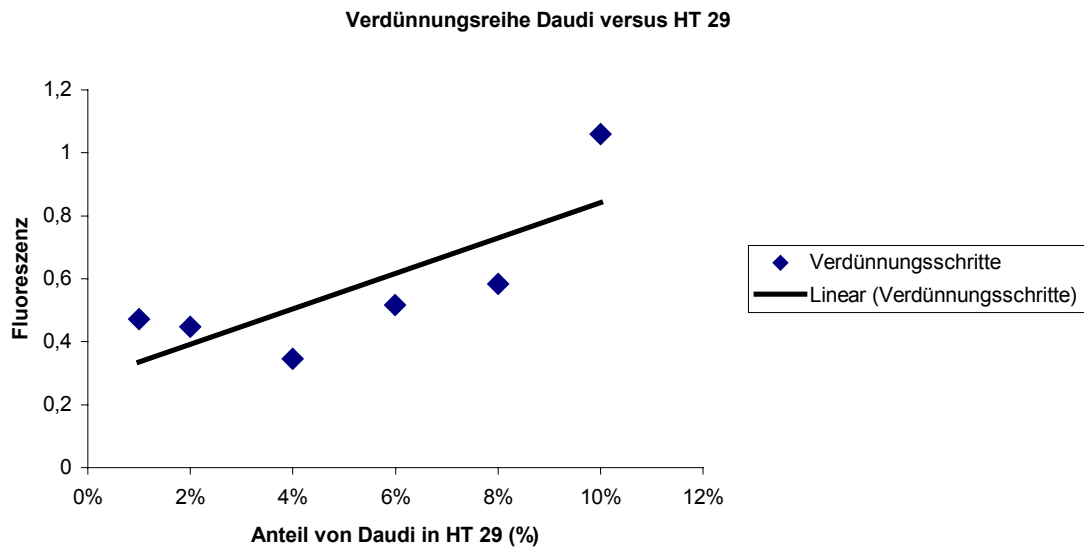
**Abbildung 3: Semiquantitative Analyse der Expression der Splicingvarianten der ST6Gal I, von links nach rechts: Exon- U, X, Y und Coding Region, obere Banden repräsentieren das mitamplifizierte  $\beta$ -Actin**

### 3.4.1 Nachweisgrenze der semiquantitativen RT-PCR

Um eine Kontamination der Gewebeproben durch B-Lymphozyteninfiltrate ausschließen zu können, wurde die Nachweisgrenze der RT-PCR ausgetestet, indem Zellen der Kolonkarzinomlinie HT 29 mit Zellen der B-Zelllinie Daudi in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt wurden. Die B-Zelllinie Daudi exprimiert die lymphozyten spezifische Isoform X und wurde in abnehmender Menge mit der Kolonkarzinomlinie HT 29, die diese Isoform nicht exprimiert, vermengt.

Beinhaltet die Probe 1 % Lymphozyten, so beträgt die Fluoreszenz 0,47 für die Isoform X im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin.

Aus den ermittelten Werten wurde ein Diagramm erstellt, das den linearen Zusammenhang zwischen der Menge der zugesetzten Daudi-Zellen und der Menge der mRNA für die Splicingvariante X verdeutlicht. Die daraus errechnete Trendlinie lässt ungefähr abschätzen, wie viel Prozent Lymphozyten das Gewebe enthalten muß, um eine bestimmte mRNA-Menge für die Splicingvariante X nachzuweisen. Bezogen auf die Ergebnisse der Durchflußzytometrie ermittelt man mit der Formel für diese Trendlinie einen Gehalt von 7 % Lymphozyten bei einer mRNA-Menge von 0,69 (Probe Nr. 1033 der FACS-Versuche), der andere Tumor enthielt 30% Lymphozyten bei einer mRNA Menge von 2,02 (Probe Nr. 1947 der FACS-Versuche) für die Isoform X. Selbst bei einem nicht sortierten Tumor wäre ein solch hoher Anteil von Lymphozyten sehr unwahrscheinlich, so daß man davon ausgehen muss, daß die Expression dieser Splicingvariante tumoreigen ist.



**Abbildung 4: Verdünnungsreihe Daudi in HT 29 mit Trendlinie**

### **3.5 Probenvorbereitung für den Cell-Sorter**

Um die Zellen im FACScalibur zu detektieren und auszusortieren, mussten die Tumoren entsprechend aufgearbeitet werden. Die Untersuchung der Zellen im FACScalibur ist nur möglich wenn die Zellen als Suspension vorliegen. Nachdem die Gewebeproben gründlich mit HBSS gewaschen wurden erfolgte die Zerkleinerung mittels Skalpell in ca. 2-3 mm große Fragmente. Anschließend wurde die chemische und mechanische Aufspaltung des Gewebes in der Trypsinierungsflasche durchgeführt. Über Nacht wurden die Proben mit Collagenase und Dnase bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine erneute Inkubation mit Collagenase und Dnase bei 37° C für eine Stunde. Anschließend wurden die so gelösten Zellen durch eine 40 µm Gase filtriert. Nach der Zentrifugation und erneuter Waschung mit PBS wurden die Zellen auf Vitalität mit Trypanblau in der Neubauerkammer geprüft. Die so gewonnene Zell-Suspension konnte nun der Färbung zugeführt werden.

Nach Inkubation mit Kaninchenserum für 15 Minuten bei 4°C und mehrmaligem Waschen mit PBS erfolgte schließlich die Färbung. Im ersten Schritt wurden die Tumorzellen mit einem HEA-spezifischen Antikörper (human epithelian antigen) inkubiert, im zweiten Schritt erfolgte die Inkubation mit einem Anti-IgG<sub>1</sub>-FITC (Fluorescein –Isothiocyanat). Nach mehrmaligem waschen wurden die Proben in Färbepuffer gelöst.

### **3.6 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

Das Prinzip beruht auf der Verteilung der Komponenten eines Substanzgemisches in zwei Phasen. Während sich die feste stationäre Phase in der Trennsäule befindet, strömt die mit den zu trennenden Substanzgemischen angereicherte mobile Phase an der stationären vorbei. Bei dem in der vorliegenden Arbeit durchgeführten HPLC-Verfahren handelt es sich um eine Ionenaustauschchromatographie. Hierbei kommt es zu reversiblen Bindungen zwischen den an die Matrix des Ionenaustauschers

gebundenen Festionen und den mobilen Gegenionen. Passiert ein ionisches Gemisch die Trennsäule, so werden neutrale Moleküle oder Ionen mit der gleichen Ladung wie die Festionen eluiert, während entgegengesetzt geladene Ionen an die Aminogruppen gebunden und zurückgehalten werden. Die gebundenen Ionen werden dann durch Elution mit geeigneten Basen oder Säuren differentiell abgelöst, d.h. die Substanzen haben unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten. Danach ist es möglich, auch chemisch eng verwandte Moleküle mit gleicher Ladung zu trennen. In der hier zugrundeliegenden Untersuchung wurde ein Anionenaustauscher als Matrix in der Trennsäule eingesetzt, der aus Kieselgel mit Aminofunktionen besteht. Die negativ geladenen Proteine wurden hierbei an das Gel gebunden, zurückgehalten und durch entsprechende Lösungsmittel mit anderem pH-Wert wieder abgelöst und aufgetrennt.

Dann erfolgte die Fraktionierung der getrennten Komponenten nach Injektion der Probe mit Hilfe des Fraktionssammlers.

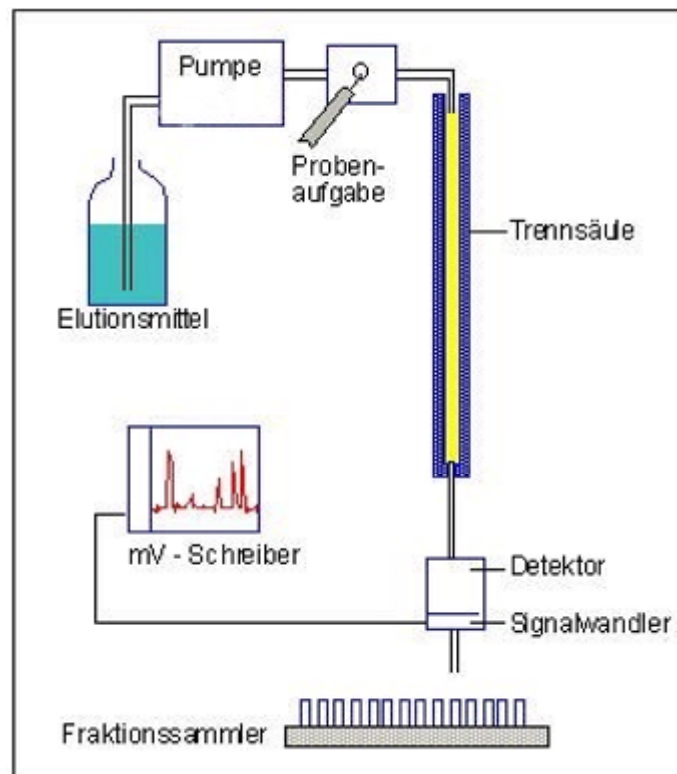
Die Chromatogramme wurden mittels eines an einen UV-Detektor ( $\lambda=200$  nm) angeschlossenen Schreibers aufgezeichnet.

Zuvor wurde die Probe, um einen ausreichenden Substratumsatz zu gewährleisten, für 5 h bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Die Sialyltransferase überträgt hierbei die radioaktiv markierte Substanz (CMP-[3H]-NeuAc) als Substrat auf das Glykoprotein, in diesem Fall das als Akzeptor fungierende Laktosamin. Das Produkt ist dann das  $\alpha$ 2,6-sialysierte Laktosamin. Anschließend erfolgte die Proteinausfällung durch 20 min. Erhitzen bei 98° C, Zentrifugation, sowie Filtrierung des Überstandes der schließlich der eigentlichen Chromatographie zugeführt wurde.

Der Umsatz der Enzyme mit dem radioaktiv markierten Substrat wurde mithilfe eines  $\beta$ -Counters gemessen. Der Detektor des  $\beta$ -Counters besteht aus einem Flüssigszintillator und einem Photomultiplier. Im Flüssigszintillator findet die Umwandlung der radioaktiven Zerfallsenergie in Photonen mit Hilfe der Szintillatorlösung statt. Als Szintillatorlösung wurde Ultima Gold® zu den Fraktionen gegeben. Der Photomultiplier des  $\beta$ -Counters setzt schließlich Photonen in elektrische Impulse um. Die Enzymaktivität  $U$  ist definiert durch die Umsetzung von 1  $\mu$ g Substrat pro Stunde.



So konnte über die Bestimmung der Radioaktivität der einzelnen Fraktionen die Aktivität des Enzyms berechnet werden. Abbildung 4 veranschaulicht den Versuchsaufbau einer HPLC.

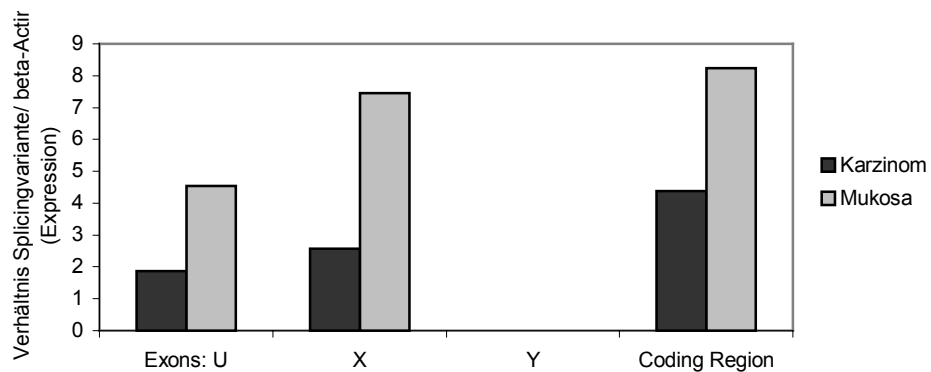


**Abbildung 5: HPLC- Versuchsaufbau**

## 4 Ergebnisse

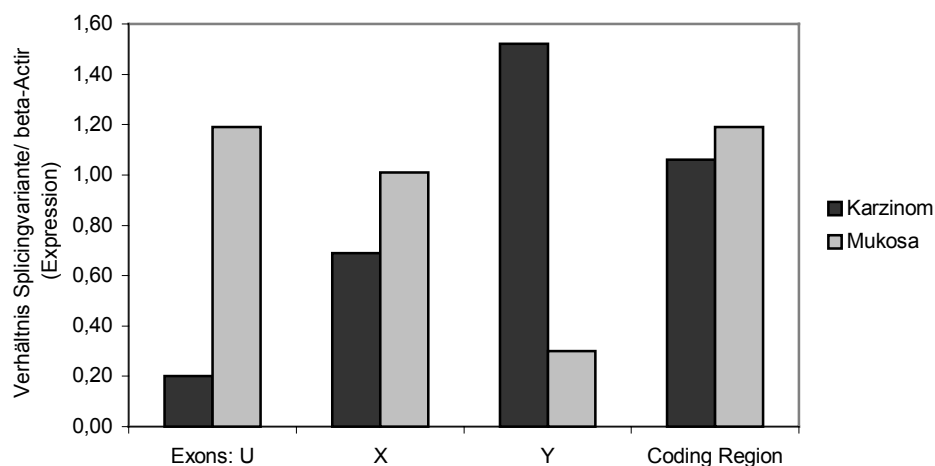
### 4.1 Semiquantitative RT-PCR der ST6Gal-I Splicingvarianten aus Kolonkarzinomzellen und nicht veränderten Mukosazellen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR der 16 untersuchten Kolonkarzinome und der nicht veränderten Mukosa desselben Patienten aufgeführt. Die Ergebnisse der RT-PCR werden in Relation zu  $\beta$ -Actin gesetzt und sind damit semiquantitativ. Die RT-PCR-Ergebnisse resultieren aus dem Quotienten der Fluoreszenz des jeweiligen Exons und der Fluoreszenz von dem im selbem Ansatz mitamplifizierten  $\beta$ -Actins ( $X=ST6Gal-I / \beta$ -Actin). Jeder Ansatz wurde einmal gemessen. Desweiteren sind Geschlecht, Alter, TNM-Klassifikation und Tumor-Grading des jeweiligen Patienten unter jeder Abbildung angegeben.



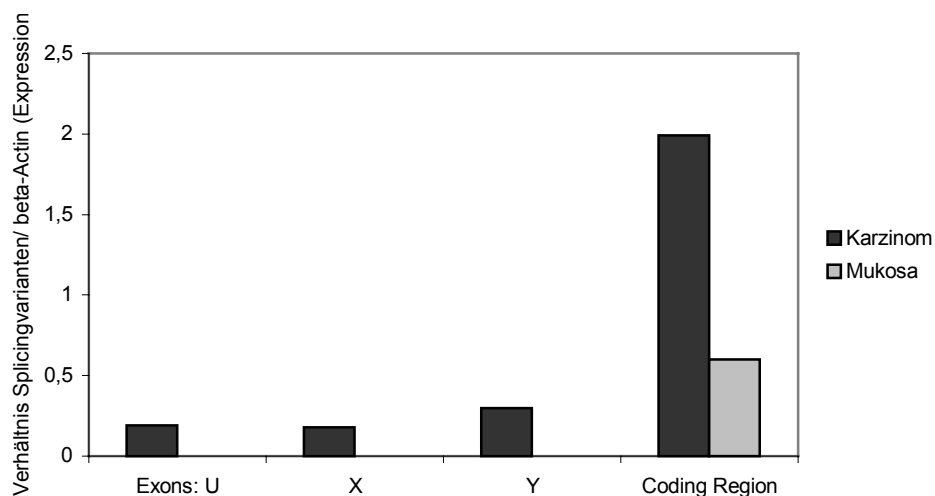
Geschlecht	Alter	T	N	M	G
W	62	2	0	0	2

Abbildung 6: Probe 1101, Ausprägung der Splicingvarianten der ST6Gal-1 in Karzinom- und nicht verändertem Gewebe im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin unter Angabe von Geschlecht, Alter, TNM-Klassifikation und Grading



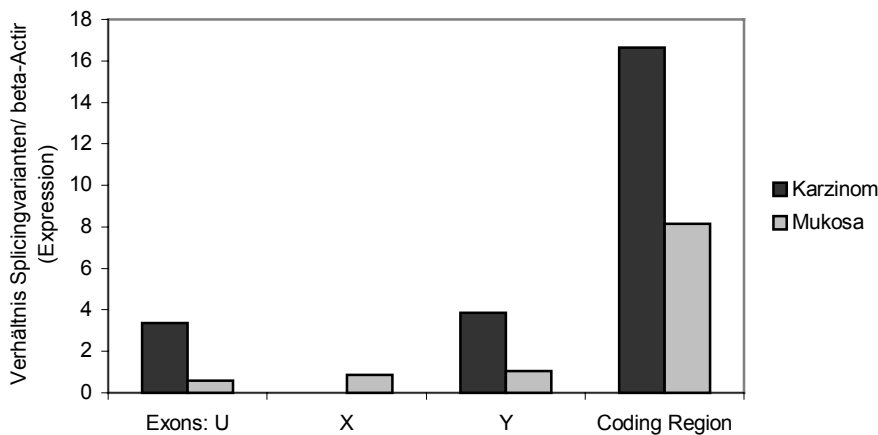
Geschlecht	Alter	T	N	M	G
W	71	3	2	1	2

**Abbildung 7 : Probe 1033, Ausprägung der Splicingvarianten der ST6Gal-1 in Karzinom- und nicht verändertem Gewebe im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin unter Angabe von Geschlecht, Alter, TNM-Klassifikation und Grading**



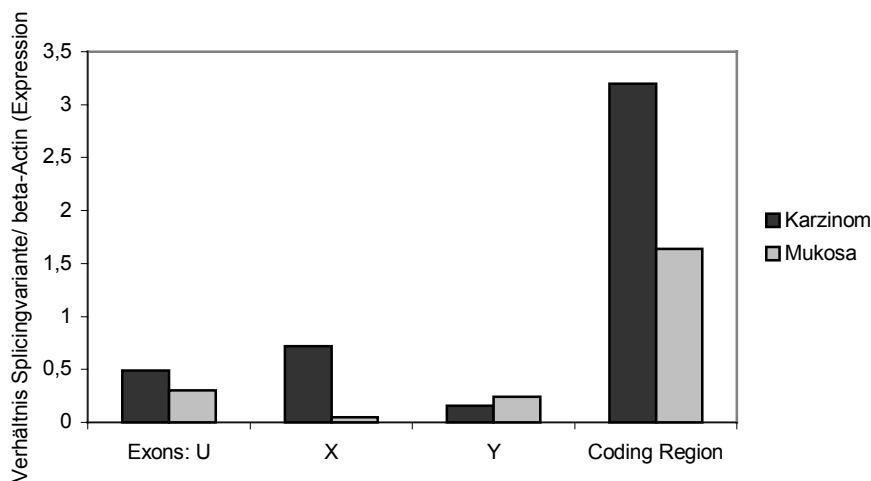
Geschlecht	Alter	T	N	M	G
M	72	4	1	1	2

**Abbildung 8: Probe 546, Ausprägung der Splicingvarianten der ST6Gal-1 in Karzinom- und nicht verändertem Gewebe im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin unter Angabe von Geschlecht, Alter, TNM-Klassifikation und Grading**



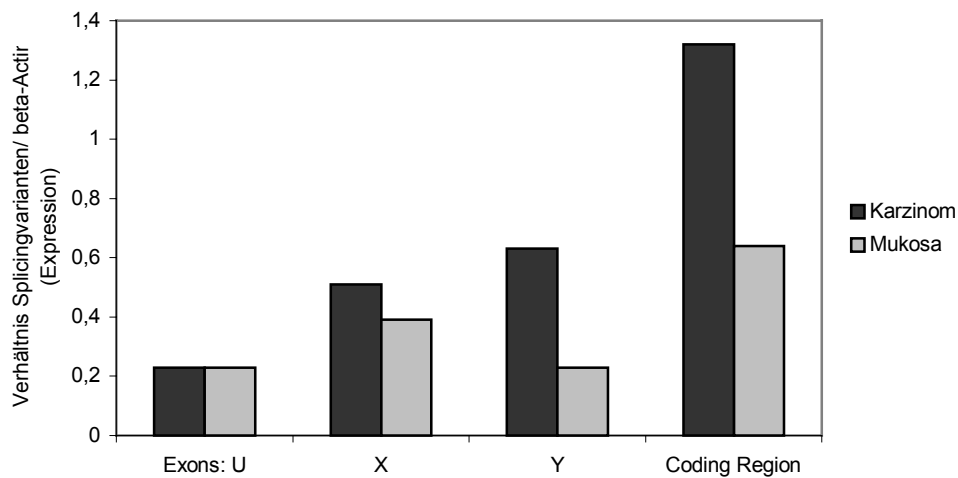
Geschlecht	Alter	T	N	M	G
M	63	3	0	0	2

**Abbildung 9: Probe 983, Ausprägung der Splicingvarianten der ST6Gal-1 in Karzinom- und nicht verändertem Gewebe im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin unter Angabe von Geschlecht, Alter, TNM-Klassifikation und Grading**



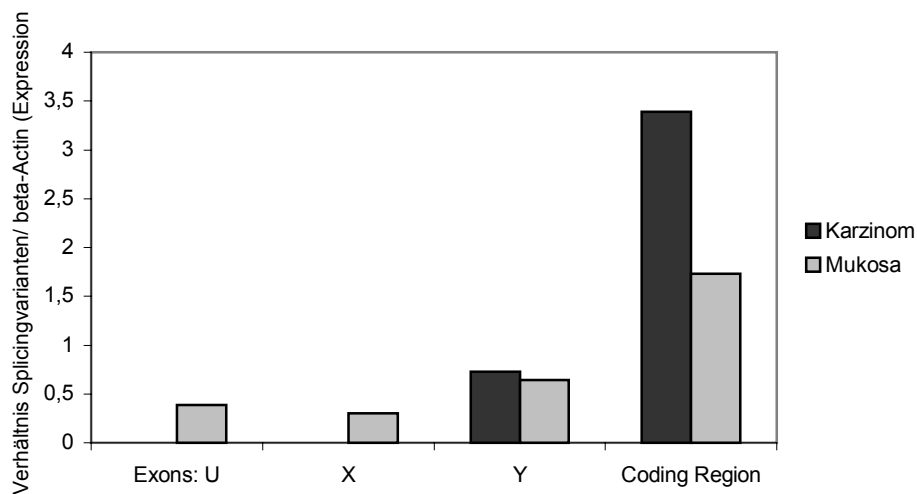
Geschlecht	Alter	T	N	M	G
M	63	3	2	1	2

**Abbildung 10: Probe 1517, Ausprägung der Splicingvarianten der ST6Gal-1 in Karzinom- und nicht verändertem Gewebe im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin unter Angabe von Geschlecht, Alter, TNM-Klassifikation und Grading**



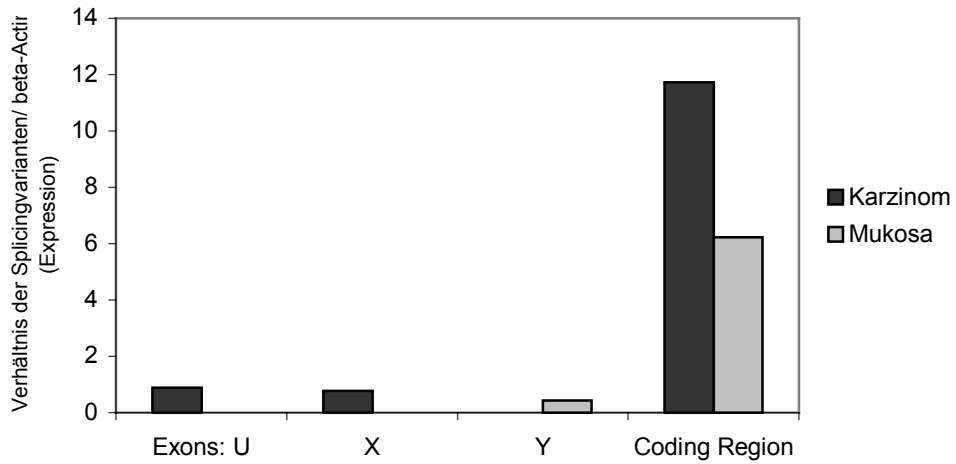
Geschlecht	Alter	T	N	M	G
M	75	3	1	0	2

**Abbildung 11: Probe 1702, Ausprägung der Splicingvarianten der ST6Gal-1 in Karzinom- und nicht verändertem Gewebe im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin unter Angabe von Geschlecht, Alter, TNM-Klassifikation und Grading**



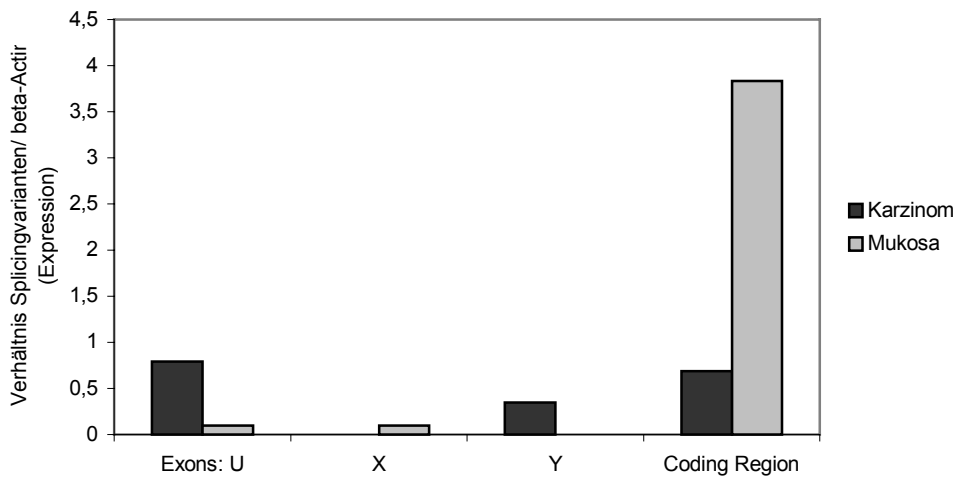
Geschlecht	Alter	T	N	M	G
M	62	1	0	0	1

**Abbildung 12: Probe 1036, Ausprägung der Splicingvarianten der ST6Gal-1 in Karzinom- und nicht verändertem Gewebe im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin unter Angabe von Geschlecht, Alter, TNM-Klassifikation und Grading. Im Karzinomgewebe konnten die Splicingvarianten U und X nicht nachgewiesen werden.**



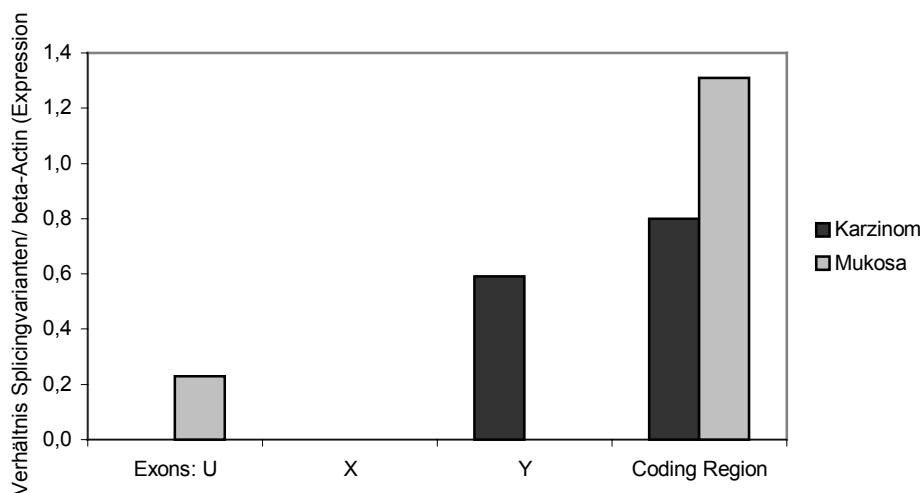
Geschlecht	Alter	T	N	M	G
F	78	3	0	0	2

**Abbildung 13:** Probe 864, Ausprägung der Splicingvarianten der ST6Gal-1 in Karzinom- und nicht verändertem Gewebe (Mukosa) im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin unter Angabe von Geschlecht, Alter, TNM-Klassifikation und Grading



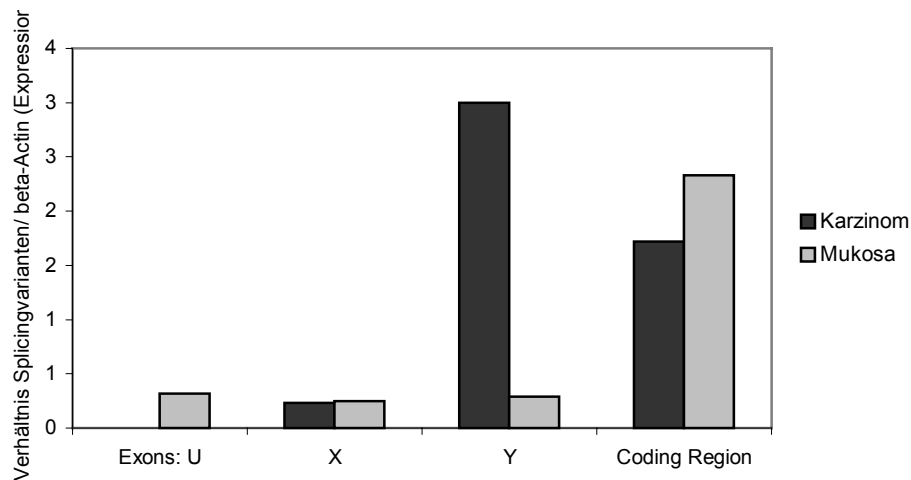
Geschlecht	Alter	T	N	M	G
M	62	3	0	0	2

**Abbildung 14:** Probe 1005, Ausprägung der Splicingvarianten der ST6Gal-1 in Karzinom- und nicht verändertem Gewebe (Mukosa) im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin unter Angabe von Geschlecht, Alter, TNM-Klassifikation und Grading



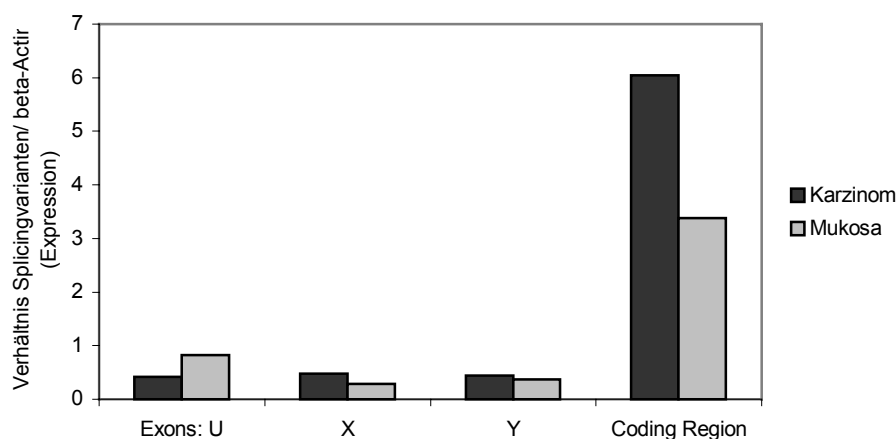
Geschlecht	Alter	T	N	M	G
W	78	3	1	0	2

**Abbildung 15:** Probe 1760, Ausprägung der Splicingvarianten der ST6Gal-1 in Karzinom- und nicht verändertem Gewebe (Mukosa) im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin unter Angabe von Geschlecht, Alter, TNM-Klassifikation und Grading



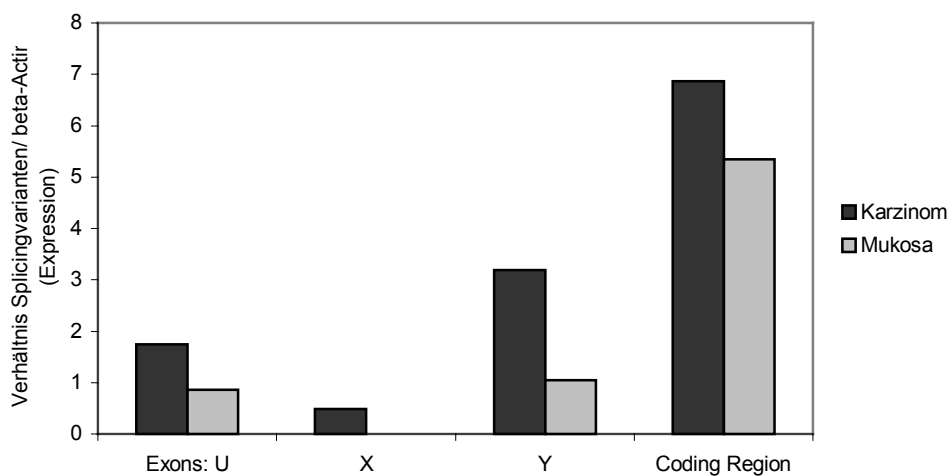
Geschlecht	Alter	T	N	M	G
M	78	3	0	0	2

**Abbildung 16:** Probe 2001, Ausprägung der Splicingvarianten der ST6Gal-1 in Karzinom- und nicht verändertem Gewebe (Mukosa) im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin unter Angabe von Geschlecht, Alter, TNM-Klassifikation und Grading



Geschlecht	Alter	T	N	M	G
M	37	2	0	0	2

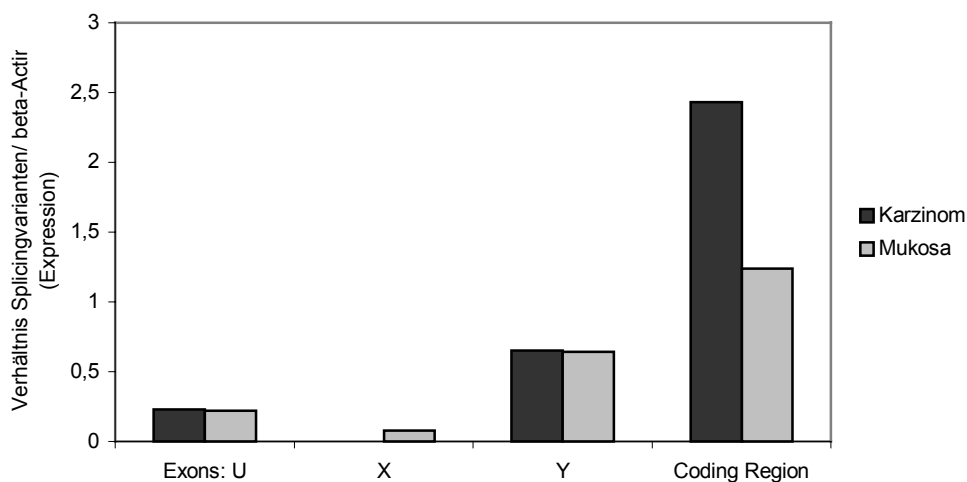
**Abbildung 17:** Probe 2164, Ausprägung der Splicingvarianten der ST6Gal-1 in Karzinom- und nicht verändertem Gewebe (Mukosa) im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin unter Angabe von Geschlecht, Alter, TNM-Klassifikation und Grading



Geschlecht	Alter	T	N	M	G
M	74	4	2	1	2

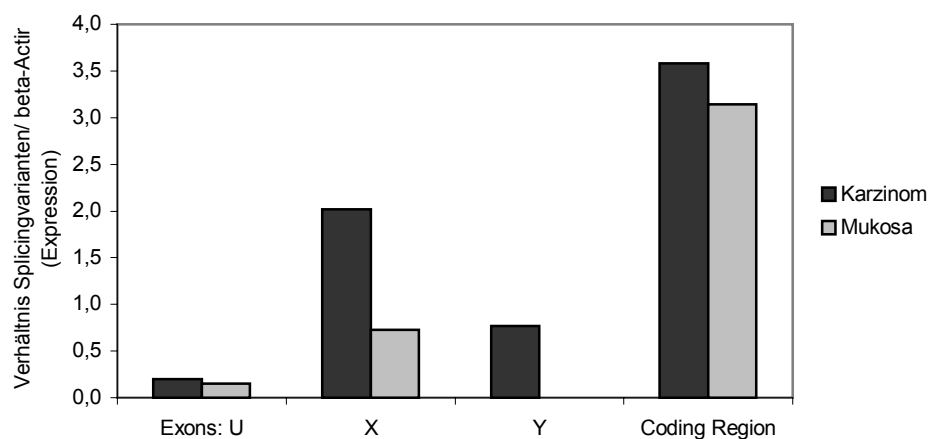
**Abbildung 18:** Probe 2760, Ausprägung der Splicingvarianten der ST6Gal-1 in Karzinom- und nicht verändertem Gewebe (Mukosa) im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin unter Angabe von Geschlecht, Alter, TNM-Klassifikation und Grading





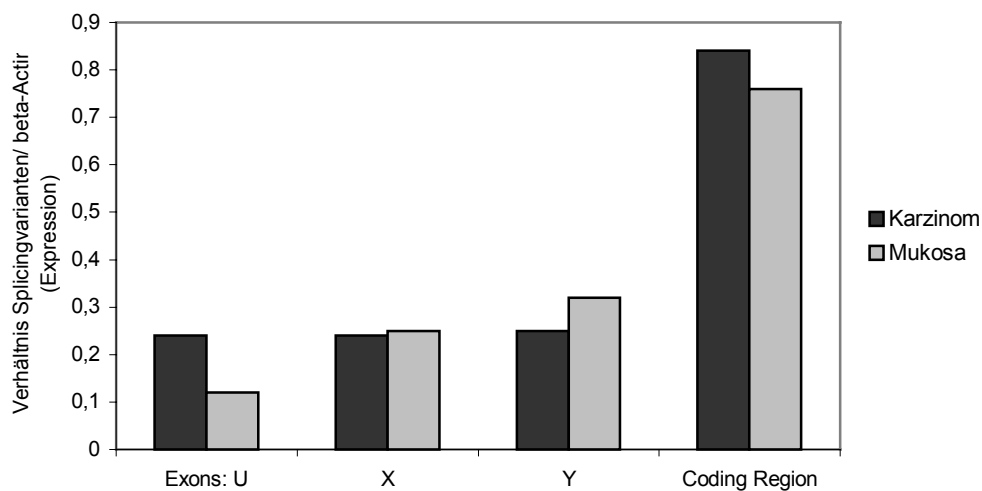
Geschlecht	Alter	T	N	M	G
M	84	3	0	0	2

**Abbildung 19: Probe 1719, Ausprägung der Splicingvarianten der ST6Gal-1 in Karzinom- und nicht verändertem Gewebe (Mukosa) im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin unter Angabe von Geschlecht, Alter, TNM-Klassifikation und Grading**



Geschlecht	Alter	T	N	M	G
W	59	3	1	0	3

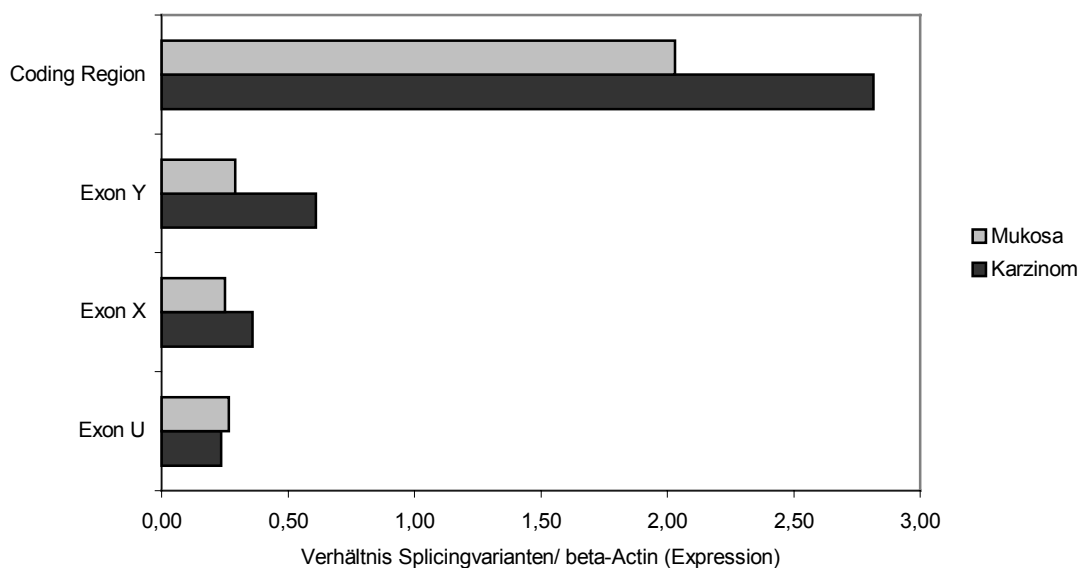
**Abbildung 20: Probe 1947, Ausprägung der Splicingvarianten der ST6Gal-1 in Karzinom- und nicht verändertem Gewebe (Mukosa) im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin unter Angabe von Geschlecht, Alter, TNM-Klassifikation und Grading**



Geschlecht	Alter	T	N	M	G
M	75	3	0	0	2

**Abbildung 21: Probe 1447, Ausprägung der Splicingvarianten der ST6Gal-1 in Karzinom- und nicht verändertem Gewebe (Mukosa) im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin unter Angabe von Geschlecht, Alter, TNM-Klassifikation und Grading**

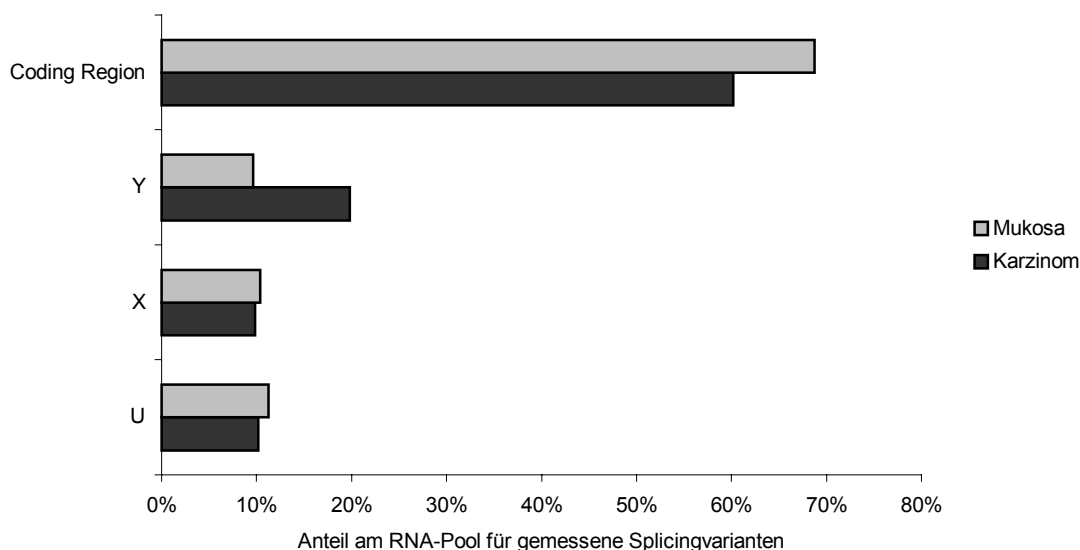
Das folgende Histogramm zeigt die Mediane der RT-PCR-Ergebnisse und spiegelt die Menge der absolut nachgewiesenen mRNA des entsprechenden Exons wieder. Dabei erkennt man die im Median größere Menge mRNA für die ST6Gal-I für die *Coding Region* und die Exons U und X im Karzinom.



**Abbildung 22: Verteilung der Splicingvarianten der ST6Gal-I im Median in kolorektalen Karzinomen und angrenzender Mukosa (N=16)**

Die prozentuale Darstellung verdeutlicht die Verteilung der *Splicing*-Varianten innerhalb des mRNA-Pools für die ST6Gal-I. Für die prozentuale Verteilung wurden die Messergebnisse der verschiedenen Splicingvarianten einer Probe summiert (=100%) und daraus der prozentuale Anteil der einzelnen Splicingvariante bestimmt. Für jede Splicingvariante wurden die so gewonnenen Daten aller Proben summiert und daraus der Mittelwert gebildet. Die Standardabweichung beträgt für die Messung der Splicingvariante U im Karzinom  $\pm 10,66\%$ , für X  $\pm 10,47\%$ , für Y  $\pm 16,76\%$  und für die Coding Region  $\pm 17,60\%$ . Für die in nicht veränderter Mukosa vorgenommenen Messung der Splicingvarianten beträgt die Standardabweichung für die Splicingvariante U  $\pm 8,44\%$ , für X  $\pm 10,49\%$ , für Y  $\pm 8,97\%$  und für die Coding Region  $\pm 20,16\%$ .

Das Exon Y der ST6Gal-I bildet im Karzinom einen prozentual größeren Anteil die anderen Splicingvarianten, verglichen mit nicht veränderter Mukosa.



**Abbildung 23: Prozentuale Verteilung der Splicingvarianten der ST6Gal-I in kolorektalen Karzinomen und angrenzender Mukosa (N=16)**

#### 4.1.1 Statistische Auswertung der Daten

Für die statistische Auswertung der Daten wurde das Computerprogramm SPSS für Windows, Version 9.0 verwandt. Zuerst wurden Unterschiede in der Expression der jeweiligen Splicingvarianten der ST6Gal-I im Karzinom und der Mukosa herausgearbeitet. Die Daten wurden auf Korrelationen hinsichtlich Ausdehnung des Primärtumors (T-Stadium), Metastasierung (M), regionärer Lymphknotenbefall (N=Nodus), und Grading (histologische Bestimmung des Malignitätsgrades) überprüft.

#### 4.1.2 Expression

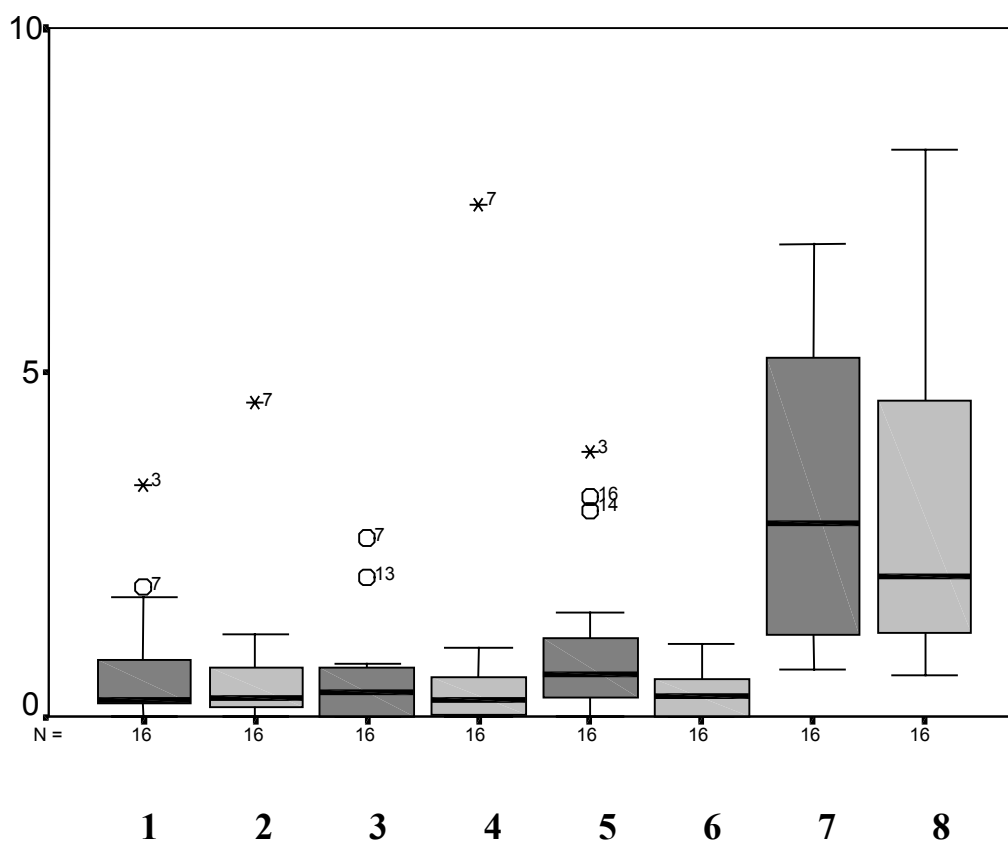
Es galt, Unterschiede in der Expression der Splicingvarianten U, X, Y und der Coding Region der ST6Gal-I zwischen Tumor und angrenzender Mukosa zu finden. Hierzu wurde der Wilcoxon-Test verwandt, ein nichtparametrischer Vergleich zweier abhängiger Stichproben, in diesem Falle handelte es sich um die Ausprägung der Splicingvarianten im Tumor und in der nicht veränderten angrenzenden Mukosa bei demselben Patienten. Der Test basiert auf Rangreihen absoluter Wertepaarunterschieden. Dadurch berücksichtigt der Test die Größe der Differenz durch Zuordnung von

Rangzahlen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. Zur Veranschaulichung der Verteilung und Streuung der Daten wurde ein Boxplot erstellt (Abbildung 24).

**Tabelle 7: Unterschiedliche Expression der Splicingvarianten der ST6Gal-I im Karzinom und Mukosa basierend auf dem Wilcoxon-Test (aller Proben)**

	<b>Exon U</b>	<b>Exon X</b>	<b>Exon Y</b>	<b>Coding Region</b>
<b>p-Wert</b>	0,86	0,77	0,01	0,12

Bei der statistischen Auswertung zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Karzinom und nicht veränderter Mukosa für die Expression des Exon U, Exons X und der Coding Region. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p=0,01$  für das Exon Y besteht eine signifikant vermehrte Expression dieses Exons im Karzinom.



**Abbildung 24:** Boxplot zur Darstellung der Verteilung der Splicingvarianten der ST6Gal-I in kolorektalen Karzinomen und angrenzender Mukosa, Extremwerte als Kreise dargestellt, Ausreißer als Rauten, (1: Exon U Karzinom, 2: Exon U Mukosa, 3: Exon X Karzinom, 4: Exon X Mukosa, 5: Exon Y Karzinom, 6: Exon Y Mukosa, 7: Coding Region Karzinom, 8: Coding Region Mukosa), Ordinate: Rangreihen der Wertepaardifferenzen durch Wilcoxon-Test

Insgesamt wurden 16 Fälle, von denen ein Tumor und angrenzende, nicht veränderte Mukosa vorlag, auf eine Korrelation zwischen der Expression der verschiedenen Splicingvarianten und der Metastasierung analysiert. Bei der statistischen Auswertung wurden metastasierte Tumoren daraufhin untersucht, ob diese einen signifikanten Unterschied in der Ausprägung der Splicingvarianten gegenüber den nicht metastasierten Tumoren zeigen. Dieses wurde mit Hilfe des Mann-Whitney Tests überprüft, einem Test zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben, der auf einer gemeinsamen Rangreihe der Werte der Stichproben basiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

**Tabelle 8: Einfluss der Metastasierung auf die Expression der Splicingvarianten der ST6Gal-I unter Anwendung des Mann-Whitney Tests**

<b>Karzinom</b>	<b>Exon U</b>	<b>Exon X</b>	<b>Exon Y</b>	<b>Coding Region</b>
<b>p-Wert</b>	0,95	0,45	0,86	1

<b>Mukosa</b>	<b>Exon U</b>	<b>Exon X</b>	<b>Exon Y</b>	<b>Coding Region</b>
<b>p-Wert</b>	0,52	0,32	0,95	0,32

Die Irrtumswahrscheinlichkeit für den Einfluss der Metastasierung auf die Ausprägung der verschiedenen Splicingvarianten lag bei keinem p-Wert unter 0,05. Somit besteht keine signifikante Korrelation zwischen Metastasierung und veränderter Expression der Splicingvarianten.

### 4.1.3 Tumor-Stadium

Es stellte sich die Frage, ob eine Korrelation zwischen der Expression einzelner Splicingvarianten der ST6Gal-I und der Ausdehnung des Tumors besteht.

Zur Überprüfung diesbezüglich wurde der Kruskal-Wallis Test verwandt, ein Test zur einfaktoriellen Varianzanalyse.

**Tabelle 9: Einfluss der Zunahme des Tumor-Stadiums auf die Expression der Splicingvarianten der ST6Gal-I unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Test**

<b>Karzinom</b>	<b>Exon U</b>	<b>Exon X</b>	<b>Exon Y</b>	<b>Coding Region</b>
<b>p-Wert</b>	0,34	0,38	0,55	0,46

<b>Mucosa</b>	<b>Exon U</b>	<b>Exon X</b>	<b>Exon Y</b>	<b>Coding Region</b>
<b>p-Wert</b>	0,24	0,15	0,68	0,46

Bei keiner der Splicingvarianten der ST6Gal-I bestand eine Korrelation hinsichtlich der Expression und des Tumor-Stadiums.

### 4.1.4 Regionärer Lymphknotenbefall (N)

Der Ausgangspunkt für diesen Test war die Überlegung, ob eine Korrelation zwischen der Besiedlung regionärer Lymphknoten und einer veränderten Expressionen der einzelnen Splicingvarianten der ST6Gal-I besteht. Auch in diesem Falle wurde der Kruskal-Wallis-Test verwandt.



**Tabelle 10: Einfluss Besiedlung regionärer Lymphknoten (Stadium N) auf die Expression der Splicingvarianten der ST6Gal-I unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Test**

<b>Karzinom</b>	<b>Exon U</b>	<b>Exon X</b>	<b>Exon Y</b>	<b>Coding Region</b>
<b>p-Wert</b>	0,19	0,42	0,74	0,55

<b>Mukosa</b>	<b>Exon U</b>	<b>Exon X</b>	<b>Exon Y</b>	<b>Coding Region</b>
<b>p-Wert</b>	0,13	0,76	0,06	0,15

Die Irrtumswahrscheinlichkeit für den Einfluss der Besiedlung regionärer Lymphknoten auf die Ausprägung der verschiedenen Splicingvarianten lag bei keinem p-Wert unter 0,05. Somit besteht keine signifikante Korrelation zwischen regionärem Lymphknotenbefall und veränderter Expression der Splicingvarianten.

#### **4.1.5 Grading**

Ferner wurde die Hypothese überprüft, ob zwischen dem histologischen Malignitätsgrad und einer abweichenden Expression der Splicingvarianten der ST6Gal-I ein Zusammenhang besteht. Der histologische Malignitätsgrad findet seinen Ausdruck im Grading, wobei Grad 1 hochdifferenziertes Gewebe mit einer geringen Malignität, Grad 2 mitteldifferenziertes Gewebe mit mäßiger Malignität und Grad 3 niedrigdifferenziertes mit einer hohen Malignität beschreibt. Hierzu wurde ebenfalls der Kruskal-Wallis-Test verwandt.

**Tabelle 11: Einfluss der Zunahme des Gradings auf die Expression der Splicingvarianten der ST6Gal-I unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Test**

<b>Karzinom</b>	<b>Exon U</b>	<b>Exon X</b>	<b>Exon Y</b>	<b>Coding Region</b>
<b>p-Wert</b>	0,28	0,19	0,63	0,81

<b>Mukosa</b>	<b>Exon U</b>	<b>Exon X</b>	<b>Exon Y</b>	<b>Coding Region</b>
<b>p-Wert</b>	0,66	0,51	0,28	0,94

Für keine der Splicingvarianten der ST6Gal-I besteht ein Zusammenhang hinsichtlich veränderter Expression und histopathologischem Grading.

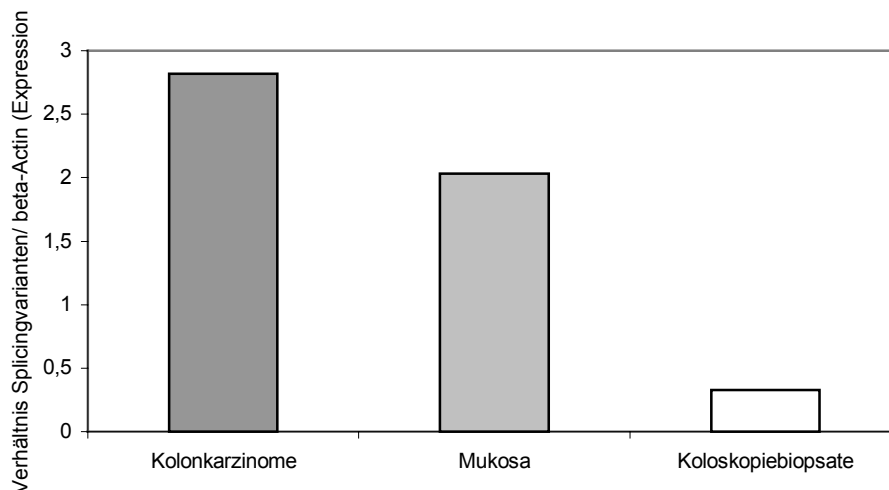
## **4.2 RT-PCR Analyse der ST6Gal-I von Koloskopiebiopsaten gesunder Personen**

Die Tabelle 12 beinhaltet die Ergebnisse der RT-PCR aus Zellen von Koloskopiebiopsaten, bei denen kein pathologischer Befund erhoben wurde. Es wurden 6 Koloskopiepräparate ausgewertet.

**Tabelle 12: PCR-Daten (Verhältnis Splicingvarianten/beta-Actin) von Koloskopiebiopsaten gesunder Personen.**

Gewebe Nr.	Exons: U	X	Y	Coding Region
12	0	0	0	0,72
15	0	0	0	0,13
17	0	0	0	0,37
18	0	0	0	0,29
20	00	0	0	0,18
25	0,57	0,57	0	1,08

Im folgenden Histogramm sind die Mediane der RT-PCR-Ergebnisse der ST6Gal-I Coding Region zur Verdeutlichung der Unterschiede zwischen Karzinom, angrenzender Mukosa und Koloskopiebiopsaten aufgetragen.



**Abbildung 25: Mediane der RT-PCR- Ergebnisse (Verhältnis Splicingvarianten/beta-Actin) der Coding Region der ST6Gal-I von Kolonkarzinomen, angrenzender Mukosa und Koloskopiebiopsaten**

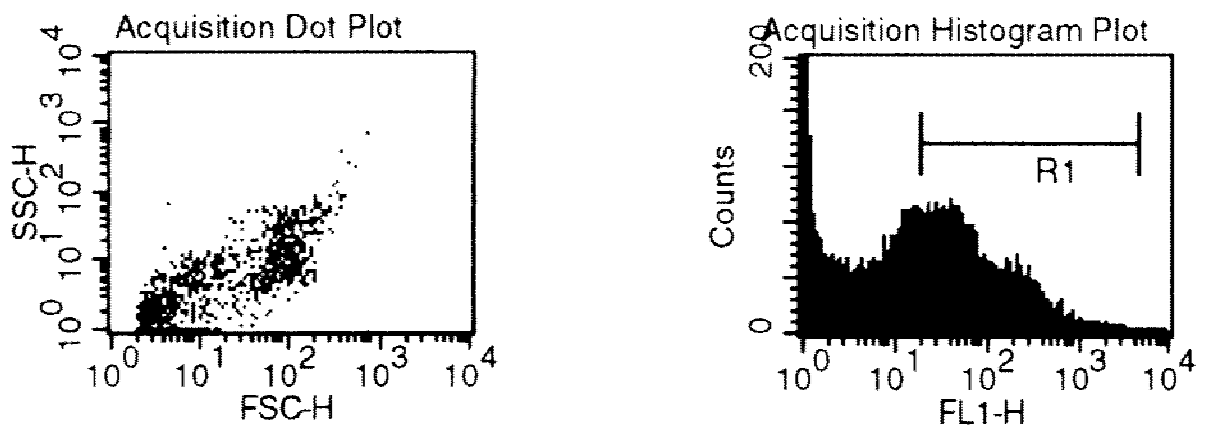
Nur in einem Fall konnten die Splicingvarianten U und X nachgewiesen werden, interessanterweise konnte bei diesem Patienten später ein tubulovillöses Adenom diagnostiziert werden.

### **4.3 Analyse der Tumorproben nach Depletion der Lymphozyteninfiltrate**

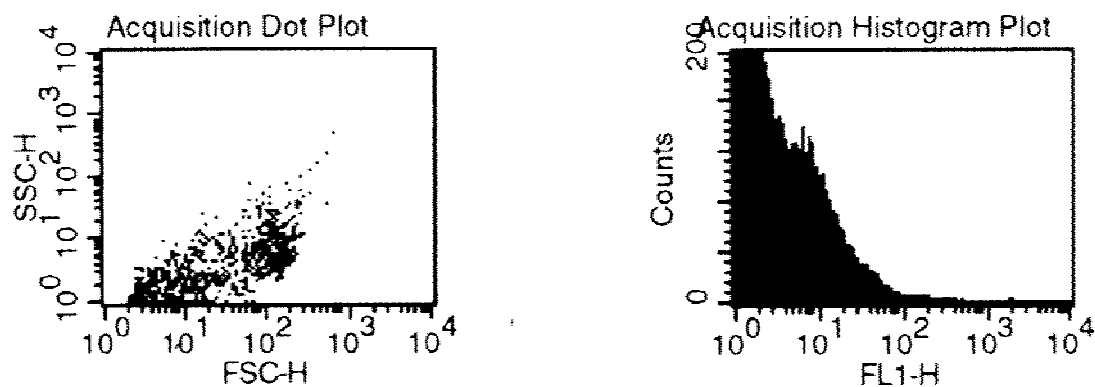
Die Durchflusszytometrie wurde eingesetzt, um herauszufinden, ob die mRNA von Splicingvarianten der ST6Gal-I tatsächlich von Gewebe aus Kolonkarzinomen stammt und nicht etwa aus eingewanderten Lymphozyten, die ebenfalls in der Lage sind, die ST6Gal-I zu synthetisieren. Um den Bereich der zu sortierenden Zellen zu definieren, werden ebenfalls Tests ohne den epithelialen Antikörper, der nicht fluoreszent ist, gemacht. Die sogenannte Isotypenkontrolle beinhaltet einen Antikörper aus der gleichen Immunglobulinklasse wie der spezifisch bindende epitheliale Antikörper HEA (Human Epithelial Antibody) und die sekundären fluoreszierenden Antikörper. Von der eigentlichen Probe wird dann die Fluoreszenz der Isotypenkontrolle subtrahiert, so daß nur Zellen mit gebundenen epithelialen und sekundären fluoreszierenden Antikörpern sortiert werden. Somit werden nur epitheliale Zellen, in diesem Falle Kolonkarzinomzellen aussortiert und gesammelt. Der Acquisition Dot Plot und der Acquisition Histogramm Plot in Abbildung 7 verdeutlichen dies.

Im Acquisition Dot Plot ist auf der X-Achse der Forward Scatter (FSC-H), die Lichtbeugung, aufgetragen, welche proportional zur Zelloberfläche (Zellgröße) ist. Der Side Scatter SSC-H auf der Y-Achse misst die Lichtbrechung und Reflektion, welche sich proportional zur Zellgranularität verhält.

Im Acquisition Histogramm Plot ist die typische Fluoreszenz für den verwendeten Farbstoff FITC auf der X-Achse dargestellt (FL1-H), auf der Y-Achse die gezählten Ereignisse (Counts).



**Abbildung 26: Acquisition Dot Plot: jede Zelle wird durch einen Punkt repräsentiert, die Achsen repräsentieren die Lichtintensitäten, Acquisition Histogramm Plot von sortierten Tumor 1, Faerbung HEA+Anti-IgG1-FITC, Sortierte Zellen: Region 1 (R1)**



**Abbildung 27: Acquisition Dot Plot und Acquisition Histogramm Plot, Isotypenkontrolle für Tumor 1, Faerbung: IgG1+ Anti-IgG1-FITC**

Bei den sortierten Zellen konnten alle Splicingvarianten der ST6Gal-I nachgewiesen werden. Von den sortierten Zellen (Lymphozyten depletiert) sind die Ergebnisse der RT-PCR in Tabelle 13 zusammengefasst.

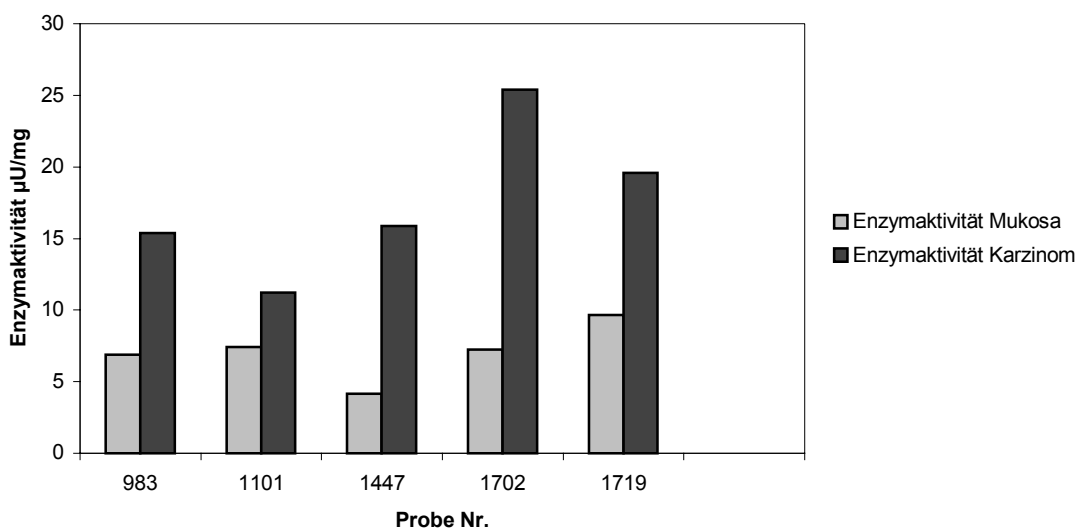
**Tabelle 13: RT-PCR-Ergebnisse sortierter Zellen**

Probe Nr.	Exons: U	X	Y	Coding Region
1036	0	0	0,73	3,39
1033	0,2	0,69	1,52	1,06
1760	0	0	0,59	0,8
1947	0,2	2,02	0,77	3,58

#### **4.4 HPLC-Analyse der ST6Gal-I Enzymaktivität in den Tumorbiopsaten**

Die Versuche mit der HPLC wurden zum einen mit der Fragestellung durchgeführt, ob die Enzymaktivität der ST6Gal-I mit der nachgewiesenen mRNA-Menge korreliert, andererseits ob das Auftreten bestimmter Splicingvarianten mit einer erhöhten bzw. erniedrigten Enzymaktivität verbunden ist. Hierzu wurde zunächst die Enzymaktivität (Einheit = $\mu$ U/mg) bestimmt. Dabei zeigt sich eine deutlich erhöhte Enzymaktivität in allen untersuchten Karzinomen im Vergleich zu nicht veränderter Mukosa (Abb.28 ). Anschließend wurde die mRNA-Menge der einzelnen Splicingvarianten mit der Enzymaktivität für die ST6Gal-I verglichen.

Im Mittel betrug die Enzymaktivität der ST6Gal-I im Karzinom  $17,48 \pm 5,31 \mu\text{U/mg}$ . In der angrenzenden Mukosa konnte eine mittlere Enzymaktivität von  $7,07 \pm 1,94 \mu\text{U/mg}$  gemessen werden, das sind etwa 40 % der mittleren Aktivität im Karzinom. Die mRNA-Menge für die Coding Region der ST6Gal-I betrug im Karzinom im Mittel  $5,12 \pm 6,57$  und in der angrenzenden Mukosa  $3,81 \pm 4,01$ .



**Abbildung 28: Mittels HPLC gemessene Enzymaktivität der STGal-I in Kolonkarzinomen und angrenzender Mukosa**

Im folgenden werden die mRNA-Mengen der entsprechenden Splicingvarianten mit der Enzymaktivität der ST6Gal-I in den untersuchten Proben verglichen. Mit diesem Verfahren wurde nicht unterschieden, ob die Proteine der einzelnen Isoformen der ST6Gal-I eine unterschiedliche Enzymaktivität aufweisen, da bei der Messung der Proben immer ein Gemisch der verschiedenen Isoformen der ST6Gal-I untersucht wird. Aus der in der RT-PCR überwiegend nachgewiesenen Splicingvariante der entsprechenden Probe lassen sich so nur bedingt Rückschlüsse auf deren Enzymaktivität ziehen.

Zur statistischen Auswertung wurde der Wilcoxon Test verwandt, ein nichtparametrischer Test mit zwei aufeinander bezogenen Variablen; in diesem Falle handelte es sich um die Enzymaktivität und die mRNA-Menge für die jeweilige Splicingvariante. Dabei wurden die Daten für Karzinom und nicht veränderte Mukosa zusammen ausgewertet. Die Ergebnisse der RT-PCR der untersuchten Gewebe mit Angabe der klinischen Parameter wurden bereits im Kapitel 4.1 vorgestellt. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung aufgeführt.

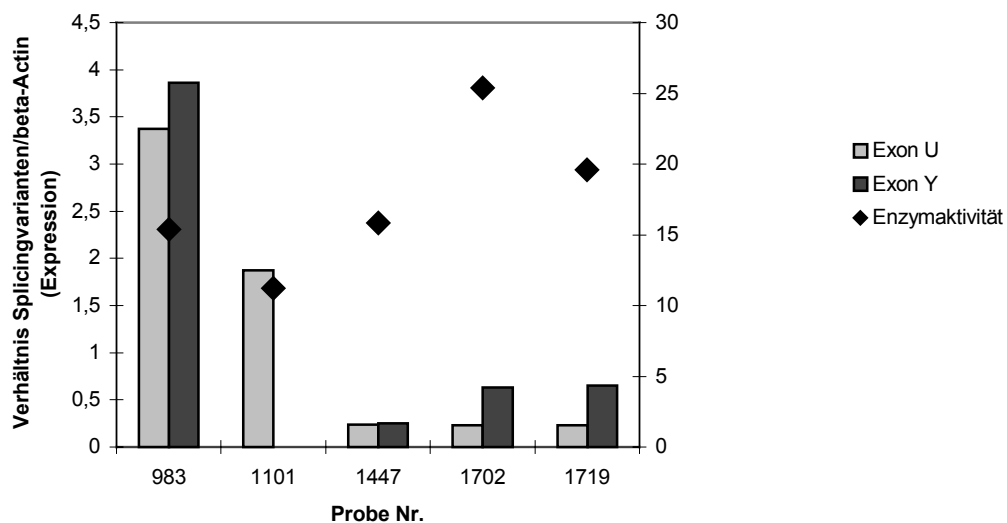


**Tabelle 14: Statistische Auswertung mRNA-Menge/Enzymaktivität**

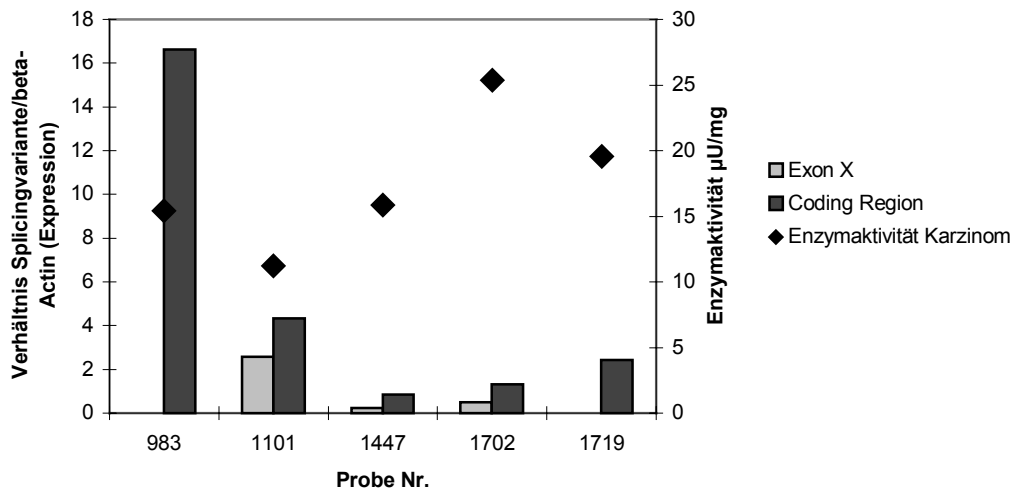
<b>Enzymaktivität/ Ergebnis RT-PCR</b>	<b>Exon U</b>	<b>Exon X</b>	<b>Exon Y</b>	<b>Coding Region</b>
<b>p-Wert</b>	0,005	0,007	0,005	0,028

Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p = 0,005$  für die Splicingvarianten U und Y, einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p = 0,007$  für die Splicingvariante X und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p = 0,028$  für die Coding Region korreliert die RNA-Menge aller Isoformen der ST6Gal-I mit der gemessenen Enzymaktivität. Darüber hinaus ist die Enzymaktivität in der angrenzenden Mukosa deutlich geringer als im Karzinomgewebe, die Abbildung 28 veranschaulicht dies.

Auffällig ist dabei die relativ große Menge der Splicingvariante U, die aber nicht zwangsläufig mit einer hohen Enzymaktivität einhergeht<sup>53</sup>.



**Abbildung 29:** Ausprägung (im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin) der Splicingvarianten U und Y der ST6Gal-I im Karzinomgewebe im Vergleich zu Enzymaktivität



**Abbildung 30:** Ausprägung (im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin) der Splicingvariante X und der Coding Region der ST6Gal-I im Karzinomgewebe im Vergleich zu Enzymaktivität

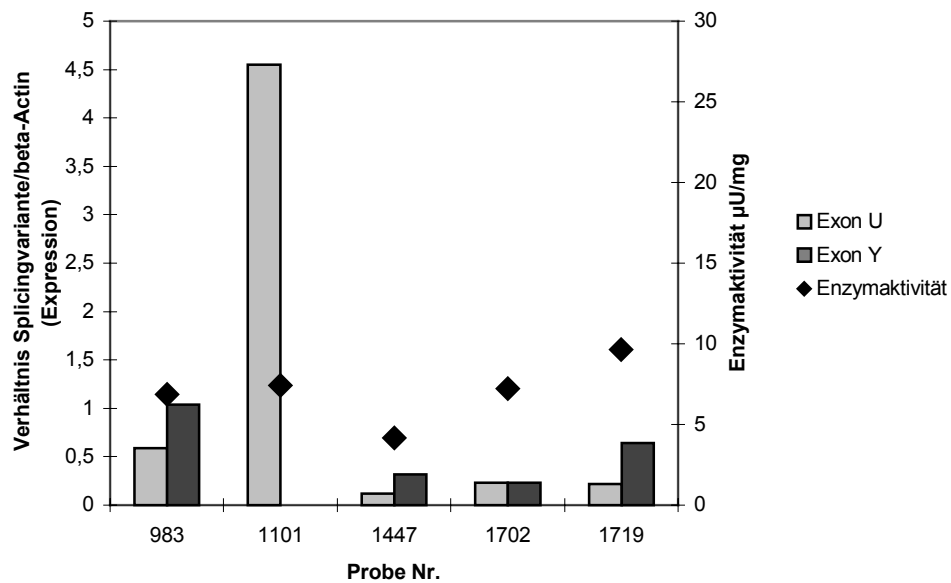


Abbildung 31: Ausprägung (im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin) der Splicingvarianten U und Y der ST6Gal-I in nicht veränderter Mukosa im Vergleich zu Enzymaktivität

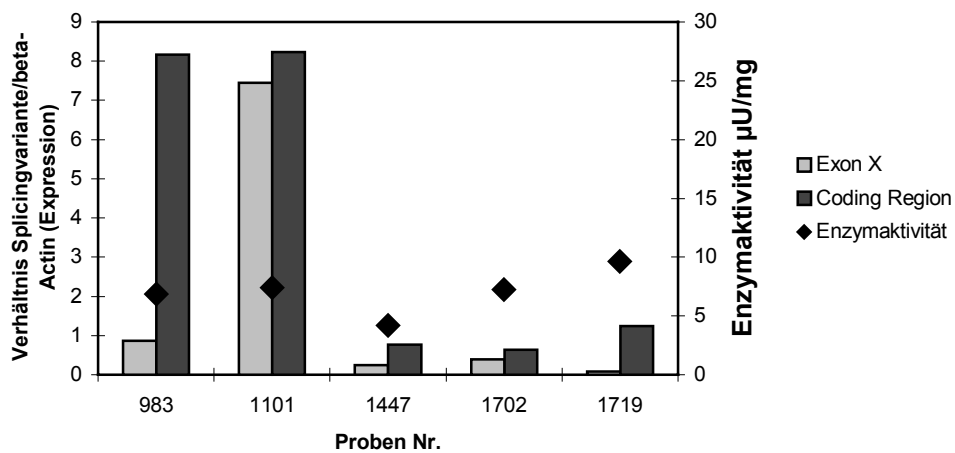


Abbildung 32: Ausprägung (im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin) der Splicingvariante X und der Coding Region der ST6Gal-I in nicht veränderter Mukosa im Vergleich zu Enzymaktivität

## 4.5 Zusammenfassung der statistischen Auswertung

In der Tabelle 15 sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 15: Zusammenfassung der „p-Werte“ der statistischen Auswertung**

	N	Exon U		Exon X		Exon Y		Coding Region	
		Karzinom	Mukosa	Karzinom	Mukosa	Karzinom	Mukosa	Karzinom	Mukosa
Tumor-Stadium									
T= 1	1	p =	p =	p =	p =	p =	p =	p =	p =
T= 2	2	0,340	0,241	0,379	0,149	0,550	0,682	0,458	0,460
T= 3	11								
T= 4	2								
Lymphknotenbefall									
N= 0	9	p =	p =	p =	p =	p =	p =	p =	p =
N= 1	4	0,186	0,133	0,481	0,751	0,743	0,063	0,548	0,146
N= 2	3								
Metastasierung									
M= 0	12	p =	p =	p =	p =	p =	p =	p =	p =
M= 1	4	0,953	0,521	0,446	0,316	0,862	0,953	1,000	0,316
Grading									
G= 1	1	p =	p =	p =	p =	p =	p =	p =	p =
G= 2	14	0,277	0,663	0,192	0,510	0,682	0,284	0,808	0,945
G= 3	1								
Unterschiedliche Expression Tumor/Mukosa	2x16	p = 0,865		p =0,776		p =0,011		p =0,121	

## 5 Diskussion

### 5.1 Die Rolle der ST6Gal-I in kolorektalen Karzinomen

Tumorzellen und gesunde Zellen unterscheiden sich u.a. durch ihre veränderte Glykoprotein- und Glykolipidstrukturen, wobei terminale Zucker auf der Zelloberfläche das Metastasierungsverhalten beeinflussen. Der Anteil terminaler Sialinsäure stellt hierbei einen entscheidenden Faktor dar<sup>26</sup>. Dabei erfolgt der Transfer der Sialinsäuren durch Sialyltransferasen, eine Gruppe von Enzymen, die sich darin unterscheiden, welche Kohlenhydratkette als Akzeptor fungiert und welche Art Verbindung sie mit dem sub-terminalen Zuckerrest eingehen. Eine Sialyltransferase, die  $\alpha$ 2,6-Sialyltransferase (ST6Gal-I), ist hierbei mit einer ganzen Reihe von Karzinomerkrankungen assoziiert<sup>55</sup>.

Eine wichtige Rolle spielt die ST6Gal-I bei der Adhäsion von Kolontumorzellen untereinander, so konnte eine Korrelation zwischen der Expression von ST6Gal-I und nicht-adherentem Wachstum in der Zellkultur festgestellt werden<sup>35</sup>. Die durch erhöhte Enzymaktivität bedingte Hypersialylierung führt zu einer verminderten Adhäsion der Tumorzellen untereinander<sup>36</sup>. Kemmer et al. konnten nachweisen, daß die ST6Gal-I in normaler Kolonmukosa nur schwach exprimiert wird, dafür aber besonders hoch in metastasierenden kolorektalen Karzinomen. Darüber hinaus zeigte sich eine zunehmende Hypersialylierung der Membranglykoproteine während der Karzinogenese<sup>41</sup>.

Auch die Aktivität der ST6Gal-I ist im Serum und im Tumorgewebe bei Patienten mit metastasierendem kolorektalem Karzinom erhöht<sup>26</sup>. Glykosyltransferasen mit veränderter mRNA-Expression in Karzinomgewebe sind prognostische Faktoren und potentielle Ziele für neue Therapieansätze<sup>56, 57</sup>. In der Vergangenheit ist es experimentell gelungen, das metastatische Potential von Kolontumorzellen nach Behandlung mit einem Inhibitor für Sialyltransferase zu senken<sup>58</sup>. Hohe SNA-Reaktivität aufgrund von Hypersialylierung bei Kolonkarzinomzellen konnte mit einem invasiveren Phänotypen in Zusammenhang gebracht werden, sowohl in

experimentellen<sup>26</sup> als auch in klinischen Studien<sup>35</sup>. Vierbuchen et al. konnten zeigen, daß ein hoher Level von SNA-Reaktivität als Maß für die Expression der ST6Gal-I ein unabhängiger Parameter für eine schlechte Prognose bei kolorektalem Karzinom ist<sup>40</sup>.

Von der ST6Gal-I existieren gewebespezifische Isoformen, die sich in der 5'-untranslatierten Region unterscheiden. Diese sogenannten Splicingvarianten treten besonders in reifen B-Lymphozyten auf. Reife B-Lymphozyten sind, genau wie metastasierende Tumorzellen, zur Intravasation und Dissemination befähigt. Das Auftreten dieser lymphozytenspezifischen Splicingvarianten in kolorektalen Karzinomen warf die Frage auf, ob hier gewisse Regelmäßigkeiten existieren und ob diese im Zusammenhang mit der Schwere der Erkrankung stehen.

Ziel der Arbeit war es, diese lymphozytenspezifischen Isoformen in kolorektalen Karzinomen zu dokumentieren und Korrelationen zwischen dem Auftreten der verschiedenen Isoformen und dem Metastasierungsverhalten aufzudecken. Es stellte sich die Frage, ob dieser Nachweis sich als Tumormarker eignet, der Aussagen über die Schwere, oder gar die Prognose der Erkrankung zulässt.

### 5.1.1 Methodik

Das untersuchte Material stammt von chirurgisch entfernten Tumoren und angrenzender Mukosa. Die Tumoren wurden klassifiziert und charakterisiert nach dem WHO/UICC System: T, N, M, Dukes Stadien sowie *grading* und *typing*. Nach sorgfältiger Trennung von Tumor und unveränderter Mukosa wurde das Gewebe bis zur RNA-Extraktion schockgefroren.

Trotz dieser sorgfältigen Behandlung lässt sich mit dieser Methode nicht ausschließen, daß sich versprengte Karzinomzellen noch in der angrenzenden Mukosa befinden. *In situ-Hybridation* von Magenkarzinomen zeigte eine, wenn auch schwächere Expression der ST6Gal-I in nicht veränderte Mukosa von entfernteren Regionen wie Corpus und Antrum<sup>59</sup>. Fraglich ist zudem, in wieweit die benachbarte, nicht veränderte Mukosa mit verstärkter Glykolisierung im Sinne einer inflammatorischen Reaktion auf die Karzinomerkrankung reagiert. Der Anstieg von gelöster Sialyltransferase im Serum während der akuten- Phase-Reaktion wurde beschrieben<sup>30</sup>.

### 5.1.2 Die Splicingvarianten der ST6Gal-I

Die Splicingvariante U der ST6Gal-I wurde zuerst in der in einer reifen humanen Lymphoblastoid-Zelllinie (Louckes) beschrieben, in der sie einen erheblichen Anteil des totalen mRNA-Pools bildet<sup>48</sup>. Diese Isoform konnte in der Mukosa und im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden. Bei dem Vergleich der Expression der Isoform U der ST6Gal-I von angrenzender, nicht veränderter Mukosa mit Kolonkarzinomgewebe zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression dieser Isoform zwischen Kolonkarzinomgewebe und nicht veränderter Mukosa.

Eine Splicingvariante der ST6Gal-I, die Isoform X, wurde primär nur in reifen B-Lymphozyten gefunden<sup>60, 61</sup>. Sie steht im Zusammenhang mit der Sialylierung der Liganden CD22 $\beta$  und CD45, welche eine entscheidende Rolle bei der Interaktion von B-Lymphozyten untereinander spielen<sup>33</sup>.

Die für reife Lymphozyten typische Isoform X konnte sowohl im gesunden als auch im entarteten Gewebe nachgewiesen werden. Auch hier besteht kein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen Mukosa und Kolonkarzinomgewebe.

Die Isoform Y wurde zuerst in der Plazenta gefunden und später in vielen anderen Geweben, so daß Dall'Olio sie als *housekeeping-expression*-Form der ST6Gal-I bezeichnet<sup>47</sup>. Sie konnte sowohl in der Mukosa als auch im karzinomatösen Gewebe nachgewiesen werden.

Im Hinblick auf die Expression der verschiedenen Splicingvarianten der ST6Gal-I unterscheidet sich das kolorektale Karzinomgewebe signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p=0,011$  von der angrenzenden Mukosa in der vermehrten Expression der Y-Isoform.

Geht man davon aus, daß die Expression der ST6Gal-I im allgemeinen im Karzinomgewebe erhöht ist und diese Splicingvariante die *housekeeping-expression* der ST6Gal-I repräsentiert, könnte dieses erklären, weshalb diese Isoform vermehrt im Karzinomgewebe nachzuweisen ist. Eine andere Erklärung für die gesteigerte Expression dieser Splicingvariante könnte in der geringen Translationseffektivität

liegen. Die Zellreihen mit der proportional höchsten Expression (SW480, SW1417, und LoVo) sind auch die Zellreihen mit der niedrigsten Enzymaktivität/mRNA-Ratio<sup>62</sup>. Dies geht einher mit einem früheren Bericht über unterschiedliche Translationseffektivität der Splicingvarianten der ST6Gal-I *in vitro*<sup>53</sup>. Der hohe GC-Anteil von 74,5% erlaubt die Bildung von ausgedehnten Sekundärstrukturen, die mit einer geschwächten Translation der *message* assoziiert sind<sup>62</sup>. Um die geschwächte Translation zu kompensieren, müsste vermehrt mRNA synthetisiert werden.

Wie ist die Heterogenität in der Expression der Splicingvarianten der ST6Gal-I in Kolonkarzinomen zu erklären? Zum einen besteht ein Tumor aus mehreren Subpopulationen von Zellen. Bei der mRNA-Extraktion gewinnt man also mRNA aus verschiedenen Zellklonen, die ihrerseits ganz unterschiedlich sialyliert sein können. Man weist somit die mRNA des vorherrschenden Zellklons nach. Selbst Subpopulationen von üblicherweise adherent wachsenden Zellreihen, die sich durch nicht adherentes Wachstum auszeichnen, zeigen eine gesteigerte Expression der ST6Gal-I und Malignität<sup>35</sup>. Während der Karzinogenese besteht darüber hinaus ein Wechsel zu verstärkter Sialylierung von Membranglykoproteinen<sup>41</sup>, so daß der Nachweis der mRNA für die ST6Gal-I nur einen Ausschnitt aus einem dynamischen Prozess darstellt. Andere Autoren fanden ein Mosaik von Antigenen mit  $\alpha$ 2,6-Sialylation auf einem Tumor, als Ausdruck unterschiedlicher Expression der ST6Gal-I im Zellverband eines Tumors<sup>39</sup>.

### 5.1.3 Regulation

Die Biosynthese der Oligosaccharide und der Glykokonjugate ist ein sehr komplexer Prozeß, dessen Regulation nur zum Teil aufgeklärt ist. Auf der Ebene der Transkription ist der Gebrauch verschiedener Promoter zur Synthese von mRNAs, die sich in der 5`untranslatierten Region unterscheiden, offensichtlich<sup>63, 64</sup>, wenn auch ihre Bedeutung nicht aufgeklärt ist.



Die transkriptionale Regulation spielt sicherlich eine wichtige Rolle; trotzdem sprechen viele, zum Teil sehr unterschiedliche Ergebnisse verschiedenster Arbeitsgruppen für einen Prozeß, an dem sehr viele Faktoren beteiligt sind.

Die Regulation der Expression ST6Gal-I ist bei Ratten einer transkriptionalen Regulation durch Glukokortikoide unterworfen<sup>44</sup>. Andere Faktoren, die die Expression der ST6Gal-I beeinflussen könnten und damit die Expression ihrer Splicingvarianten, sind Vorbehandlung der Patienten mit Zytostatika und Glukokortikoiden. Bei Menschen reagieren Mammakarzinomzellen mit einer verminderten Aktivität der ST6Gal-I auf Estradiol<sup>51</sup>. In Fibroblasten von Ratten wird die Expression der ST6Gal-I direkt von dem *ras*-Onkogen reguliert, resultierend in einer vermehrten Expression der ST6Gal-I bei Aktivierung des *ras*-Onkogens<sup>65, 66</sup>.

Auf der Ebene der Translation wurde bereits die unterschiedliche Translationseffektivität der Splicingvarianten beschrieben, inwieweit es sich hierbei um ein Epiphänomen handelt oder diese als Regulationsmoment dient ist unklar.

Darüber hinaus ist bekannt, daß Serum-Sialyltransferasen bei inflammatorischen Erkrankungen ansteigen, so daß auch eine entzündliche Komponente eines Karzinoms die Expression der ST6Gal-I beeinflussen könnte<sup>30</sup>.

Wesentliche Erkenntnisse stammen von Dall'Olio, der 2000 zeigen konnte, daß die SNA-Reaktivität (*Sambucus nigra* agglutinin, ein Maß für die  $\alpha$ 2,6 Sialylierung) nicht immer mit dem Level der Enzymexpression korreliert. Daraus zieht er folgende Schlüsse:

- a) Kolonkarzinomzellen benutzen während der neoplastischen Transformation verschiedene Promoter für die Expression der ST6Gal-I
- b) das Ausmaß der  $\alpha$ 2,6 Sialylierung von Membranglykoproteinen ist nicht eine direkte Funktion der ST6Gal-I-Aktivität, in der Annahme, daß noch andere komplexe Regulationsmechanismen existieren.

Um diese komplexen Regulationsmechanismen aufzudecken, verwandte Dall'Olio in einer nachfolgenden Studie zwei unterschiedliche Kolonkarzinom-Zelllinien, die mit einer cDNA transfiziert wurden, welche das Gen für die ST6Gal-I und einen dafür bestimmten Promoter enthielten. Überraschenderweise unterschieden sich die Zelllinien

in ihrer Expression der ST6Gal-I erheblich voneinander, trotz des gleichen Promoters. Auch das Maß der von Sialinsäure besetzten N-Enden der Oligosaccharidstruktur (Gal $\beta$ 1,4GlcNAc) blieb bei bestimmten Zelllinien mit nachgewiesener hoher Enzymaktivität niedrig. Die Erklärung für diese Beobachtung vermutet Dall'Olio in dem Grad der Verzweigung der N-Enden der Oligosaccharidstrukturen und einer damit verbundenen besseren Zugänglichkeit für ST6Gal-I. Eine andere entscheidende Rolle für die Regulation der ST6Gal-I erwartet der Autor von der Sekretion von löslichem Enzym in den Extrazellulärraum, welche einen Einfluß auf den „*steady state level*“ des zellgebundenen Enzyms ausübt<sup>43</sup>.

#### 5.1.4 T-Stadium

Vor dem Hintergrund dieser Studien stellte sich bei der vorliegenden Arbeit die Frage, ob nicht das T-Stadium mit einer veränderten Expression einer der Splicingvarianten in Zusammenhang gebracht werden könnte. Da die untersuchte mRNA aus chirurgisch entfernten Tumoren stammt, war bei allen Patienten das T-Stadium bekannt. Es gab einen Patienten mit einem T1 Stadium, zwei Patienten mit einem T2 Stadium, elf Patienten mit einem T3 Stadium sowie zwei Patienten mit einem T4 Stadium. Bei der statistischen Auswertung ergab sich keine Korrelation zwischen veränderter Expression der Splicingvarianten der ST6Gal-I und dem T-Stadium. Da von insgesamt 16 Patienten allein 11 ein T3-Stadium aufzeigten, ist diese Stichprobe nur eingeschränkt aussagefähig. Nach der Studie von Dall'Olio korreliert die Hypersialylierung mit einem invasiveren Phänotypen, nicht aber mit der vermehrten Expression von ST6Gal-I<sup>47</sup>. Es gibt Hinweise, die eine vermehrte Expression der ST6Gal-I in sehr frühen Stadien der Tumorgenese bei Magenkarzinomen nahe legen; übertragen auf das kolorektale Karzinom wäre demnach keine direkt gesteigerte Expression des Enzyms mit zunehmenden T-Stadium zu erwarten<sup>59</sup>.

#### 5.1.5 Lymphknotenmetastasen

Aufgrund des oben genannten Zusammenhangs zwischen Hypersialylierung und invasiverem Wachstum von kolorektalen Karzinomen wurden die Ergebnisse statistisch auf eine Korrelation zwischen regionärem Lymphknotenbefall und vermehrter

Expression der Splicingvarianten der ST6Gal-I überprüft. Insgesamt traten bei neun Patienten keine regionalen Lymphknoten-Metastasen auf (N=0), bei vier Patienten Lymphknoten-Metastasen in einem bis drei regionalen Lymphknoten (N=1) und bei drei Patienten Metastasen in vier oder mehr regionalen Lymphknoten (N=2).

Für keine der Splicingvarianten konnte eine Korrelation zwischen veränderter Expression und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen festgestellt werden.

### **5.1.6 Metastasen**

Ein besonderes Interesse wurde den Zusammenhängen zwischen veränderter Expression der Splicingvarianten der ST6Gal-I und dem Auftreten von Fernmetastasen entgegengebracht, da aus der Studienlage hervorging, daß eine Korrelation zwischen der Expression der ST6Gal-I und nicht-adherentem Wachstum besteht<sup>35</sup> und die ST6Gal-I besonders hoch in metastasierenden kolorektalen Karzinomen exprimiert wird<sup>41</sup>. Darüber hinaus könnte das Auftreten lymphozytenspezifischer Isoformen der ST6Gal-I ein Hinweis auf Metastasierung sein, da Lymphozyten und metastasierende Tumorzellen gewisse Gemeinsamkeiten haben und die Fähigkeit zur Intravasation und Dissemination teilen.

Von den insgesamt 16 Fällen traten bei vier der Patienten Fernmetastasen auf, für keinen der Fälle konnte eine Korrelation zwischen veränderter Expression der ST6Gal-I und dem Auftreten von Fernmetastasen nachgewiesen werden. Wobei die geringe Fallzahl der Patienten kritisch zu diskutieren ist. Es wäre sicherlich interessant, eine größere Gruppe zu untersuchen und damit zu einer sicheren Aussage zu gelangen. Ein anderer Ansatz, diesem Sachverhalt auf den Grund zu gehen, wäre die direkte Untersuchung von Metastasen und deren Primärtumor um die Ergebnisse gegenüber zu stellen.

### **5.1.7 Grading**

Da die histopathologische Gradeinteilung eines Kolonkarzinoms neben der Tumorgroße einen weiteren prognostisch relevanten Parameter darstellt, wurde untersucht, ob es eine Beziehung zwischen dem *grading* und der Expression der Splicingvarianten der ST6Gal-I gibt.

In der Literatur war bei der Untersuchung von Mammakarzinomen eine vermehrte Expression der ST6Gal-I mit einem histopathologischen Grad=3 assoziiert<sup>67</sup>. Versuche mit SNA (*Sambucus nigra agglutinin*), einem für  $\alpha$ 2,6- verknüpfte Sialylsäure spezifisch bindenden Lectin, konnten eine Korrelation zwischen der Bindung des Lectins als Maß für die Expression der ST6Gal-I und dem Grad der histologische Entdifferenzierung nachweisen<sup>39</sup>. Kritisch anzumerken sei, daß die Sialylierung einer Zelloberfläche am Ende einer Kette von vielen Regulationsvorgängen steht und somit nur indirekt als Maß für die Expression der ST6Gal-I gelten kann. Der direkte Nachweis gelang bei einer Kolonkarzinomzelllinie CaCo-2, die bei spontaner Differenzierung zu Enterozyten eine vermehrte Expression der ST6Gal-I aufweist<sup>52</sup>. Zunehmende Differenzierung verbunden mit einer vermehrten Expression des Enzyms würde gegen eine positive Korrelation zwischen *grading* und vermehrter Expression der ST6Gal-I sprechen. In der vorliegenden Arbeit traten von 16 Fällen ein G=1 Tumor, vierzehn G=2 Tumoren und ein G=3 Tumor auf. Es könnte an der Verteilung liegen, daß keinerlei Korrelationen nachzuweisen waren. Weitergehende Untersuchungen müssten an einem größeren Fallkollektiv durchgeführt werden.

## 5.2 Untersuchung von Koloskopiebiopsaten gesunder Personen

Es wurde das Gewebe von 6 Biopsaten aus Koloskopien untersucht, bei denen kein pathologischer Befund erhoben werden konnte. Dabei galt es herauszufinden, in welchem Bereich die Werte bei Menschen ohne erkennbare Erkrankung oder Hinweis für ein Kolonkarzinom liegen. Die Biopsate stammen aus einer Praxis, in der ambulant Koloskopien durchgeführt werden.

Interessanterweise betrug die detektierte mRNA für die ST6Gal-I nur 12% der Menge, die in Kolonkarzinomen gefunden werden konnte, und nur 16% der Menge, die in der angrenzenden Mukosa bei Kolonkarzinomen nachweisbar war. Darüber hinaus konnten nur in einem Fall Splicingvarianten der ST6Gal-I gefunden werden, und zwar die lymphozytenspezifischen Isoformen U und X. Bei diesem Patienten wurde im weiteren Verlauf ein tubulovillöses Adenom diagnostiziert. Diese Beobachtung deckt sich mit der Erkenntnis, daß ein adenomatöser Polyp bis zur Entwicklung eines Karzinoms etwa zehn Jahre benötigt<sup>13</sup> und es in frühen Stadien schon zu veränderter Glykolisation

kommen kann. Sata *et al.* konnten bei unterschiedlich differenzierten Adenomen eine vermehrte  $\alpha$ 2,6-Sialylierung nachweisen. Der Autor dieser Studie zieht daraus den Schluß, daß die maligne Transformation des Kolonepithels von einer *de novo* Expression der ST6Gal-I begleitet wird<sup>39</sup>.

Es sind sicherlich weitere Studien nötig, um diesen Sachverhalt aufzuklären.

Kritisch sei jedoch anzumerken, daß die Gewebeproben möglicherweise insgesamt weniger mRNA enthielten und die Splicingvarianten so dem Nachweis durch die RT-PCR entgingen. Die Proben wurden in einer niedergelassenen Praxis gesammelt und aufbewahrt, davon abgesehen wurde mit ihnen methodisch genauso verfahren wie mit den chirurgisch entfernten Tumoren. Ferner unterscheiden sich Biopsate von einer völlig gesunden Mukosa durch einen makroskopisch sichtbaren Unterschied, der schließlich den Untersucher zur Biopsie veranlaßte.

### 5.3 Untersuchung der Enzymaktivität

Die HPLC wurde eingesetzt, um zu überprüfen, ob die Enzymaktivität mit der nachgewiesenen m-RNA Menge für die ST6Gal-I korreliert. Eine andere Frage war, ob das Auftreten bestimmter Splicingvarianten der ST6Gal-I mit einer erhöhten oder erniedrigten Enzymaktivität assoziiert ist. Es wurden 5 Kolonkarzinome und die zugehörige angrenzende Mukosa untersucht. Die Enzymaktivität der ST6Gal-I wurde für jede Gewebeprobe bestimmt und mit der mRNA-Menge für jede Splicingvariante verglichen und statistisch ausgewertet.

Im Mittel betrug die Enzymaktivität der ST6Gal-I im Karzinom  $17,48 \pm 5,31$   $\mu$ U/mg. In der angrenzenden Mukosa konnte eine mittlere Enzymaktivität von  $7,07 \pm 1,94$   $\mu$ U/mg gemessen werden, das sind etwa 40 % der mittleren Aktivität im Karzinom. Die mRNA-Menge für die Coding Region der ST6Gal-I betrug im Karzinom im Mittel  $5,12 \pm 6,57$  und in der angrenzenden Mukosa  $3,81 \pm 4,01$ . Auffällig ist die große Standardabweichung sowohl für die mittlere Enzymaktivität ( $\pm 5,31$   $\mu$ U/mg) im Karzinom als auch für die mittlere mRNA-Menge ( $\pm 6,57$   $\mu$ U/mg). Die Inhomogenität in der Gruppe der Karzinome bezüglich der Enzymaktivität und der mRNA-Menge geht mit der Beobachtung einher, daß sich während der Karzinogenese Subpopulationen von Tumorzellen etablieren, die sich in Enzymaktivität und Sialylation deutlich

unterscheiden. Dabei nimmt die Enzymaktivität der ST6Gal-I im Laufe der Entdifferenzierung zu<sup>41</sup>. Zusammenhänge zwischen der gemessenen Enzymaktivität der ST6Gal-I im Karzinom und dem TNM-Stadium oder dem histopathologischen Grading konnten in dieser Arbeit nicht aufgedeckt werden, da in dieser kleinen Stichprobe von  $n = 5$  nur ein Tumor ein T-Stadium von  $T = 2$  aufwies, die restlichen vier zeigten ein T-Stadium von  $T = 3$ . Nur in einem Fall trat ein regionärer Lymphknotenbefall von  $N = 1$  auf, bei keinem der Patienten konnten Metastasen nachgewiesen werden. Der histologische Malignitätsgrad betrug bei allen Tumoren  $G = 2$ , so daß auch hier keine Unterschiede herausgearbeitet werden konnten.

Die Splicingvarianten der ST6Gal-I unterscheiden sich in der 5' untranslatierten Region. Um die Rolle dieser 5' untranslatierten Region und damit die Funktion der verschiedenen Isoformen zu untersuchen führten Aasheim et al. *in vitro* Versuche durch. Die zwei untersuchten Isoformen ergaben das gleiche Transkript, ein Protein von 45 kDa, jedoch differierten die beiden mRNA-Formen in der Translationseffizienz. Aasheim et al. nahmen an, daß die 5' untranslatierte Region eine Rolle in der Regulation der Translation spiele. Interessanterweise translatierte ein Konstrukt, dem diese 5' untranslatierte Region fehlte, *in vitro* mit mehr Effektivität als die beiden anderen untersuchten Isoformen<sup>53</sup>. Aufgrund dieser Beobachtungen stellte sich die Frage, ob die Menge der nachgewiesenen mRNA der jeweiligen Splicingvarianten der ST6Gal-I in Zusammenhang mit der Enzymaktivität steht. Tatsächlich korreliert die Menge der exprimierten mRNA für alle Splicingvarianten mit der Enzymaktivität, sowohl im Karzinom als auch in der Mukosa, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p = 0,005$  für die Splicingvarianten U und Y, für die Splicingvariante X mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p = 0,007$  und für die Coding Region  $p = 0,028$ . Allerdings sind diese Zahlen im Hinblick auf eine Aussage zur Translationseffektivität aufgrund der niedrigen Fallzahl nur bedingt miteinander vergleichbar. Zudem lassen sich *in vitro* Versuche nur schwerlich mit Untersuchungen von Zellen vergleichen, die komplexeren Regulationsmechanismen unterworfen sind.

Dall'Olio et al. untersuchten 14 Kolonkarzinome und verglichen die mRNA-Menge für die Splicingvariante Y und eine lebertypische Isoform mit der Sialylation der Gewebe. Diese korrelierte nur in einigen Fällen mit dem Level der Enzymexpression. Aus der

Tatsache, daß andere Studien auch über das Phänomen der inkonsistenten Expression von Oligosaccharid-Antigenen und ihrer verwandten Glykosyltransferasen berichtet<sup>68</sup>, zieht Dall'Olio den Schluss, daß das Ausmaß der  $\alpha$ 2,6-Sialylation von Tumorzellen ein multifaktorieller Prozess ist, an dem z.B. der Gebrauch von unterschiedlichen Promotern oder die Konkurrenz verschiedener Glykolisationswege beteiligt ist<sup>47</sup>.

Somit dürfte der Nachweis der Splicingvarianten der ST6Gal-I in Kolonkarzinomgewebe als Tumormarker diagnostisch wenig wertvoll sein, da keine verlässlichen Aussagen bei ihrem Nachweis über das Vorliegen, den Verlauf oder die Prognose der Erkrankung gemacht werden können.

#### **5.4 ST6Gal-I Expression nach Depletion der Lymphozyten aus den Tumorbiopsaten**

Es wurden 4 Tumoren mit dem FACS sortiert, um eine Kontamination mit Lymphozyten auszuschließen, die auch in der Lage sind, die Splicingvarianten der ST6Gal-I zu exprimieren. Ziel war es, nach Depletion der Lymphozyten, die Splicingvarianten in Kolonkarzinomzellen zu dokumentieren. Nachteilig war hierbei, daß mit dem FACS-Gerät nicht die Möglichkeit besteht, die depletierten Lymphozyten aufzufangen und ihre Expression der ST6Gal-I der Expression in den Kolonkarzinomzellen gegenüberzustellen.

In den sortierten Kolonkarzinomzellen konnte die mRNA für alle untersuchten Splicingvarianten der ST6Gal-I nachgewiesen werden und zwar in einer Menge, die der mRNA-Menge in unsortierten Tumoren durchaus entspricht. Die Splicingvariante Y wurde bei allen vier sortierten Tumoren nachgewiesen, im Median 0,73; demgegenüber betrug der Median für die nichtsortierten Tumoren 0,61 und ist damit etwas geringer. Die Splicingvariante Y kann in vielen Geweben nachgewiesen werden und ist nicht lymphozytenspezifisch<sup>62</sup>, daher war auch kein Abfall der mRNA-Menge nach Lymphozytendepletion zu erwarten.

Eine lymphozytenspezifische Isoform der ST6Gal-I ist die Splicingvariante U, sie wurde zuerst in der humanen Lymphoblastoid-Zelllinie Louckes beschrieben<sup>48</sup>. Die

Splicingvariante U konnte in zwei von vier Tumoren nachgewiesen werden mit einem Wert von 0,2 in beiden Fällen. Bei einem Median von 0,24 für die Splicingvariante U bei nicht sortierten Tumoren liegt auch dieser Wert in einem vergleichbaren Bereich, so daß man davon ausgehen kann, daß die Tumorzellen die Splicingvariante U selbst exprimieren.

Die Splicingvariante X ist lymphozytenspezifisch und wurde bis jetzt nur in reifen Lymphozyten beschrieben; typisch ist sie für die Zelllinie Daudi, eine Lymphoblastoid-Zelllinie mit einem reifen Phänotyp<sup>61</sup>. Die Isoform X konnte in zwei von vier Tumoren nachgewiesen werden, einmal mit einem Wert von 0,69 und ein anderes Mal mit einem Wert von 2,02. Der Median für die Expression der Splicingvariante X liegt bei den nicht sortierten Tumoren bei 0,36, so daß man auch bei diesen beiden Fällen davon ausgehen kann, daß der Tumor sie selbst exprimiert hat. Um die Nachweisgrenze der RT-PCR festzustellen, wurden im Vorfeld Versuche gemacht. So wurden Zellen der Kolonkarzinomlinie HT 29 mit Zellen der B-Zelllinie Daudi in unterschiedlichen Verhältnissen vermengt. Die B-Zelllinie Daudi exprimiert die lymphozyten spezifische Isoform X und wurde in abnehmender Menge mit der Kolonkarzinomlinie HT 29, die diese Isoform nicht exprimiert, gemischt. Mittels der daraus errechneten Trendlinie gelangt man zu einem Gehalt von 7 % Lymphozyten für den einen Tumor bei einer mRNA-Menge von 0,69, der andere Tumor enthielt 30% Lymphozyten bei einer mRNA Menge von 2,02. Diese Ergebnisse sprechen für eine tumoreigene Expression der ST6Gal-I.



## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden 16 Kolonkarzinome mit der dazugehörigen angrenzenden Mukosa mittels semiquantitativer RT-PCR mit dem Ziel untersucht, die lymphozytenspezifischen Splicingvarianten U und X sowie die in verschiedenen Geweben vorkommende Splicingvariante Y der ST6Gal-I zu dokumentieren und eventuelle Zusammenhänge zwischen der Expression und klinischen Parametern aufzudecken.

In den Kolonkarzinomen wurde vermehrt mRNA für die Splicingvarianten X und Y sowie für alle Isoformen der ST6Gal-I gemeinsame Coding Region festgestellt. Lediglich für die Splicingvariante U konnte geringfügig in der angrenzenden Mukosa vermehrt mRNA nachgewiesen werden.

Karzinomgewebe und Mukosa zeigten dabei eine ausgesprochene Heterogenität in der Expression der Splicingvarianten. Lediglich die Splicingvariante Y trat signifikant häufiger im Karzinom auf. Korrelationen zwischen TNM-Stadium sowie dem histopathologischen Malignitätsgrad und der Expression der Splicingvarianten der ST6Gal-I konnten nicht verifiziert werden.

Um eine Kontrolle darüber zu haben, in welchem Bereich die mRNA-Mengen für die Isoformen der ST6Gal-I bei Personen ohne erkennbare Erkrankung liegen, wurden Biopsate aus Koloskopien untersucht, die von Patienten ohne Befund stammten. Diese Proben enthielten deutlich weniger mRNA für die Splicingvarianten der ST6Gal-I. Nur in einem Fall konnten die Splicingvarianten U und X nachgewiesen werden. Interessanterweise entwickelte dieser Patient im Verlauf ein tubulovillöses Adenom.

Die Enzymaktivität der ST6Gal-I wurde bestimmt und in Bezug zur mRNA-Menge der Isoformen der ST6Gal-I gesetzt. Die mRNA-Menge aller Splicingvarianten der ST6Gal-I korreliert mit der gemessenen Enzymaktivität. Für keine der Isoformen konnte eine erhöhte/verminderte Enzymaktivität festgestellt werden.

Die Splicingvarianten U und X sind lymphozytenspezifisch. Mittels eines FACS wurden die Tumorzellen aussortiert, um aufzuzeigen, daß die Expression dieser lymphozytenspezifischen Isoformen der ST6Gal-I tumoreigen ist und nicht durch eine Lymphozyten-Kontamination des untersuchten Gewebes entstanden ist. Die Splicingvarianten U, X und Y konnten auch in vergleichbaren mRNA-Leveln in den

sortierten Tumoren verifiziert werden, so daß man davon ausgehen kann, daß die Karzinome die Splicingvarianten selbst exprimieren.

Die große Anzahl der genetisch entschlüsselten Glykosyltransferasen und die Verfügbarkeit neuerer Techniken, mit denen es möglich ist, die Expression vieler Gene gleichzeitig zu messen, wird in Zukunft ein besseres Verständnis der zellulären Transformation fördern.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Bundesamt S. Statistisches Jahrbuch 1998 für die Bundesrepublik Deutschland, Metzler Poeschel 1999. 1999.
2. Potter J D. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. *World Cancer Research Fund AlfCR, London* 1997.
3. Miller B, Kolonel LN, Berstein L, Alexander G. et al. Racial/Ethnic Patterns of Cancer in the USA. *National Cancer Institute* 1996.
4. Saito H. Screening for colorectal cancer: current status in Japan. *Dis Colon Rectum* 2000;43(10 Suppl):S78-84.
5. Ackerman B. Polyps and carcinoma of the large bowel in the South African Bantu. *Cancer* 1970;26(5):991 - 9.
6. Mason. Nutritional chemoprevention of colon cancer. *Semin Gastrointest Dis.* 2002;13 (3):143 - 153.
7. Karlen P, Lofberg R, Broström O, Leijonmarck E, Hellers G, Persson PG. Increased risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol.* 1999;94:1047-52.
8. Pinczowski D, Ekborn A, Baron J, Yuen J, Adami HO. Risk factors for colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a case control study. *Gastroenterology* 1994;107:117-20.

9. Persson PG, Kerlen P, Bernell O, Leijonmarck CE, Brostrom O, Ahlbom A, Hellers G. Chron's disease and cancer: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 1994;107:1675-9.
10. Mellemkjaer L, Johansen C, Gridley G, Linet MS, Kjaer SK, Olsen JH. Chron's disease and cancer risk. *Cancer Causes Control*. 2000;11:145-50.
11. Bernstein CN, Blanchard JF, Kliewer E, Wajda A. Cancer Risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* 2001;91:854-62.
12. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1993;334:82-87.
13. Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L et al. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology* 1997;112: 594-642.
14. Hardcastle JD, Thomas WM, Chamberlain J et al.: Randomised, controlled trial of faecal occult blood testing. Result for first 107,349 subjects. *Lancet* 1989 1989;I:1160-1164.
15. Mandel JS, Bond JH, Church TR, et al. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. Minnesota Colon Cancer Control Study. *N Engl J Med* 1993;328(19):1365-71.
16. Mandel JS, Church FE, Bond JH. Colorectal cancer mortality: Effectiveness of biennial screening for fecal occult blood. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:434-347 1999.
17. Newcomb PA, Norfleet RG, Storer BE, Surawicz TS, Marcus PM. Screening sigmoidoscopy and colorectal cancer. A case control study among veterans. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1572-1575.

18. Winawer SJ, Fletcher RH, Flehinger J, Schottenfeld D, Miller DG. Screening for colorectal cancer with fecal occult blood testing and sigmoidoscopy. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1311-1318.

19. Selby JV, Friedman GD, Quesenberry CP, Weiss NS. A case-control study of screening sigmoidoscopy and mortality from colorectal cancer. *N Engl J Med* 1992.

20. De Both NJ, Verney M, Groen N, et al. Clonal growth of colorectal-carcinoma cell lines transplanted to nude mice. *Int J Cancer* 1997;72:1137-1141.

21. Nicolson GL. Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites. *Biochem Biophys Acta* 1988 1988;948: 175-224.

22. Moustafa A, Nicholson GL. Breast cancer metastasis-associated genes: prognostic significance and therapeutic implications. *Oncol Res* 1997;7:505-525.

23. Salmi M, Jalkanen S. Human vascular adhesion protein 1 (VAP-1) is a unique sialoglycoprotein that mediates carbohydrate-dependent binding of lymphocytes to endothelial cells. *J. Exp. Med.* 1996;183:569-79.

24. Hoessli D, Brom C, Pink JRL. T-lymphocyte differentiation is accompanied by increase in sialic acid content of Thy-1 Antigen. *Nature* 1980;283:576-8.

25. Livingston BD, DeRobertis EM, Paulson JC. Expression of beta-galactoside alpha 2,6 sialyltransferase blocks synthesis of polysialic acid in *Xenopus* embryos. *Glycobiology* 1990;1:39-44.

26. Gessner P, Riedl S, Quentmaier A, Kemmner W. Enhanced activity of CMP-NeuAc:Gal $\beta$ 1-4GlcNAc:alpha2,6 sialyltransferase in metastasizing human colorectal tumor tissue and serum of tumor patients. *Cancer Lett.* 1993;75:143-49.

27. Harvey BE, Teth CA, Wagner HE, Steele GD, Thomas P. Sialyltransferase activity and hepatic tumor growth in a nude mouse model of colorectal cancer metastases. *Cancer Res.* 1992;52:1775-79.
28. Paulson JC WJ, de Souza-e-Silva U. Biosynthesis of a disialylated sequence in N-linked oligosaccharides: identification of an N-acetylglucosaminide (alpha 2----6) sialyltransferase in Golgi apparatus from rat liver. *Eur J Biochem.* 1984;140(3):523-30.
29. Harduin-Lepers A, Recchi MA, Delannoy P. 1994, the year of sialyltransferases. *Glycobiology* 1995;5:741-758.
30. Jamieson JC, McGaffrey G, Harder PG,. Sialyltransferase: a novel acute-phase reactant. *Comp. Biochem. Physiol.* 1993;105:29-33.
31. Lammers G, Jamieson C. The role of a cathepsinD-like activity in the release of Gal-beta1-4GlcNAc alpha2,6-sialyltransferase from rat liver Golgi membranes during acute phase response. *Biochem.J.* 1988;256, 623-631.
32. Erikstein B, Funderund S, Beiske K, Aas-Eng A,. Cell-cycle-dependent regulation of CDw75 on human B-Lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 1992;22,1149-1155.
33. Stamenkovic I, Sgroi D, Aruffo A., Sy, M. S. & Anderson, T. The B-Lymphocyte adhesion molecule CD22interacts with leucocyte common antigen CD45RO on T cells and alpha2,6-sialyltransferase, CD75, on B cells. *Cell* 1991;66:1133 - 1144.
34. Lin S, Kemmner W, Grigull S, Schlag PM. Cell surface alpha 2,6 sialylation affects adhesion of breast carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 2002;276:101-10.
35. Dall'Olio F, Malagolini N, Di Stefano G, Ciambella M, Serafini-Cessi F. Alpha 2,6 sialylation of N-acetyllactosaminic sequences in human colorectal cancer cell lines. Relationship with non-adherent growth. *Int J Cancer* 1991;47(2):291-7.

36. Bosch J, Brossmer R, Schlag P M et al. Preparation and characterization of differently aggregated colorectal carcinoma cell subpopulations from surgical specimen. *Cancer Detect. Prev.* 1998;22:319-329.
37. Morgenthaler J, Kemmner W, Brossmer R. Sialic acid dependent cell adhesion to collagen IV correlates with in vivo tumorigenicity of the human colon carcinoma sublines HCT116, HCT116a, und HCT116b. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990;171:860-866.
38. Pilatte Y, Bignon J, Lambre CR. Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: pathophysiological implications of sialidases in immunity. *Glycobiology* 1993;3:201-217.
39. Sata T, Roth J, Zuber C, Stamm B, Heitz PU. Expression of alpha2,6-linked sialic acid residues in neoplastic but not in normal human colonic mucosa. *Amer. J. Pathol.* 1991;139:1435-1448.
40. Vierbuchen MJ, Fruechtnicht W, Brackrock S, Krause KT, Zienkiewicz TJ. Quantitative lectin-histochemical and immunohistochemical studies on the occurrence of alpha2,3 and alpha2,6 linked sialic acid residues in colorectal carcinomas. Relation to clinicopathologic features. *Cancer* 1995;76, 727-735.
41. Kemmner W, Kruck D, Schlag P. Different sialyltransferase activities in human colorectal carcinoma cells from surgical specimens detected by specific glycoprotein and glycolipid acceptors. *Clin Exp Metastasis* 1994;12(3):245-54.
42. Dall'Olio F, Malagolini N, di Stefano G, Minni F, Marrano D, Serafini-Cessi F. Increased CMP-NeuAc:Gal beta 1,4GlcNAc-R alpha 2,6 sialyltransferase activity in human colorectal cancer tissues. *Int J Cancer* 1989;44(3):434-9.
43. Dall'Olio, Chiricolo M, Mariani E, Facchini A. Biosynthesis of the cancer-related sialyl-alpha2,6-lactosaminyl epitope in colon cancer cell lines expressing beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase under a constitutive promoter. *Eur.J. Biochem.* 2001;268:5876-5884

44. Wang XC, Smith TJ, Lau JT. Transcriptional regulation of the liver beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase by glucocorticoids. *J Biol Chem* 1990;265(29):17849-53.
45. Wang XC, Vertino A, Eddy RL, et al. Chromosome Mapping and Organization of the Human Beta-Galactoside alpha 2,6 Sialyltransferase Gene. *J. biol.Chem.* 1993;268:4355-4361.
46. Grundman U, Nerlich C, Rein T, Zettlmeissl G. Complete cDNA sequence encoding human beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. *Nucleic. Acids Res.* 1990;18:167-173.
47. Dall'Olio F, Chiricolo M, Ceccarelli C, Minni F, Marrano D, Santini D. Beta-galactoside alpha2,6 sialyltransferase in human colon cancer: contribution of multiple transcripts to regulation of enzyme activity and reactivity with Sambucus nigra agglutinin. *Int J Cancer* 2000;88(1):58-65.
48. Lo N-W, Lau JTY. Novel Heterogeneity Exists in the 5'-Untranslated Region of the beta-Galactoside alpha 2,6-Sialyltransferase mRNAs in the human B-Lymphoblastoid Cell Line, Louckes. *Biochem. & Biophys. Res. Communications* 1996;228:380-385.
49. Coughlan CM, Breen KC. The control of sialyltransferase activity in tumor-cell lines derived from different tissues in multifactorial. *FEBS Lett* 1995;369(2-3):260-2.
50. Svenson EC, Conley PB, Paulson JC. Regulated expression of alpha2,6-sialyltransferase by the liver enriched transcription factors HNF-1, DBP, and LAP. *J. biol. Chem.* 1992;267:3466-4372.
51. Peyrat JP, Recchi MA, Hebbar M, Pawlowski V, Hornez L, Dong-Lebouhris X, Hondermark H, Harduin-Lepers a, Delannoy P. Regulation of sialyltransferase



expression by estradiol and 4-OH-tamoxifen in the human breast cancer cell MCF-7. *Mol Cell Biol Res Commun.* 2000;1(48-52).

52. Dall'Olio F, Malagolini N, Serafini-Cessi F. The expression of soluble and cell-bound alpha 2,6 sialyltransferase in human colonic carcinoma CaCo-2 cells correlates with the degree of enterocytic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;184(3):1405-10.

53. Aasheim HC, Aas-Eng DA, Deggerdal A, Blomhoff HK, Funderud S, Smeland EB. Cell-specific expression of human beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase transcripts differing in the 5' untranslated region. *Eur J Biochem* 1993;213(1):467-75.

54. Aas-Eng DA, Aasheim HC, Deggerdal A, Smeland E, Funderud S. Characterization of a promoter region supporting transcription of a novel human beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase transcript in HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta* 1995;1261(1):166-9.

55. Kannagi R. Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *Glycoconjugate J.* 1997; 14: 577-584

56. Seelentag WK, Li W, Schmitz SF, Metzger U, Aebergard P, Heitz PU, Roth J. Prognostic value of beta 1,6-branched oligosaccharides in human colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 1998;58:5559-64.

57. Kemmner W, Hohaus K, Schlag PM. Inhibition of Gal beta1, 4GlcNAc alpha2,6 sialyltransferase expression by antisense-oligodeoxynucleotides. *FEBS Lett* 1997;409(3):347-50.

58. Wagner HE, Thomas P, Wolf BC, Rapoza A, Steele G Jr. Inhibition of sialic acid incorporation prevents hepatic metastases. *Arch Surg.* 1990;125:351-4.

59. Gretschel S, Haensch W, Schlag PM, Kemmner W. Clinical relevance of sialyltransferases ST6Gal-I and ST3Gal-III in gastric cancer. *Oncology* 2003;65:139-45.
60. Lo NW, Lau JT Y. Transcription of the beta- galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene in B lymphocyten is directed by seperate and distinct promoter. *Glycobiology* 1996;6:271-279.
61. Stamenkovic I, Asheim HC, Deggerdal A, Blomhoff HK, Smeland EB, Funderund S. The B-cell Antigen CD 75 is a cell surface sialyltransferase. *J. Exp. Med.* 1990;172:641-643.
62. Dall'Olio C, Lau JT Y, Differential expression of the hepatic transcript of beta-galactoside alpha2,6 Sialyltransferase in human colon cancer cell lines. *Int. J. Cancer* 1999;81:243-247.
63. Svensson EC, Soreghan B, Paulson JC. Organization of the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene. Evidence for the transcriptional regulation of terminal glycosylation. *J Biol Chem* 1990;265(34):20863-8.
64. Wang X, O'Hanlon TP, Young RF, Lau JT. Rat beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase genomic organization: alternate promoters direct the synthesis of liver and kidney transcripts. *Glycobiology* 1990;1:25-31.
65. Le Marer N, Laudet V, Svensson EC, Cazlaris H, Van Hille B, Lagrou C, Stehelin D, Montreuil J, Verbert A, Delannoy P. The c-Ha-ras oncogene induces increased expression of beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase in rat fibroblast (FR3T3) cells. *Glycobiology* 1992;2:49-56.
66. Vandamme V, Cazlaris H, Le Marer N, Laudet V, Lagrou C, Verbert A, Delannoy P. Comparison of sialyl and alpha-1,3-galactosyltransferase activity in NIH3T3 cells transformed with ras oncogene: increased betagalactoside-alpha-2,6-sialyltransferase. *Biochimie.* 1992;74:89-99.

---

67. Recchi MA, Hebbar M, Hornez L, Harduin-Lepers A, Peyrat JP, Delannoy P. Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assesment of sialyltrasnferase expression in human breast cancer. *Cancer Res.* 1998;58(18):4066-70.

68. Brockhausen I. Clinical aspects of glycoprotein biosynthesis. *Crit. Rev. clin. Lab. Sci.* 1993;30:151-165.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

A : Adenin

bp : **Basenpaare**

C : Cytosin

cDNA : *copy desoxiribonucleid acid*

CMP-NeuAc : Cytidin-5-Monophospho-N-acetylneuraminsäure

DNA : *desoxyribonucleid acid*

FACS : *fluorescent activated cell sorting*

FITC : **F**luorescein–**I**sothiocyant

FOBT : **f**äkale **o**kkulte **B**luttestung

G : Guanin

GITC: **G**uanidin**i**sothiocyant

HPLC : *high performance liquid chromatography*

LK : **L**ymph**k**noten

mRNA : *messenger ribonucleid acid*

Neu5Ac : N-Acetylneuraminsäure

Neu5Gc : N-Glykolyneuraminsäure

PCR : *polymerase chain reaction*

PDGF-R : *platelet derived growth factor- receptor*

RACE : *rapid amplification of cDNA ends*

RNA : *ribonucleid acid*

RT – PCR : *reverse transcriptase – polymerase chain reaction*

SNA : **S**ambucus **n**igra **a**gglutinin

ST6Gal-I : Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\alpha$ 2,6-Sialyltransferase,  $\beta$ -Galaktosid  $\alpha$ 2,6-Sialyltransferase

T : Thymin

UICC : *union internationales contra cancerum*

VEGF-R : vascular endothelial growth factor receptor

## **Erklärung**

„Ich, Nikolai Klein, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die molekulargenetische Analyse der Splicingvarianten ST6Gal-I in humanen kolorektalen Karzinomen und gesunder kolorektaler Mukosa“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

04.08.2008  
Datum

Nikolai Klein  
Unterschrift