Funktionelle Bedeutung der UDP-*N*-Acetylglukosamin 2-Epimerase/ *N*-Acetylmannosamin-Kinase (*GNE*) für die Anoikis von Tumorzellen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich
Biologie/Chemie/Pharmazie der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dipl. Biol. Pia Kessel

(geb. Forberich)

aus Nürnberg

März 2010

Vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von **Januar 2006 bis März 2010**
am Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin (MDC)
Berlin-Buch, Robert-Rössle-Str. 10
unter der Leitung von Herrn PD Dr. Wolfgang Kemmner durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

2. Gutachter: PD Dr. Wolfgang Kemmner

Disputation am 17.05.2010

Gewidmet - meinen Eltern,
Susi & Clemens

Der unermeßlich reichen, stets sich erneuernden Natur gegenüber wird der Mensch, so weit er auch in der wissenschaftlichen Erkenntnis fortgeschritten sein mag, immer das sich wundernde Kind bleiben und muss sich stets auf neue Überraschungen gefasst machen.

- MAX PLANCK -

Inhaltsverzeichnis

***Abkürzungsverzeichnis*……....8**

***1. Einleitung*……....10**

1.1 Das Enzym UDP-*N*-Acetylglukosamin 2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamin-Kinase (*GNE*) ……....10

1.1.1 Expression und subzelluläre Lokalisierung der *GNE*……11

1.1.2 Regulierung der *GNE*……..……..13

1.1.3 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der *GNE*……..……....13

1.2 Sialinsäurebiosynthese……....14

1.3 Struktur und Vorkommen von Sialinsäure……...16

1.4 Biologische Bedeutung der Sialylierung……..17

1.4.1 Determinierung struktureller und funktioneller Eigenschaften von Glyko-konjugaten..... 18

1.4.2 Zell-Zell-Interaktion und Adhäsion..... 19

1.4.3 Rolle der Sialinsäure im Tumorstoffwechsel und Krebs..... 21

1.5 Anoikis und Tumorprogression……..… 23

1.5.1 Anoikis-spezifische Signaltransduktion.....24

1.5.2 Die Pankreaskarzinom-Zelllinie *Capan-1* als *in vitro* Modell für Anoikis.....25

1.6 Zielsetzung der Arbeit……27

***2. Material und Methoden*……28**

2.1 Material……..…28

2.1.1 Zellkultur..... 28

2.1.1.1 Die eukaryotische Zelllinie *Capan-1*..... 28

2.1.1.2 Zellkulturmedien und –zusätze..... 28

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Substanzen..... 29

2.1.3 Enzyme.....29

2.1.4 Fertig-Kits und zugehörige Substanzen.....29

2.1.5 siRNA-Oligonukleotide.....30

2.1.6 Puffer und Lösungen.....31

2.1.7 *TaqMan*-PCR Primersonden.....32

2.1.8 Verbrauchsmaterialien.....32

2.1.9 Geräte und Zubehör.....33
2.1.10 Software und online-verfügbare Datenbanken..... 33

2.2 Methoden……..34
2.2.1 Zellkultur..... 34
2.2.1.1 Kultivierung und Ernte adhärenter *Capan-1* Zellen.....34
2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl..... 35
2.2.1.3 Kryokonservierung und Rekultivierung eukaryotischer Zellen.....35

2.2.2 Transfektion von humanen Zelllinien: RNA-Interferenz *(RNAi)*..... 35
2.2.2.1 Selektion von siRNA *(small interfering RNA)*-Sequenzen..... 37
2.2.2.2 Transienter *Knock-Down* mit synthetischen siRNA-Oligonukleotiden..... 38

2.2.3 Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen.....38
2.2.4 Quantitative Nukleinsäureanalyse..... 39
2.2.5 Evaluierung der RNA-Qualität.....39
2.2.6 Reverse Transkription (RT) 41

2.2.7 Quantitative *TaqMan Real-Time* PCR (qRT-PCR)..... 41
2.2.7.1 Durchführung der qRT-PCR..... 43
2.2.7.2 Auswertung der qRT-PCR ($\Delta\Delta C_T$-Methode).....44

2.2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration.....44

2.2.9 *In vitro* Assays zur Untersuchung der Genfunktion.....45
2.2.9.1 Untersuchung der DNA-Methylierung.....45
2.2.9.2 PolyHEMA Assay (Anoikis-Test)..... 45
2.2.9.3 FACS-Analyse Apoptose-assoziierter DNA-Fragmentierung:
Bestimmung des Zellzyklusprofils (Zellzyklusanalyse)..... 46

2.2.10 Glykananalytische Methoden: Charakterisierung von Sialinsäuren.....47
2.2.10.1 Desialylierung durch Neuraminidase-Verdau..... 47
2.2.10.2 Fluorimetrische Sialinsäurebestimmung mittels Hochleistungs-
Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....47
2.2.10.3 Spezifische Detektion von Sialinsäure über FACS-Analyse
(Lektin-FACS).....48

2.2.11 Microarray-basierte Genexpressionsuntersuchung..... 50
2.2.11.1 Analyse auf Affymetrix *GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0*…….... 50
2.2.11.2 Analyse auf Affymetrix *GeneChip® Human Gene 1.0 ST*..... 51
2.2.11.3 Präprozessierung der Affymetrix-Microarrays.....51

***3. Ergebnisse*……53**

3.1 Globale Expressionsanalyse Sialylierungs-relevanter Gene in P16- und Mock-Transfektanden der Pankreaskarzinom-Zelllinie *Capan-1*.....53

3.1.1 Qualitätskontrolle der Microarray-Daten.....54

3.1.2 Statistische Analyse zur Identifizierung differenziell regulierter Gene.....55

3.1.3 Selektion Anoikis-assoziierter Marker.....57

3.2 Signifikant differenzielle Expression des Enzyms UDP-*N*-Acetylglukosamin 2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamin-Kinase (*GNE*) in *Capan-1* Mutanten.....59

3.3 Bedeutung der *GNE* in Tumorzelllinien und im Karzinom.....60

3.4 Ausprägung der *GNE*-Expression in *Capan-1* Zellen auf Proteinebene.....63

3.4.1 Chromatographische Quantifizierung der Membransialylierung.....63

3.4.2 Fluorimetrische Detektion membranständiger Sialinsäurestrukturen.....64

3.5 Transkriptionelle Regulierung der *GNE* in Anoikis-sensiblen, P16-substituierten *Capan-1* Zellen……66

3.6 *In vitro* Untersuchung des funktionellen Einflusses der *GNE* auf Anoikis.....67

3.6.1 Etablierung der *GNE*-spezifischen siRNA-Transfektionsstrategie im *Capan-1* Wildtyp.....68

3.6.2 Evaluierung des siRNA-vermittelten *Knock-Down* Effekts.....69

3.6.3 Wirkung der *GNE*-Repression auf die Ausbildung des Anoikis-Phänotyps.....70

3.7 Microarray-basierte Charakterisierung der *GNE*…… 71

3.7.1 Qualitätskontrolle der Microarray-Daten.....72

3.7.2 Statistische Analyse zur Identifizierung differenziell regulierter Gene.....73

3.7.3 Extraktion von Markergenen mit putativ *GNE*-abhängiger Transkriptions-regulierung.....74

3.7.4 Validierung des Profils *GNE*-assoziierter Gene über *Real-Time* PCR.....76

3.7.5 Einfluss der *GNE* auf die Expression ER-Stress relevanter Schlüsselelemente.....78

3.7.6 *In vivo* Expression der identifizierten Marker im humanen Pankreasgewebe: Evaluierung über die online-Datenbank *ONCOMINE*.....79

***4. Diskussion*……82**

4.1 Expressionsanalyse wichtiger Elemente des Sialinsäuremetabolismus in *Capan-1* Pankreaskarzinom-Zellen.....82

4.2 Rolle der *GNE* in Tumorzelllinien und im Krebs.....86

4.3 Qualitative und quantitative Untersuchung der Effekte reduzierter *GNE*-Expression auf Sialinsäureebene..... 87
4.4 Transkriptionelle Regulierung der *GNE* in *Capan-1* Zellen und Mutanten.....88
4.5 Funktionelle Relevanz der *GNE* für Anoikis.....89
4.6 Microarray-basierte Charakterisierung der *GNE*.....92
4.7 Evaluierung des Expressionsprofils *GNE*-assoziierter Gene im humanen Pankreas-Adenokarzinom.....100

***5. Zusammenfassung*……..…….101**

***6. Summary*……..…102**

***7. Literaturverzeichnis*……..……103**

***8. Anhang*……..125**

8.1 Veröffentlichungen……...125
8.1.1 Publikationen.....125
8.1.2 Posterbeiträge.....125

8.2 Danksagung……..…126

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AoD	*Assay on Demand* (*TaqMan*-PCR Primersonde)
ATP	Adenosintriphosphat
5-Aza-dC	5-Aza-2´-Deoxycytidin
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplememtäre DNA (*complementary DNA*)
CMP	Cytidinmonophosphat
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
cRNA	komplementäre RNA (*complementary RNA*)
CT	Schwellenwert Zyklus (*Threshold Cycle*)
Da	Dalton
DMB	1,2-Diamino-4,5-Methylendioxybenzol
Dnase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	Doppelstrang (*double strand*)
dT	Desoxythymidin
ECM	extrazelluläre Matrix
FACS	Durchflusszytometer (*Fluorescence-Activated Cell Sorter*)
FBS	fetales Rinderserum (*Fetal Bovine Serum*)
FC	*Fold Change*
FDR	*False Discovery Rate*
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GO	*Gene Ontology*
HBSS	*Hanks Balanced Salt Solution* = spezielle Salzlösung
HIBM	Erbliche Einschlusskörperchenmyopathie (*Hereditary Inclusion Body Myopathy)*
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*)
KT	Kontrolle
log.	logarithmisch
M	molar
ManNAc	*N*-Acetylmannosamin
mRNA	Boten-RNA (*messenger RNA*)

Neu5Ac	*N*-Acetylneuraminsäure
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (*Phosphate-Buffered Saline*)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI	Propodiumiodid
pKs	Säurestärke
PNA	*Peanut* Agglutinin (Lektin)
polyHEMA	Poly (2-Hydroxyethyl-Methacrylat)
qRT-PCR	quantitative *Real-Time* PCR
r	Korrelationskoeffizient
RIN	*RNA Integrity Number*
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RPMI	Zellkulturmedium (*Roswell Park Memorial Institute*)
RT	Reverse Transkription
siRNA	*small interfering RNA*
SNA	*Sambucus nigra* Agglutinin (Lektin)
ss	Einzelstrang (*single strand)*
STABW	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
UDP	Uridindiphosphat
UPR	*Unfolded Protein Response*
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Das Enzym UDP-*N*-Acetylglukosamin 2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamin-Kinase *(GNE)*

Die UDP-*N*-Acetylglukosamin 2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamin-Kinase *(GNE)* gilt als Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese. *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) stellt die chemische Grundstruktur und den biosynthetischen Vorläufer nahezu aller natürlich vorkommender Neuramin- bzw. Sialinsäuren dar (Roseman 1970), von denen bisher über 50 unterschiedliche Derivate nachgewiesen wurden (Schauer et al. 2009). Sialinsäuren treten als terminale Kohlenhydrate in Konjugaten eukaryotischer Glykoproteine und Ganglioside (Glykolipide) der Zellmembran auf. Im Allgemeinen ist ihr Vorkommen auf Vertebraten und höhere Wirbellose beschränkt (Roth et al. 1992). In geringerem Ausmaß wird Sialinsäure auch von anderen Spezies, wie Pilzen bis hin zur Hefe, synthetisiert (Kontou et al. 2009). In Pflanzen konnte sie nicht nachgewiesen werden (Takashima et al. 2009). Bestimmte pathogene sowie symbiontische Bakterien nutzen in Anpassung an den Wirt homologe Biosynthesewege (Lewis et al. 2009) bzw. haben *de novo* Sialinsäuresynthese entwickelt (Vimr et al. 2004). Die allgemeine Verbreitung deutet auf die essenzielle physiologische Rolle dieser Stoffklasse hin.

Die eukaryotische Sialinsäuresynthese geht von der irreversiblen Epimerisierung des Substrats UDP-*N*-Acetylglukosamin (UDP-GlcNAc) zu UDP-*N*-Acetylmannosamin (ManNAc) und der nachfolgenden Phosphorylierung zu *N*-Acetylmannosamin-6-phosphat aus. Diese beiden initialen Schritte des mehrstufigen Reaktionsprozesses werden vom bifunktionalen Enzym UDP-*N*-Acetylglukosamin 2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamin-Kinase *(GNE)* katalysiert (Hinderlich et al. 1997; Stäsche et al. 1997).

Vor der Entdeckung der Bifunktionalität wurden beide Enzymaktivitäten zunächst unabhängig voneinander untersucht und beschrieben (Hinderlich et al. 1997). Dabei leistete S. Roseman durch seine Pionierarbeit einen wesentlichen Beitrag zur funktionellen Analyse der *GNE*. So konnte er in Zusammenarbeit mit D. G. Comb im Jahr 1958 im zytosolischen Anteil der Rattenleber UDP-GlcNAc 2-Epimerase nachweisen und nur wenige Jahre später *N*-Acetylmannosamin-Kinase charakterisieren (Gosh et al. 1961). Das gemeinsame Vorkommen im Zytosol identischer Gewebe lieferte den ersten Beleg für eine mögliche Kooperation beider Enzyme (van Rinsum et al. 1983). Den endgültigen Beweis für die enzymatische Bifunktionalität erbrachten Stäsche (1997) und Hinderlich et al. (1997) anhand des aufgereinigten Proteins aus der zytoplasmatischen Fraktion der Rattenleber. Das aus

der Ratte isolierte Enzym besteht aus einem 79kDa-Polypeptid, das in zwei oligomeren Zuständen auftreteten kann. Dabei weist nur die homohexamere Form beide Enzymaktivitäten auf. Für das Dimer konnte die ManNAc-Kinase-Funktion nachgewiesen werden (Hinderlich et al. 1997). *In vitro* Untersuchungen belegten darüber hinaus das Vorkommen trimerer (Effertz et al. 1999) und tetramerer Formen der *GNE* (Ghaderi et al. 2007). Vermutlich sind die Differenzen der bisher beschriebenen Molekülzustände auf die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden zurückzuführen (Ghaderi et al. 2007). Allen Studien gemein ist jedoch die Vereinigung der dualen Aktivität im Multimer, während Dimere nur Kinasefunktion erfüllen.

Üblicherweise sind bifunktionale Enzyme durch zwei distinkte Domänen mit getrennter katalytischer Aktivität gekennzeichnet (Stäsche et al. 1997). *In vitro* Sequenzanalysen konnten dieses Merkmal für die *GNE* bestätigen und verwiesen zusätzlich auf eine hohe Übereinstimmung der N-terminalen Region mit prokaryotischen Epimerasen, während der C-Terminus Homologien zu bakteriellen Zuckerkinasen bzw. Repressorproteinen des Xylose-Operons und ROK (Repressor ORF)-Kinasen zeigt (Krause et al. 2005; Tong et al. 2009). Beide Domänen üben ihre Aktivität unabhängig aus (Effertz et al. 1999) und lassen sich getrennt voneinander exprimieren (Blume et al. 2004).
Die Klonierung und Sequenzierung der *GNE* gelang bereits aus der Ratte (Stäsche et al. 1997), der Maus (Horstkorte et al. 1999) und dem Menschen (Lucka et al. 1999; Seppala et al. 1999). In allen untersuchten Organismen umfasste das Protein 722 Aminosäuren (Molekulargewicht 79kDa) und wies einen hohen Grad an Homologie auf. So lag die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zwischen Ratte und Maus bei 99,4%, zwischen Mensch und Maus noch bei 98,6% (Seppala et al. 1999). Die UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc-Kinase des Schimpansen ist mit der humanen identisch. Selbst zwischen dem Menschen und Organismen, die nicht zu den Säugetieren zählen, ist die Homologie äußerst hoch (Reinke et al. 2007).

1.1.1 Expression und subzelluläre Lokalisierung der *GNE*

Die *GNE* ist ein ubiquitäres Protein, das in allen höheren Organismen vorkommt (Reinke et al. 2009). Dabei folgt die Expression einem spezies-, gewebe-, entwicklungs- und altersspezifischem Regulationsmuster (Krause et al. 2005).
Murine UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc-Kinase zeigt die stärkste Expression in der Leber und kann bereits ab Tag 15 der embryonalen Entwicklung in allen Stadien der Ontogenese nachgewiesen werden (Horstkorte et al 1999). In Analogie dazu konnte auch in der Ratte die höchste Enzymaktivität in sekretierenden Organen (Speicheldrüse,

Darmschleimhaut, Leber) detektiert werden (Stäsche et al. 1997). Im humanen Gewebe deutet die neben der in der Leber hohe Expression in der Plazenta auf eine essenzielle Bedeutung des Enzyms für die Entwicklung hin (Lucka et al. 1999).

Die UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc-Kinase gilt als universeller Marker für in Wachstum und Entwicklung befindliche Zellen (Kohla et al. 2002). Dementsprechend konnte ein abnehmendes *GNE*-Vorkommen in humaner Skelettmuskulatur (Krause et al. 2005) wie auch in embryonalen Zellen menschlichen (Krause et al. 2005) und murinen Ursprungs (Horstkorte et al. 1999) mit zunehmender Zelldifferenzierung in Zusammenhang gebracht werden. Während die Expression in unreifen Myoblasten bzw. murinen Embryonalzellen am höchsten ist, nimmt sie in entsprechenden reifen Zellen kontinuierlich ab. Differenzielles *GNE*-Vorkommen in alternden humanen Zellen (Sprenger et al. 2009) geht mit Unterschieden im terminalen Sialinsäuremuster einher (Przybyto et al. 2007), die sich in Veränderungen physiologischer Funktionen, wie verminderter Gedächtnisleistung (Sprenger et al. 2009) oder in Defiziten der Immunantwort, manifestieren (Abdul-Salan et al. 2000). In diesem Zusammenhang wird Sialinsäure als potenzieller Biomarker für Demenz bzw. die Alzheimererkrankung im Menschen angeführt (Davis et al. 2009).

Im Menschen sind bislang vier gewebespezifische mRNA-Spleissvarianten beschrieben worden (Watts et al. 2003), die sich vom ursprünglichen UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen (Lucka et al. 1999) durch ein zusätzliches, 90bp umfassendes Exon A1 20.000bp aufwärts von Exon 1 unterscheiden (Watts et al. 2003). Zwei der alternativen Sequenzen kodieren für das bekannte *GNE*-Protein (*GNE1*), die beiden anderen bringen zwei neue Isoformen hervor (*GNE2* und *GNE3*), die sich anhand ihrer N-terminalen Sequenz, ihres Molekulargewichts und ihres spezies- bzw. gewebespezifischen Expressionsmusters unterscheiden (Reinke et al. 2007).

Gemäß der Schlüsselrolle bei der Sialinsäuresynthese, deren zentrale Reaktionen im Zytoplasma ablaufen, ist das Vorkommen der *GNE* primär auf dieses Zellkompartiment beschränkt. Zusätzlich belegten Krause et al. (2005) über immunhistochemische Färbungen eine Kolokalisierung mit Proteinmarkern des Golgi-Apparates und des Nukleus. Das Vorkommen des Enzyms im Golgi-Kompartiment ist physiologisch sinnvoll, da die Sialinsäuren an dieser Stelle in Form aktivierter Nukleotid-Donormoleküle auf Glykokonjugate übertragen und über spezifische Transporter zur Plasmamembran transferiert werden. Die Lokalisierung im Zellkern hingegen deutet auf mögliche weitere Funktionen der *GNE* hin, beispielsweise eine Involvierung bei der Transkriptionskontrolle.

1.1.2 Regulierung der *GNE*

Trotz zahlreicher intensiver Studien zur strukturellen und biochemischen Charakterisierung der *GNE* ist bislang wenig über deren Regulierung bekannt.
Die zentrale katalytische Rolle bei der Sialinsäurebiosynthese erfüllt die UDP-GlcNAc 2-Epimerase-Untereinheit, die im Gegensatz zur Kinaseaktivität komplex reguliert wird. Zum einen ist die Epimerasefunktion über einen Rückkopplungsmechanismus durch das aktivierte Endprodukt CMP-Neu5Ac hemmbar (Kornfeld et al. 1964; Sommar et al. 1972). Zum anderen konnte *in vitro* die Aktivierung der UDP-GlcNAc 2-Epimerase über Phosphorylierung durch die Proteinkinase C nachgewiesen werden (Horstkorte et al. 2000).
Daneben determiniert das dynamische strukturelle Wechselspiel zwischen unterschiedlichen oligomeren Zuständen die Enzymaktivität der *GNE*. Nur das Homohexamer zeichnet Bifunktionalität aus. Die Aggregatbildung wird durch das Substrat UDP-GlcNAc und das aktivierte Endprodukt der Sialinsäurebiosynthese CMP-Neu5Ac begünstigt, die die *GNE* durch Bindung an die Epimerase-Domäne im oligomeren Zustand stabilisieren (Ghaderi et al. 2007).
Unterschiedliche Arbeiten deuten allerdings auch auf einen potenziellen Einfluss epigenetischer Faktoren auf die transkriptionelle Regulierung hin. In Hepatomzellen (Oetke et al. 2003) sowie in HIV-infizierten Lymphozyten (Giordanengo et al. 2004) führt die Methylierung von CpG-Inseln im Promotorbereich zu verminderter mRNA-Expression der *GNE*. Möglicherweise leistet alternatives Spleissen, das drei unterschiedliche, gewebespezifische *GNE*-Isoformen hervorbringt, einen weiteren regulatorischen Beitrag.

1.1.3 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der *GNE*

Die essenzielle physiologische Bedeutung der *GNE* konnte durch murine *Knock-Out* Experimente belegt werden. Die daraus resultierende enzymatische Inaktivierung wirkt sich in Mäuseembryonen am Tag 8,5 letal aus (Schwarzkopf et al. 2002). Heterozygote, *GNE*-defiziente Mäuse sind dagegen überlebensfähig, obwohl die Gesamtsialylierung um 25% vermindert ist (Gagiannis et al. 2007).
Bislang sind zwei Erbkrankheiten bekannt, die auf Mutationen im *GNE*-Gen beruhen: die erbliche Einschlusskörperchen-Myopathie (*Hereditary Inclusion Body Myopathy,* HIBM) und die Sialurie. HIBM ist eine neuromuskuläre Erkrankung, die einem autosomal rezessiven Vererbungsmuster folgt (Eisenberg et al. 2001). Die klinische Manifestierung kennzeichnet eine generelle Muskelschwäche, die erst spät im Erwachsenenalter auftritt und langsam von distal nach proximal fortschreitet (Huizing et al. 2009). Histopathologisch weisen HIBM-

Muskelbiopsien charakteristische zytoplasmatische Hohlräume - sog. „rimmed vacuoles“ - mit filamentösen Einschlüssen auf, die für neurodegenerative Erkrankungen typische Proteine, wie Ubiquitin und β-Amyloide, enthalten (Askanas et al. 1993). Bisher wurden über 60 unterschiedliche, HIBM-assoziierte Missense-Mutationen im kodierenden Bereich der UDP-GlcNAc 2-Epimerase- und der ManNAc-Kinase-Domäne gefunden (Eisenberg et al. 2001; Kurochkina et al. 2009), die zu einer detektierbaren Hypoaktivität des Enzyms in betroffenen Patienten führen (Penner et al. 2006). Allerdings determiniert diese Reduzierung keine offensichtlichen bzw. allgemeinen Sialylierungsdefizite, so dass der zugrundeliegende Mechanismus der Erkrankung unklar bleibt.

Die Sialurie ist eine autosomal-dominante Erbkrankheit mit niedriger Inzidenz, die durch zytoplasmatische Akkumulierung freier Sialinsäure charakterisiert ist (Schwarzkopf et al. 2002). Die Sialinsäureüberproduktion resultiert aus unterschiedlichen Punktmutationen, die die allosterische Bindestelle in der Epimerasedomäne betreffen und einen Defekt der Endprodukthemmung bewirken (Sepalla et al. 1999). Die im Gramm-Massstab (1g/Tag; Leroy et al. 2001) detektierbare freie Sialinsäure im Urin von Patienten führt bei überlebenden Betroffenen zu einer Vergrößerung der Leber (Hepatomegalie), verzögerter Skelettentwicklung und variablen geistigen Entwicklungsstörungen (Klootwijk et al. 2008; Seppala et al. 1999).

1.2 Sialinsäurebiosynthese

In Säugerzellen wird die Synthese von Neu5Ac bzw. seiner aktivierten Form CMP-*N*-Acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac) in vier aufeinanderfolgenden Schritten im Zytosol realisiert (Reutter et al. 1997; Weidemann et al. 2009). Als Ausgangssubstrat dient UDP-*N*-Acetylglukosamin (UDP-GlcNAc), das über die Glykolyse ausgehend von Fructose-6-Phosphat in vier Reaktionen zur Verfügung gestellt wird (Tong et al. 2009). Zunächst kommt es zur Epimerisierung von UDP-GlcNAc zu *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) (Comb et al. 1958), das anschließend an Position C-6 phosphoryliert wird (Gosh et al. 1961). Diese ersten beiden Schritte werden, wie eingangs erwähnt, vom bifunktionalen Enzym *GNE* katalysiert (Hinderlich et al. 1997; Stäsche et al. 1997). ManNAc-6-Phosphat wird durch die Neu5Ac-9-Phosphat Synthase mit Phosphoenolpyruvat zu Neu5Ac-9-Phosphat kondensiert (Watson et al. 1966). Nach Dephosphorylierung (Neu5Ac-9-Phosphat Phosphatase) des Intermediats entsteht Neu5Ac (Maliekal et al. 2006). Im Unterschied zu allen anderen Monosacchariden (Reinke et al. 2009) findet die Aktivierung der Neu5Ac nicht im Zyoplasma, sondern im Nukleus mithilfe der CMP-Neu5Ac Synthetase statt (Kean et al. 1966; Münster et al. 1998). Über einen noch nicht bekannten Weg wird CMP-Neu5Ac aus dem Kern zunächst ins

Zytoplasma freigesetzt, von wo aus der Nukleotidzucker über einen Antiportmechanismus durch ein spezifisches Transportmolekül (CMP-Neu5Ac-Transporter) in den Golgi-Apparat übertragen wird (Eckhardt et al. 1996). Im *trans*-Golginetzwerk erfolgt über die Aktivität unterschiedlicher Sialyltransferasen und unter CMP-Abspaltung die Assoziation der Ketosäure an terminale Oligosaccharidketten von Glykoproteinen und –lipiden (Benie et al. 2004; Blume et al. 2004; Kean 1991). Die Modifikationen, die zur Bildung der verschiedenen Neuraminsäuretypen führen, werden erst nach der Übertragung der Neu5Ac durch weitere spezifische Transferasen eingeführt (Schauer 2000). Im Anschluss werden die prozessierten Proteine und Lipide von Transfervesikeln zu ihrem Bestimmungsort gebracht.

Neben der *de novo* Biosynthese aus Fructose-6-Phosphat als Produkt der Glykolyse können *N*-Acetylhexosamine alternativ über den sog. „Salvage Pathway“ aus der Nahrung aufgenommen bzw. durch den Abbau endogener oder exogener Glykane verwertet werden (Reinke et al. 2009; Sprenger et al. 2009). Unterschiedliche Kinasen führen die Monosaccharide wieder dem Aminozuckerstoffwechsel zu. Beispielsweise fördert die GlcNAc-Kinase die Konvertierung von GlcNAc zu GlcNAc-6-Phosphat, das zu UDP-GlcNAc abgebaut werden kann (Reutter et al. 1997). *In vitro* konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass dieses Enzym darüber hinaus in der Lage ist, ManNAc aus entsprechend supplementiertem Medium zu phosphorylieren (Allen et al. 1980) und demzufolge einen Mangel an *GNE in vivo* zu kompensieren (Hinderlich et al. 2001).

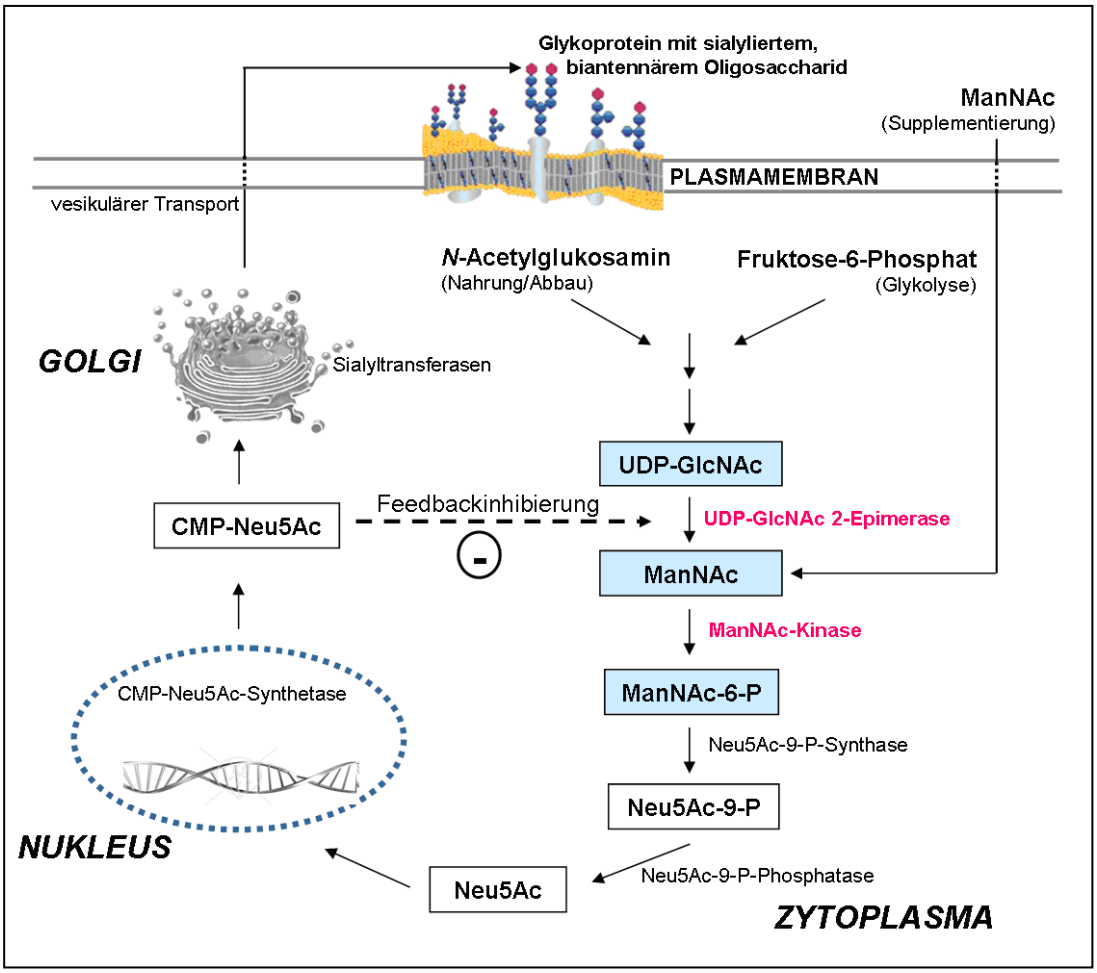


Abb. 1: Biosynthese von Sialinsäuren und sialylierten Glykokonjugaten in Säugetierzellen

1.3 Struktur und Vorkommen von Sialinsäure

Neuramin- bzw. Sialinsäuren sind Kohlenhydrate, die aus einem Grundgerüst aus neun Kohlenstoffatomen in Pyranoseform zusammengesetzt sind (Schauer 1982). Die biologische Diversität dieser Familie beruht auf der Art der Bindung zum assoziierten membranständigen Glykokonjugat und wird durch die Anzahl, Position und Kombination möglicher Hydroxylsubstituenten an den zentralen C-Atomen (C-4, C-7 bis C-9) bestimmt. Charakteristischerweise tragen Sialinsäuren eine carboxylierte C-2-Position, die bei pH 7,4 deprotoniert vorliegt und dem Molekül starken Säurecharakter (pKs-Wert 2,2) verleiht (Traving et al. 1998). Darüber hinaus besitzen sie eine C5-gebundene Aminogruppe, die immer acetyliert ist (Reinke et al. 2009). Die unsubstituierte Form der Neuraminsäure tritt dagegen in der Natur nur äußerst selten auf (Manzi et al. 1990).

Sialinsäuren kommen vorwiegend als terminale Komponenten in Glykoproteinen und –lipiden vor und determinieren die biochemische Vielfalt von Glykokonjugaten. Üblicherweise wird Neu5Ac in *O*-Glykanen in α2,6-Stellung an *N*-Acetylgalaktosamin gefunden, während

Sialinsäure in *N*-gebundenen Glykostrukturen gewöhnlich α2,3- oder α2,6-glykosidisch an Galaktose gebunden vorliegt (Blix et al. 1956). Darüber hinaus sind homomere Verknüpfungen über die C8-Position möglich, die beim neuronalen Zelladhäsionsmolekül NCAM die Sonderform Polysialinsäure (PSA) bilden (Wang 2005). Anzahl und Diversität der Sialinsäuren sind spezies- und gewebeabhängig und folgen einem entwicklungsspezifischen Muster. Im humanen Gewebe finden sich drei Sialinsäuretypen: die Neu5Ac, die 9-*O*-acetylierte Neu5Ac (Neu5,9Ac) und die 9-*O*-lactosylierte Neu5Ac (Neu5Ac9Lt). Nur im Foetus und in einigen Tumoren konnte *N*-Glykolylneuraminsäure (Neu5Gc) im Menschen nachgewiesen werden, die aus exogenen Nahrungsquellen im Gewebe inkorporiert wird (Gabri et al. 2009).

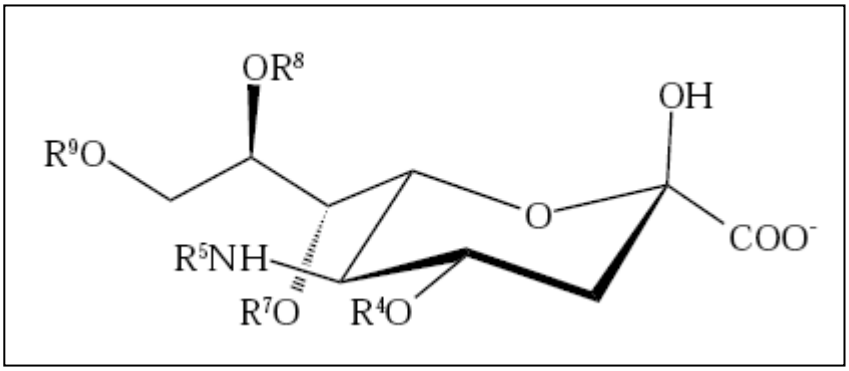


Abb. 2: Struktur von Sialinsäuren Sialinsäuren sind *N*-acylierte Derivate (R5=Acetyl- und Glykolylgruppen) der Neuraminsäure mit Acetyl-, Lactoyl-, Methyl-, Sulfonyl- und Phosphonylgruppen als mögliche *O*-Substituenten (R4, R7-R9). Bei Neu5Ac liegen alle Hydroxylgruppen unmodifiziert vor. Unter physiologischem pH-Wert ist die Carboxylgruppe deprotoniert.

1.4 Biologische Bedeutung der Sialylierung

Die strukturelle Vielfalt der Sialinsäurefamilie wird auf funktioneller Ebene widergespiegelt (Traving et al. 1998). Aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften, der terminalen Lokalisierung, aber auch ihrer räumlichen Ausdehnung sind diese Ketosäuren auf direkte oder indirekte Weise an verschiedensten biologischen Vorgängen beteiligt.

Bedingt durch ihren hydrophilen Charakter und die elektronegative Ladung vermitteln sie die Bindung und den Transport positiv geladener Ionen, fördern darüber hinaus physiologische Attraktions- und Repulsionsprozesse. Die exponierte Position auf Glykokonjugaten der Plasmamembran bildet die Basis für die zentrale Rolle der Sialinsäuren bei Zellerkennungs-, Adhäsions- und Signaltransduktionsprozessen, aber auch für ihre Funktion als Schutzschild subterminaler Molekülanteile vor proteolytischem Abbau (Schauer 1985; Schwarzkopf et al. 2002). Damit bestimmen sie im Wesentlichen die physikalische Halbwertszeit vieler zirkulierender Glykoproteine (Wang 2005). Besonders Krebszellen sind durch einen hohen

Sialylierungsgrad gekennzeichnet, was sie zum einen vor humoraler und zellulärer Immunabwehr schützt. Zum anderen korreliert Hypersialylierung im Allgemeinen mit dem metastasierenden Potenzial transformierter Zellen (Lucka et al. 1999; Varki 2008). Auf Grundlage der ubiquitären Präsentierung stellen Sialinsäuren Strukturen dar, mit deren Hilfe das Immunsystem körpereigene Antigene als solche erkennt (Traving et al. 1998).
Im Folgenden sollen die vielfältigen biologischen Funktionen von Sialinsäuren anhand einiger Beispiele dargestellt werden.

1.4.1 Determinierung struktureller und funktioneller Eigenschaften von Glykokonjugaten

Sialinsäuren gelten sowohl in membrangebundener als auch in löslicher Form als Stabilisatoren von Glykoproteinen und –lipiden. Glykokonjugate der Schleimhäute des Magen-Darm-Trakts und Bronchialsystems, wie Mukine, sind hypersialyliert und tragen aufgrund der damit verbundenen stark negativen Gesamtladung nicht nur zur viskosen Struktur und Löslichkeit des Schleims bei, sondern verleihen darüber hinaus thermische und proteolytische Stabilität (Bhaskar et al. 1992; Kelm et al. 1997). In Erythrozyten führen die physikochemischen Eigenschaften der membranständigen Sialinsäuren zu Anti-Agglutinationseffekten (Kelm et al. 1997).
Der Sialylierungsstatus bestimmt darüber hinaus die biologische Halbwertszeit vieler Proteine. Desialylierung und die damit verbundene Demaskierung subterminaler Galaktosereste fördert die Erkennung und den Abbau von Erythrozyten durch Makrophagen (Traving et al. 1998). Dieses Prinzip gilt auch für andere Blutzellen, wie Leuko- und Thrombozyten, sowie für unterschiedliche Serumglykoproteine, die nach Entfernung terminaler Sialinsäure vom Asialoglykoproteinrezeptor (ASGP-R) – einem Galaktose-spezifischen Rezeptor auf Hepatozyten (Hudgin et al. 1974) – gebunden und lysosomal degradiert werden können (Kelm et al. 1997). Das humane Glykoprotein-Hormon Erythropoetin, das die Differenzierung von Erythrozyten kontrolliert, weist im Blut nicht nur eine reduzierte Halbwertszeit auf, sondern verliert in asialylierter Form seine Aktivität. Dies gilt auch für das Nukleoporin p62, das ein Bestandteil des nukleären Porenkomplexes ist, und *in vitro* nur sialyliert Transportprozesse des Zellkerns fördert (Emsig et al. 1995). Auf Basis dieses Mechanismus wird zur Gewährleistung der biochemischen Beständigkeit von Glykoproteinen, die als therapeutische Agenzien entwickelt und eingesetzt werden, häufig eine Maximierung des Sialinsäuregehalts angestrebt (Jeong et al. 2008).
Im Gegensatz dazu sind Asialoglykoproteine bekannt, die biologisch aktiv sind, wie die Sialyltransferasen ST8SiaIV/PST und ST8SiaII/STX. Diese Enzyme katalysieren die Polysialylierung des neuronalen Zelladhäsionsmolekuls NCAM, können allerdings selbst

durch Autopolysialylierung modifiziert werden. Diese strukturelle Veränderung, wenn auch funktionell irrelevant, erhöht die allgemeine katalytische Aktivität der Transferasen (Foley et al. 2009; Close et al. 2001).
Das Gangliosid GM3 kann über terminale Sialylierung direkt auf die Proliferation von Zellen einwirken. So hemmt die sialylierte Form die Tyrosin-Phosphorylierung des epidermalen Wachstumsfaktors EGF und infolgedessen das Zellwachstum (Bremer et al. 1986). Die Supprimierung kann durch Deacetylierung der Neu5Ac im GM3 aufgehoben werden (Hanai et al. 1988).

1.4.2 Zell-Zell-Interaktion und Adhäsion

Die duale Funktion der Sialinsäure für die Interaktion von Zellen mit ihrer Umwelt wird maßgeblich durch ihre negative Ladung bestimmt. In terminaler Position auf Glykokonjugaten der Zellmembran induziert sie vornehmlich die Abstoßung zwischen Zellen bzw. der extrazellulären Matrix. Andererseits nutzen unterschiedliche Liganden Sialinsäuren als Erkennungsstellen zur Zell-Zell-Interaktion sowie Signaltransduktion (Schauer 2009).

Sialinsäure-bindende Lektine

Für die Vermittlung unterschiedlicher Adhäsionsvorgänge sind verschiedene Sialinsäure-bindende Lektine bekannt, unter denen Selektinen und Siglecs (*Sialic Acid-binding Immunoglobulin Superfamily Lectins*) eine wesentliche Bedeutung zukommt.
Beim Prozess der akuten Entzündung tragen Selektine entscheidend zur initialen Anheftung und Einwanderung von Leukozyten in inflammatorisches Gewebe bei (Sanders et al. 1999). Die C-Typ Lektine vermitteln Ca^{2+}-abhängig beim sog. „Rolling“ eine Verlangsamung und Aggregation der Leukozyten aus dem kapillaren Blutstrom am aktivierten Gefäßendothel (Kim et al. 1999). Die beteiligten Selektine werden in Form von Transmembranproteinen auf Leukozyten (L-Selektin), Endothelzellen (P- und E-Selektin) und Thrombozyten (P-Selektin) exprimiert (Geng et al. 1992) und binden bevorzugt an Tetrasaccharide des Typs Sialyl-Lewis^x und Sialyl-Lewis^a – sialylierte Epitope auf Zelloberflächenglykanen (Petrozzelli et al. 1999; Sanders et al. 1999). Neben den Lektinen interaggieren darüber hinaus unterschiedliche Moleküle der Immunoglobulin-Superfamilie *(IgSF)* und Integrine mit dem vaskulären Endothel und fördern die feste Adhäsion der Leukozyten und die anschließende transendotheliale Migration (Grailer et al. 2009; Kobayashi et al. 2007). Die synergistische Wirkung dieser Proteine wird vorrangig vom Sialylierungsgrad moduliert, wobei die Expression hyposialylierter Liganden mit erhöhter Adhäsion in Verbindung gebracht wird (Bellis 2004; Praetorius et al. 2002; Pretzlaff et al. 2000).

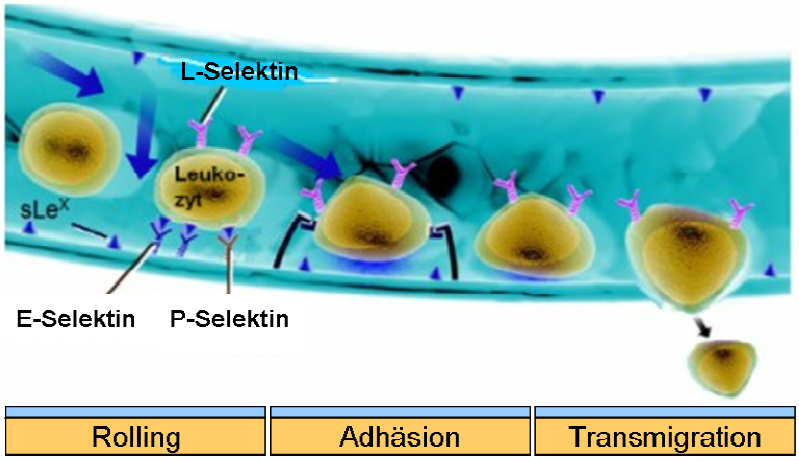


Abb. 3: Selektin-vermittelte Interaktion von Leukozyten mit Endothelzellen
[modifiziert nach Bock et al. 2003]

Die größte Familie Sialinsäure-bindender Lektine in Vertebraten bilden die Siglecs, von denen bislang im Menschen 15 verschiedene Moleküle identifiziert werden konnten (Varki 2009). Diese membrangebundenen Proteine vom I-Typ gehören zur Immunoglobulin-Superfamilie und werden hauptsächlich von Zellen des hämatopoetischen Systems und Immunsystems exprimiert, treten aber auch im zentralen Nervensystems auf (Crocker 2005). Die wichtigsten Vertreter stellen Sialoadhäsin (Sn; Siglec-1), CD22 (Siglec-2), CD33 (Siglec-3) und MAG (Myelin-assoziiertes Glykoprotein; Siglec-4a) dar (Varki et al. 2006). Alle Siglecs sind Transmembranproteine und bestehen N-terminal aus einer (im Falle von Siglec-7 und Siglec-12 aus zwei) extrazellulären Domäne, die der variablen Region von Immunoglobulinen (V-Ig) ähnelt, und einer unterschiedlichen Anzahl (1 bis 16) C2-Ig-ähnlichen Domänen, die strukturell dem konstanten Bereich von Antikörpern gleichen (Angata et al. 2004). An den extrazellulären Molekülbereich schließt sich eine Transmembrandomäne und ein zytoplasmatischer Schwanz an (Angata et al. 2006). Die höchste strukturelle Homologie besteht im N-terminalen Bereich, da die ersten V-Ig-ähnlichen Domänen den Sialinsäurekontakt vermitteln (Varki et al. 2006). Primär kommt dieser durch die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen einem konservierten Argininrest und der Carboxylgruppe der Sialinsäure zustande und wird zusätzlich über hydrophobe Wechselwirkung von zwei aromatischen Aminosäuren stabilisiert (Crocker 2002; Yu et al. 2001). Bislang sind nur die Eigenschaften der zuerst beschriebenen Siglecs im Detail untersucht. Das Sialoadhäsin/Siglec-1 findet sich ausschließlich auf der Oberfläche von Makrophagen (Crocker et al. 1989) und vermittelt die Interaktion mit hämatopoetischen Zellen durch Bindung an α2,3-sialylierte Liganden (Varki et al. 2006). Der CD22-Rezeptor (Siglec-2) erkennt im Gegensatz dazu α2,6-gebundene Sialinsäure und ist sowohl an der homophilen Assoziation von aktivierten B-Lymphozyten als auch anderen Immunzellen

beteiligt (Ghosh et al. 2006). MAG, das einzige Siglec, das exklusiv im Nervensystem auf Oligodendrozyten und Schwann´schen Zellen exprimiert wird (Lehmann et al. 2004), erkennt mono- und disialylierte Liganden und ist hauptsächlich bei der Aufrechterhaltung der Myelinscheidenstruktur involviert (Blixt et al. 2003; Schachner et al. 2000).

Das neuronale Zelladhäsionsmolekül NCAM und Polysialinsäure (PSA)

Ein weiteres wichtiges Adhäsionsmolekül der *IgSF* stellt das neuronale Transmembranprotein NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) dar, das sowohl homo- als auch heterophile Zellinteraktion vermittelt (Atkins et al. 2004; Edelman et al. 1991; Paratcha et al. 2003). Im embroynalen Nervensystem unterliegt es starker posttranslationaler Modifikation mit Polysialinsäure (PSA), die ein Homopolymer aus bis zu 200 Einheiten α2,8-verknüpfter Sialinsäure bildet (Nakata et al. 2005). Ausgedehnte hydrophobe Bereiche führen zur sterischen Repulsion, die Zell-Zell-Interaktion mindert und Zellmigration im sich entwickelnden neuronalen Netzwerk fördert (Bork et al. 2007; Rutishauser 2008). Während der Ontogenese nimmt der Sialylierungsgrad ab, so dass im adulten Gehirn Nervenzellen verstärkt adhärieren. Lediglich Bereiche im Hippocampus, Hypothalamus und in der Hypophyse, die sich durch ihre Fähigkeit auszeichnen, Neuronen zu regenerieren und kontinuierliche Plastizität zu bewahren, bleiben lebenslang polySia-NCAM positiv (Kuhn et al. 1996; Seki et al. 1993).

1.4.3 Rolle der Sialinsäure im Tumorstoffwechsel und Krebs

Maligne Transformation geht mit einer umfassenden Umstrukturierung der Kohlenhydratzusammensetzung der Zellmembran einher (Seales et al. 2005). Diese Veränderungen beruhen hauptsächlich auf einer Erhöhung der Sialinsäurekonzentration, die meist positiv und linear mit dem metastasierenden Potenzial der entarteten Zelle korreliert (Yogeeswaran et al. 1981). Die Überexpression sialylierter Antigene, wie sialylierte Lewis^{x}- und Lewis^{a}-Liganden und Tumor-assoziiertes Thomsen-Friedenreich Antigen (TF-Antigen), wird für die häufigsten Krebsarten, z.B. das kolorektale Karzinom und Brustkrebs, beschrieben und determiniert häufig eine schlechte Überlebensprognose des Patienten (Schauer 2009; Varki et al. 2008; Videira et al. 2009; Wang 2005). Entsprechend der Leukozytenmigration auf inflammatorischem Gefäßendothel erleichtern diese antigenen Epitope den Tumorzellen die Interaktion mit Selektinen und ermöglichen Migration, Proliferation und Invasion (Laubli et al. 2006; Singh et al. 2001). Dagegen vermittelt eine Tumor-spezifische, gesteigerte PSA-NCAM-Menge, z.B. im Lungen- und Pankreaskrebs und in Neuroblastomen, Repulsions-bedingt die Metastasierung (Schreiber et al. 2008). In

Analogie dazu konnte *in vitro* das tumorigene Potenzial durch eine gezielte Inhibierung der Oligosaccharidexpression signifikant reprimiert werden (Reddy et al. 2006). Ähnlich dem molekularen Mimikrie zahlreicher pathogener Mikroorganismen (Carlin et al. 2009) nutzen transformierte Zellen die Maskierung mit Sialinsäure, um antigene Determinanten vor der immunologischen Erkennung, beispielsweise durch Makrophagen oder NK-Zellen, zu schützen und dementsprechend ihre Halbwertszeit zu erhöhen (Saldova et al. 2008).

Die allgemeine Modifizierung des Sialylierungsmusters ist vorwiegend auf einer Tumor-spezifischen, differenziellen Aktivität bestimmter Enzyme begründet, deren Expression sich im Zuge der malignen Transformation ändert (Wang 2005). So korreliert die vermehrte Präsentierung α2,6-gebundener Sialinsäure in unterschiedlichsten Krebsarten, wie dem Kolorektal-, Zervix-, Brust- und Leberkrebs sowie bestimmten Gehirntumorformen, mit der verstärkten Aktivität der Sialyltransferase ST6Gal-I (β-Galaktosid α2,6-Sialyltransferase I) (Christie et al. 2008; Dall´Olio et al. 2001; Gessner et al. 1993; Seales et al. 2005). Mittlerweile ist bekannt, dass verschiedene onkogene Proteine und Zytokine zelluläre Glykosylierungsvorgänge triggern können (Dalziel et al. 2004; Seales et al. 2003). In murinen Fibroblasten führt die Transformation mit den Proto-Onkogenen K-Ras bzw. H-Ras zu einer spezifischen Erhöhung der ST6Gal-I mRNA-Menge und zu einer entsprechend gesteigerten Enzymaktivität verbunden mit verstärkter α2,6-Sialylierung (Dalziel et al. 2004; Shaikh et al. 2008). Analog dazu fördern Zytokine, wie der Tumornekrosefaktor TNF-α und die Interleukine IL-1 und IL-6, die Tumorprogression und induzieren die ST6Gal-I-Expression (Christie et al. 2008; Dranoff 2004). *In vitro* konnte die Manifestierung des metastasierenden Phänotyps, der sich durch erhöhte Adhäsion an die extrazelluläre Matrix, reduzierte Zell-Zell-Interaktion und gesteigertes Invasionspotenzial auszeichnet (Lin et al. 2002), anhand von Hypersialylierung der β_1-Untereinheit des Integrins nachgewiesen werden (Seales et al. 2005). In unterschiedlichen transformierten Zelltypen sowie in Ras-transfizierten Kolonepithelzellen konnte das β_1-Integrin als spezifisches Target der α2,6-Sialyltransferaseaktivität identifiziert werden (Bellis 2004; Seales et al. 2003).

Neben ST6Gal-I wurde die ST3Gal-I und ST3Gal-IV, die den Transfer von α2,3-verknüpfter Sialinsäure realisieren, als relevant für die Ausprägung des Tumorphänotyps identifiziert (Hsu et al. 2005; Videira et al. 2009). Zusätzlich zur Übertragung von Sialinsäure spielen darüber hinaus Sialidasen eine entscheidende Rolle für den Tumor-assoziierten Umbau des Sialinsäuremusters, die Neuraminsäure vom nichtreduzierenden Ende der Glykoproteine bzw. Glykolipide her abbauen (Uemura et al. 2009). Bislang sind vier unterschiedliche Neuraminidasen (NEU1 bis NEU4) kloniert und charakterisiert worden. Verschiedene Studien im murinen Modell belegen zumindest für die NEU1 (Uemura et al. 2009) und NEU3 (Anastasia et al. 2008; Shiozaki et al. 2009) eine wichtige Funktion für das Überleben und die Ausbreitung von malignen Zellen.

Bestimmte Tumorarten weisen auch bei den sialylierten Glykosphingolipiden (Ganglioside) einen quantitativ und qualitativ veränderten Neuraminsäuregehalt auf (Fredman et al. 2003; Oliva et al. 2005; Varki 2008). In vielen Krebsformen werden die Disialoganglioside GD2, GD3 und GM3 überexprimiert. Allerdings wird die pro-apoptotische Aktivität des Gangliosids GD3 in Melanomen und Basalzell-Karzinomen durch erhöhte Neu5,9Ac-Konzentration – an C9-Position acetylierte Sialinsäure – gehemmt (Malisan et al. 2002). Ein weiteres Tumor-spezifisches Phänomen ist das Vorkommen erhöhter Anteile von Neu5Gc (*N*-Glykolylneuraminsäure) im humanen GM3, das in Brustkrebsgewebe bzw. Darm- und Lungenkarzinomen vermutlich über Nahrungsquellen inkorporiert wird (Higachi 1990; Oliva et al. 2005). Neben ihrer Relevanz für Tumorwachstum und Metastasierung fungieren Ganglioside als Immunomodulatoren, die *in vitro* durch direkte Bindung an unterschiedliche Immunzellen bzw. indirekt durch Blockierung ihrer Synthese eine Supprimierung der zellulären Immunantwort bewirken (Birkle et al. 2003).

1.5 Anoikis und Tumorprogression

Anoikis (griech. „Heimatlosigkeit“) stellt eine Sonderform der Apoptose dar, die durch Verlust der Adhäsion epi- bzw. endothelialer Zellen zur extrazellulären Matrix (ECM) induziert wird (Frisch et al. 1994; Meredith et al. 1993). Sie dient als Schutzmechanismus, um aus dem Gewebeverband dissoziierte Zellen vor erneuter Anheftung zu eliminieren (Chiarugi et al. 2008), wie zum Beispiel in der Haut (Polakowska et al. 1994), im Kolonepithel (Hall et al. 1994), bei der Rückbildung von Brustgewebe (Boudreau et al. 1995) sowie im ersten Kavitationsschritt der Embryogenese (Coucouvanis et al. 1995). Während der malignen Transformation erwerben epitheliale Zellen im Allgemeinen eine Resistenz gegenüber Anoikis, die einen Wachstumsvorteil darstellt und Metastasierung ermöglicht (Plath et al. 2000). Die Bedeutung der Anoikisresistenz wurde bereits für die häufigsten und aggressivsten Krebsarten, wie das Pankreas-Adenokarzinom (Liau et al. 2007), Dickdarm- (Vachon 2008) und Prostatakrebs (Giannoni et al. 2009), Hepatome (Cao et al. 2008) sowie das Mammakarzinom (Parsons et al. 2009) *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Integrine gelten als zentrale Mediatoren der Anoikis, da sie primär an der Zellverankerung an ECM-Komponenten, aber auch an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind, die das Überleben der Zelle bestimmen (Marastoni et al. 2008; Reginato et al. 2003). Dabei handelt es sich um heterodimere, transmembranständige Glykoproteine, die aus α- und β-Untereinheiten zusammengesetzt sind. Im Menschen sind bislang 18 α- und 8 β-Untereinheiten beschrieben worden, die zu mindestens 24 unterschiedlichen αβ-Integrinkombinationen führen (Goodwin et al. 2009). Über spezifischen β_1 *Knock-Down* und

einer damit verbundenen Induktion der Anoikisresistenz in Pankreaskarzinom-Zellen *MiaPaCa-2* konnte ein entscheidender Hinweis auf die zentrale Bedeutung der Integrin-Untereinheit im Rahmen dieses Prozesses gefunden werden (Walsh et al. 2009).

1.5.1 Anoikis-spezifische Signaltransduktion

Die molekularen Mechanismen, die dem Ablauf des Anoikisprozesses zugrunde liegen, konnten bislang noch nicht vollständig geklärt werden. Frühe Studien belegten eine Beteiligung des JNK (Jun-Aminoterminale Kinase)-Signalwegs und Caspase-8 für die Induktion der Anoikis (Frisch et al. 1996). Spätere Arbeiten deuteten auf die wichtige Rolle der Signalmoleküle PI3-Kinase (Phosphatidylinositol-3-Phosphat Kinase), FAK (*Focal Adhesion Kinase*) und der Ras/MAP/ERK-Kinasekaskade im Rahmen von Anoikisresistenz hin (Alahari et al. 2002). Darüber hinaus ist die Anoikis-protektive Funktion von ILK (*Integrin-Linked Kinase*), E-Cadherin, Akt/Proteinkinase B und Bcl-2 genau untersucht (Grossmann 2002). Onkogenes Ras-Protein – eine mutierte Form der kleinen GTPase in transformierten Zellen – gilt seit Definition des Anoikisbegriffs durch Frisch und Francis (1994) als etablierter Vermittler für Anoikisresistenz (Liu et al. 2006). Intrinsische Faktoren, wie die Störung des mitochondrialen Gleichgewichts durch Zellstress, bzw. die extrinsische Aktivierung über Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche münden in unterschiedliche Signalwege, die zum Zelltod führen (Gilmore 2005). Allen gemeinsam ist die Aktivierung einer Signalkaskade von Caspasen (Chiarugi et al. 2008), die die Ausbildung des apoptotischen Phänotyps bedingt, der sich charakteristischerweise in Form von Nukleusfragmentierung oder Abschnürung apoptotischer Körperchen („*Blebbing*“) äußert (Valentijn et al. 2004).

Beim intrinsischen Weg resultiert die Initiierung der Caspase-Signaltransduktion vornehmlich aus der gezielten Aktivierung von Proteinen der Bcl2-Familie, die die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und damit die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren, wie Cytochrom c, hervorrufen (Gilmore 2005). Neuere Anoikis-Modelle führen auch einen Einfluss der sog. „BH3-only“-Unterfamilie der Bcl2-Proteine, wie Bim, Bad, Bid, Noxa, Puma und Bmf, an (Bouillet et al. 2002). Diese gelten als Sensoren für apoptotische Signale und zellulären Stress, die bei Verlust der Adhäsion die Translokation Zelltod-vermittelnder Proteine, wie Bax und Bak, in die äußere Mitochondrienmembran fördern und damit deren Permeabilisierung induzieren (Giannoni et al. 2008; Reddig et al. 2005). Für einige BH3-Proteine konnte *in vitro* ein direkter Einfluss auf Ausbildung des Anoikis-Phänotyps nachgewiesen werden. So resultierte der gezielte *Knock-Down* der Bid- und Bim-Expression bei Brustkrebszellen in Supprimierung von Anoikis (Reginato et al. 2003; Valentijn et al. 2004).

Der extrinsische Weg wird durch die Bindung von Liganden, wie Fas oder TNF-α, an Todesrezeptoren getriggert, der die Formierung des sog. „Death-Inducing Signaling"-Komplexes (kurz *DISC*) und die damit verbundene Rekrutierung der Caspase-8 über das Adaptormolekül FADD induziert (Chiarugi et al. 2008).

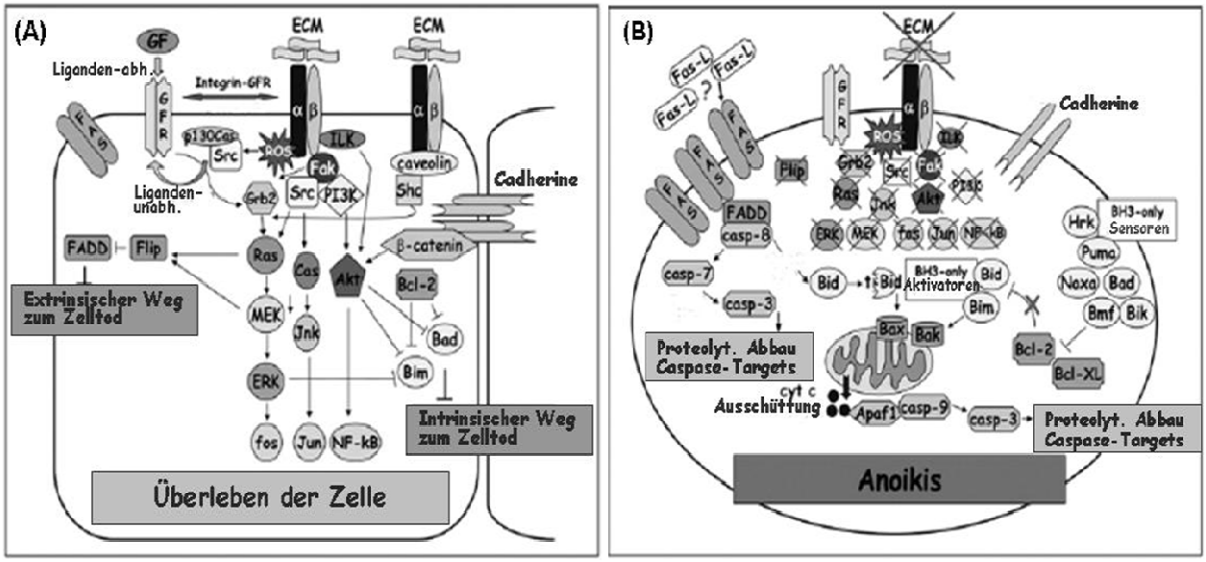


Abb. 4: Signalwege, die zum Überleben der Zelle (A) bzw. zu Anoikis (B) führen
A: Ingegrin-ECM-Kontakt induziert unterschiedliche Signalkaskaden (ERK, JNK, Akt), die über die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren (fos, Jun, NF-kB) zum Überleben der Zelle führen und pro-apoptotische Signale blockieren. Zusätzlich führt die Assoziation von Integrinen mit dem Wachstumsfaktor-Rezeptor GFR (*Growth Factor Receptor*) sowie Cadherin-vermittelter Zellkontakt über die Inhibierung des extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweges und der Hemmung der *BH3-only*-Proteine zum Überleben der Zelle. **B**: Verlust des Zellkontakts zur ECM und ein vermehrtes Fas-Signal induzieren die Aktivierung Anoikis-fördernder extrinsischer und intrinsischer Faktoren. [modifiziert nach Chiarugi et al. 2008]

1.5.2 Die Pankreas-Karzinomzelllinie *Capan-1* als *in vitro* Modell für Anoikis

Die Progression des Pankreas-Adenokarzinoms kennzeichnet ein frühes aggressives, lokales Wachstum und ein stark metastasierendes Potenzial (Bister et al. 2007), das mit der Überexpression Apoptose-inhibierender Proteine, wie cIAP2 (*Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 2*), korreliert (Esposito et al. 2007). Unterschiedliche Studien verweisen auf einen bedeutenden Zusammenhang zwischen Signalprozessen, die den hochinvasiven Tumorphänotyp bedingen und zu Anoikisresistenz führen (Berezovskaya et al. 2005; Douma et al. 2004; Yawata et al. 1998; Zhu et al. 2001).
Die Pankreaskarzinom-Zelllinie *Capan-1* repräsentiert den humanen malignen Phänotyp des Bauchspeicheldrüsenkrebses aufgrund hoher genetischer Homologie auf annähernd identische Weise. Diese Übereinstimmungen manifestieren sich hauptsächlich in der Aktivierung von onkogenem K-Ras (Tsuchida et al. 1998) und in einer Mutations-bedingten Inaktivierung der Tumorsuppressorgene DPC4 (Grau et al. 1997), p53 (Bouvet et al. 1998)

und $p16^{INK4a}$ (Schutte et al. 1997). Vor diesem Hintergrund stellen *Capan-1* Zellen ein geeignetes *in vitro* Modellsystem dar, um Anoikis-assoziierte Prozesse des transformierten Pankreas zu untersuchen.

Eine Reexpression des Tumorsuppressors $P16^{INK4a}$ konnte in *Capan-1* Zellen und Zelllinien unterschiedlichsten Ursprungs, wie der Haut (*NKI4*), Niere (*MDCK*) und Leber (*SKHep1*), mit der Wiederherstellung der Anoikis-Suszeptibilität in Verbindung gebracht werden (Plath et al. 2000). Das Protein aus der INK4a-Familie gilt als direkter Zellzyklusinhibitor. Durch Assoziation mit den Zyklin-abhängigen Kinasen (CDK) 4 und 6 sowie Zyklin D blockiert P16 den Übergang von der G1- zur Synthesephase. Diese Interaktion verhindert die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins pRb bzw. der Taschenproteine p130 und p170 und damit die Freisetzung der gebundenen E2F-Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität für das Fortschreiten des Zellzyklus nötig ist. Die vorrangige biologische Funktion von $P16^{INK4a}$ liegt in diesem Zusammenhang in der Entfernung defekter Zellen aus dem Proliferationszyklus, wie z.B. nach DNA-Schädigung (Shapiro et al. 1998).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Anoikis, eine spezielle Form der Apoptose, wird durch den Verlust der Verankerung der Zelle zur extrazellulären Matrix ausgelöst. Als zentrale Vermittler dieses Prozesses gelten Integrine. Diese heterodimeren, transmembranständigen Glykoproteine sind vorrangig an der Regulierung der Adhäsion von Zellen beteiligt. Darüber hinaus sind sie in Signaltransduktionsprozesse involviert, die das Zellschicksal bezüglich Überleben bzw. Apoptose determinieren (Frisch et al. 1997; Huveneers et al. 2007). Die Interaktion von Integrinen mit Liganden bzw. Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Fibronektin, wird entscheidend durch Sialylierung moduliert (Bellis 2004; Seales et al. 2005; Zhuo et al. 2008). Sialinsäuren sind als terminale Monosaccharide in Glykokonjugaten der Zellmembran im Allgemeinen an einer Vielzahl von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt.
Die Entwicklung von Anoikisresistenz stellt eine charakteristische Eigenschaft vieler humaner Karzinome dar, die oft vom Verlust des $\alpha_5\beta_1$-Integrins, der als Fibronektinrezepor gilt, begleitet wird (Frisch et al. 1997). Die Reexpression des Tumorsuppressors $p16^{INK4a}$ konnte die Sensibilität für Anoikis sowie das Vorkommen des Fibronektinrezeptors in der humanen Pankreaskarzinom-Zelllinie *Capan-1* wiederherstellen (Plath et al. 2000).

Vor diesem Hintergrund sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Bedeutung der Sialylierung für die Anoikis von Pankreaskarzinom-Zellen *Capan-1* untersucht werden. Auf Basis des Genexpressionsprofils zentraler Elemente des Sialinsäuremetabolismus im *in vitro* Modellsystem Anoikis-sensibler $p16^{INK4a}$-substituierter *Capan-1* Zellen (*Capan-1/+p16/+Anoikis*) im Vergleich zu Mock-Transfektanden (*Capan-1/-p16/-Anoikis*) sollte ein wichtiger Beitrag zur Charakterisierung der molekularen Grundlagen für die Ausprägung von Anoikisresistenz im Verlauf der malignen Transformation geleistet werden (Ricca et al. 2009).

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

2.1.1.1 Die eukaryotische Zelllinie *Capan-1*

Die Zelllinie *Capan-1* ist eine humane, adhärent wachsende Pankreaskarzinom-Zelllinie. Sie zeigt epitheliale Morphologie und wirkt in Nacktmäusen tumorigen.
Ursprünglich wurde *Capan-1* im Jahr 1974 aus der Lebermetastase eines 40jährigen Kaukasiers etabliert, der an einem duktalen Adenokarzinom des Pankreas erkrankt war (Fogh et al, 1977).

Sowohl *Capan-1* Wildtypzellen als auch P16- und die Kontrolltransfektanden Mock wurden als freundliche Gabe von Frau Dr. K. M. Detjen, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie, Campus Virchow Klinikum, Charité Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt.

Zur Generierung von P16-Transfektanden integrierten Plath et al. (Plath et al. 2000) die gesamte cDNA, die für $p16^{INK4a}$ kodiert, in den eukaryotischen Expressionsvektor pRC_{CMV} (Fa. Invitrogen; gesamt 6,03kb) und subklonierten das erhaltene Konstrukt in *Capan-1* Zellen. Das Insert wird in diesem System vom CMV-Promotor kontrolliert. Die Plasmidselektion erfolgte über Neomycin-Resistenz. Die Mock-Kontrollklone wurden dagegen durch stabile Transfektion des Vektors ohne Insert (5,5kb) in *Capan-1* Pankreaskarzinom-Zellen erzeugt.

2.1.1.2 Zellkulturmedien und –zusätze

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle für die Zellkultivierung eingesetzten Medien, Zusätze und Lösungen von der Firma PAA (Pasching, Österreich) bezogen.

Vollmedium Capan-1:
RPMI 1640, 15% FBS, 2mM Glutamin, 0,25mg/ml Amphotericin B.

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Substanzen

5-Aza-2´-Deoxycytidin (5-Aza-dC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serum Albumin (BSA)	Promega, Mannheim
1,2-Diamino-4,5-Methylendioxybenzol (DMB)	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 100mM)	Peqlab, Erlangen
β-Mercaptoethanol	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
N-Acetylneuraminsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Poly (2-Hydroxyethyl-Methacrylat) (polyHEMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PNA (*Peanut* Agglutinin), Lektin	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Propodium Iodide Staining Solution	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Random Hexamer Primer	BIOTEZ, Berlin
SNA (*Sambucus nigra* Agglutinin), Lektin	Vector Laboratories, Burlingame, USA
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Carlsbad, USA

Alle weiteren eingesetzten und nicht näher bezeichneten Basis-Chemikalien wurden über die Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim) und die Fa. Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1.3 Enzyme

DNase I (*RNase-Free DNase Set*)	Qiagen, Hilden
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Neuraminidase, *Vibrio cholerae*	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNase A	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNasin	Promega, Mannheim

2.1.4 Fertig-Kits und zugehörige Substanzen

Assay On Demand For *Real-Time* PCR	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
GeneChip® One-Cycle Target Labeling Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip® Sample Cleanup Module	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip® WT Sense Target Labeling Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
Pierce 660nm Protein Assay Reagent/Kit	Pierce, Rockford, USA

RNA 6000 Nano Chip Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
Transmessenger™ Transfection Reagent	Qiagen, Hilden

2.1.5 siRNA-Oligonukleotide

Die von der Firma Sigma-Proligo synthetisierten und in lyophilisierter Form bezogenen siRNA-Oligonukleotide, die zur Reduktion der *GNE*-Expression eingesetzt wurden, wurden mit DEPC-behandeltem Wasser auf eine Konzentration von 50µM eingestellt und bei -20ºC gelagert.

Die lyophilisierte Negativkontroll-siRNA (*AllStars Negative Control siRNA*, Qiagen) wurde 20µM konzentriert im dafür vorgesehenen siRNA-Suspensionspuffer gelöst. Gemäß den Empfehlungen des Herstellers wurden die Oligonukleotide im Anschluss 1min bei 90ºC erhitzt, 60min bei 37ºC inkubiert und bis zur Verwendung bei -20ºC gelagert.

Für den transienten *GNE Knock-Down* wurden die nachfolgend angeführten siRNA-Sequenzen eingesetzt.

siGNE-3

Zielsequenz	**5´- AAA GAC TAC ATG AGC ATC ATT – 3´**
Sense	5´- r(AAA GAC UAC AUG AGC AUC AUU)dTdT – 3´
Antisense	5´- r(AAU GAU GCU CAU GUA GUC UUU)dTdT – 3´

siGNE-8

Zielsequenz	**5´- AAA ATA TTG CAA GCA CTG CAC – 3´**
Sense	5´- r(AAA AUA UUG CAA GCA CUG CAC)dTdT – 3´
Antisense	5´- r(GUG CAG UGC UUG CAA UAU UUU)dTdT – 3´

siGNE-9

Zielsequenz	**5´- AAA CAG TAC CCT TGT TCA AAG – 3´**
Sense	5´- r(AAA CAG UAC CCU UGU UCA AAG)dTdT – 3´
Antisense	5´- r(CUU UGA ACA AGG GUA CUG UUU)dTdT – 3´

siGNE-20

Zielsequenz	**5´- AAG ACA AAA TAT TGC AAG CAC – 3´**
Sense	5´- r(AAG ACA AAA UAU UGC AAG CAC)dTdT – 3´
Antisense	5´- r(GUG CUU GCA AUA UUU UGU CUU)dTdT – 3´

Negativkontroll-siRNA *"AllStars Negative Control siRNA"* (Qiagen)

Die kommerzielle *AllStars* siRNA-Negativkontrolle diente im Experiment als Referenz, um den Gen-spezifischen *Knock-Down* Effekt zu quantifizieren. Nach Angaben des Herstellers weist diese siRNA keine Homologie zu bekannten Säugergenen auf.

2.1.6 Puffer und Lösungen

DMB-Lösung
8mg DMB (1,2-Diamino-4,5-methylendioxybenzol)
508µl 10M Mercaptoethanol
508µl 180mM $Na_2O_4S_2$
4064µl A.d.

PI-Färbelösung (Zellzyklusanalyse/FACS)
10µl Propodiumiodidlösung (50µg/ml)
5µl RNase A (1mg/ml)
ad 500µl HBSS

FACS-Puffer
100mg Natriumazid, pH 7,2
1g BSA
100ml HBSS (ohne Phenolrot)

2.1.7 *TaqMan*-PCR Primersonden (*Assays On Demand*^{TM})

Target-Gen		***Assay On Demand*^{TM} ID**
ASNS	*(Asparagine Synthetase)*	Hs00155888_m1
CHAC1	*(Cation Transport Regulator Homolog 1)*	Hs00225520_m1
COL13A1	*(Collagen, Type XIII, Alpha 1)*	Hs00193225_m1
DDIT3	*(DNA-Damage-Inducible Transcript 3)*	Hs99999172_m1
GNE	*(Glucosamine(UDP-N-acetyl)-2-Epimerase/N-Acetylmannosamine Kinase)*	Hs00178556_m1
HSPA5	*(Heat Shock 70kDa Protein 5)*	Hs99999174_m1
Humanes Aktin	(beta Aktin) endogene Kontrolle	4333762T
JDP2	*(Jun Dimerization Protein 2)*	Hs00185689_m1
PLAT	*(Plasminogen Activator, Tissue)*	Hs00263492_m1
PRTFDC1	*(Phosphoribosyl Transferase Domain Containing 1)*	Hs00220232_m1
PSAT1	*(Phosphoserine Aminotransferase 1)*	Hs00795278_m1
TRIB3	*(Tribbles Homolog 3)*	Hs01082394_m1
VPS24	*(Vacuolar Protein Sorting 24 Homolog)*	Hs00984915_m1

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Cryotubes *Cryovial Sterile*	Simport, Bernard-Pilon, Kanada
DEPC-Wasser	Invitrogen, Carlsbad, USA
Klebefilm für Mikrotiterplatten (*MicroAmp*^{TM} *Optical Adhesive Film)*	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Mikrotiterplatte *TaqMan* (*Thermowell GOLD 384 Well PCR Microtiterplate)*	Corning Life Sciences, Lowell, USA
Pipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen *ep T.I.P.S. Reloads*	Eppendorf, Hamburg
QiaShredder Säulen	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße *Safe Lock Tubes*	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturflaschen, 25cm^2, 75cm^2	BD Labware, Franklin Lakes, USA
Zellkulturplatten, 6-, 24-Wells	BD Labware, Franklin Lakes, USA

2.1.9 Geräte und Zubehör

Gerät	Modell	Bezugsquelle
Bioanalyzer	2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn
Brutschrank	CO_2 Incubator HERAcell 240	Thermo Fisher Scientific, Rochester USA
Durchflusszytometer	FACScalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage	Sartorius Basic	Sartorius, Göttingen
Gefriercontainer	NALGENE™ Cryo 1ºC Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Rochester USA
HPLC	LC-10AD VP Liquid Chromatograph	Shimadzu, Duisburg
HPLC-Fluoreszenz-Detektor	RF-10A XL Fluorescence Detector	Shimadzu, Duisburg
HPLC-Säule	RP18, Lichrospher 100, 5µm	Shimadzu, Duisburg
Mikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
Mikrotiterplattenlesegerät	Tecan Spectra Fluor Plate Reader	Tecan, Männedorf, Schweiz
Multipipette	Multipipette® plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Neubauer Improved	Marienfeld, Lauda-Königshofen
pH-Meter	pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Pipetten	Eppendorf Research®	Eppendorf, Hamburg
Pipettus	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Rotations-Vakkuumkonzentrator	SpeedVac Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
RT-PCR Thermocycler	ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Schüttelinkubator	Certomat® H	B. Braun, Melsungen
Spektralphotometer	NanoDrop® ND-1000	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Thermocycler	PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research, Watertown, USA
Tischzentrifuge	Centrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	Vortex Genie 2™	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Zentrifuge	Varifuge 3.OR	Heraeus, Hanau

2.1.10 Software und online-verfügbare Datenbanken

Zur Datenanalyse und -validierung kamen neben den üblichen Microsoft Office-Anwendungen (Excel, Word etc.) nachfolgend aufgeführte Software-Programme und online-verfügbare Datenbanken zum Einsatz.

CellQuest™	Becton Dickinson, Heidelberg
GeneCards®	www.genecards.org
Gene Ontology	www.geneontology.org
GeneSpring GX (Version 10.0)	Agilent Technologies, Waldbronn
LabSolutions LCsolution (Version 1.03)	Shimadzu, Duisburg
NCBI Blast	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast
ONCOMINE™ RESEARCH	www.oncomine.org
Sequence Detection System SDS (Version 2.2)	Applied Biosystems, Carlsbad, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten der Zellkultivierung, –gewinnung und -aufarbeitung wurden an Sterilwerkbänken (Sicherheitsstufe 2) der Fa. Heraeus unter Verwendung steriler Materialien durchgeführt. Die Pankreaskarzinom-Zellen wurden in 25 (Stammhaltung) bzw. 75 cm^2 (Zellvermehrung für durchzuführende Experimente) Zellkulturflaschen bei 37℃ und 5% Volumenanteil CO_2 in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre kultiviert.

2.2.1.1 Kultivierung und Ernte adhärenter *Capan-1* Zellen

Der Austausch des Kulturmediums und das Passagieren der Zellen erfolgte alle 3-4 Tage bei etwa 80%-iger Konfluenz. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt, die adhärenten Zellen mit sterilem PBS gewaschen und mit Accutase beschichtet. Dieses kommerzielle Agens, das eine Mischung proteo- und kollagenolytisch wirkender Enzyme darstellt, erhält nach Herstellerangabe die Struktur der Oberflächenepitope, damit auch die relativ fragilen Sialinsäurestrukturen auf Zellmembranen.
Nach Zugabe von Accutase erfolgte eine Inkubation bei 37ºC, bis sich unter mikroskopischer Kontrolle alle Zellen vom Untergrund gelöst und vereinzelt hatten. Die Wirkung der Enzymlösung wurde durch Zugabe von Komplettmedium gestoppt. Von der resultierenden Zellsuspension wurde ein definiertes Volumen in eine neue Kulturflasche überführt und mit Medium aufgefüllt.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Für die Ermittlung der Zellzahl wurde eine kleine Menge Zellsuspension unter das Deckgläschen einer Neubauer-Zählkammer übertragen und die Zellen innerhalb der vier Großquadrate unter dem Mikroskop ausgezählt.

Die Gesamtzellzahl ergibt sich dabei aus folgender Formel:
0,25 x Anzahl der Zellen x 10^4 x Volumen.

2.2.1.3 Kryokonservierung und Rekultivierung eukaryotischer Zellen

Zur Konservierung bzw. längerfristigen Lagerung wurden konfluent gewachsene Zellen mit PBS gewaschen, gelöst und geerntet. Jeweils 1-2x10^6 pelletierte Zellen wurden in Serum-freiem Einfriermedium (*CryoMaxx II*, Fa. PAA) in speziellen Kryoröhrchen aliquotiert und zunächst bei -80ºC in einem mit Isopropanol ummantelten Gefriergefäß (Gefriercontainer, Fa. Nalgene) langsam heruntergekühlt. Um Zellschädigungen beim Gefrierprozess zu minimieren, ist dem Spezialmedium 10% DMSO zugesetzt, das aufgrund seiner hygroskopischen Eigenschaften die Bildung von Eiskristallen verhindert.
Anschließend wurden die Zellen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff (-196ºC) überführt und können unter diesen Bedingungen ohne Verlust der Viabilität über Jahre gelagert werden.

Zum Auftauen wurden die Zellen nach der Entnahme aus dem Gefriertank unverzüglich in einem auf 37℃ vorgeheizten Wasserbad aufgetaut und vor der Kultivierung in T25-Zellkulturflaschen zweimal mit Vollmedium (Verdünnung des toxisch wirkenden DMSO) gewaschen.
Nach der Revitalisierung wurden die Zellen bis zum experimentellen Einsatz über mindestens fünf Passagen kultiviert.

2.2.2 Transfektion von humanen Zelllinien: RNA-Interferenz (*RNAi)*

RNA-Interferenz *(RNAi)* definiert die spezifische, posttranskriptionelle Inhibierung der Genexpression durch kurze, doppelsträngige RNA-Moleküle, die zur Sequenz des auszuschaltenden Gens komplementär sind. Dementsprechend bietet die *in vitro* Applikation dieses natürlichen Mechanismus eine effektive Möglichkeit der funktionellen Untersuchung von Genen.

Im Zytoplasma eukaryotischer Zellen wird doppelsträngige RNA unter physiologischen Bedingungen durch die RNAse Dicer in 21-23 Nukleotid lange Fragmente - sogenannte siRNAs (*small interfering RNA*) – abgebaut. Diese siRNA-Moleküle werden in den Multienzymkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) integriert, in einer ATP-abhängigen Reaktion entwunden und zu ss-siRNA prozessiert. Über die komplementäre Interaktion mit der Zielsequenz vermittelt die siRNA durch die assoziierte RNase Argonaut letztlich die Degradierung der gebundenen mRNA. Im Idealfall führt dies zur deutlichen Reduktion der Expression des Gens bzw. des entsprechenden Proteins. Der Effekt wird als „Knock-Down“ bezeichnet.

Künstliche, gegen das zu analysierende Zielgen synthetisierte siRNA-Moleküle sind typischerweise 21 Nukleotide lang und tragen am 3´-Ende mehrere überhängende Thymidin-Nukleotide. Diese synthetischen Oligonukleotide werden mittels Lipid-basierter Reagenzien komplexiert und können auf diese Weise in Zellen geschleust werden.
Im Gegensatz zu siRNA-Molekülen, deren Wirkung proportional mit der Teilung der Zellen abnimmt (kurzlebiger, transienter *Knock-Down* Effekt), ermöglicht der Einsatz vektorbasierter *short hairpin* RNAs (shRNA) eine längerfristige Hemmung der Genexpression (stabiler *Knock-Down* Effekt). Nach Integration dieser Plasmidkonstrukte ins Genom kommt es durch die Aktivität der endogenen RNA-Polymerase III zur kontinuierlichen Synthese von Haarnadel-Strukturen, die nach zytoplasmatischer Prozessierung als kurze siRNA-Strukturen die Transkription des Targets mindern.

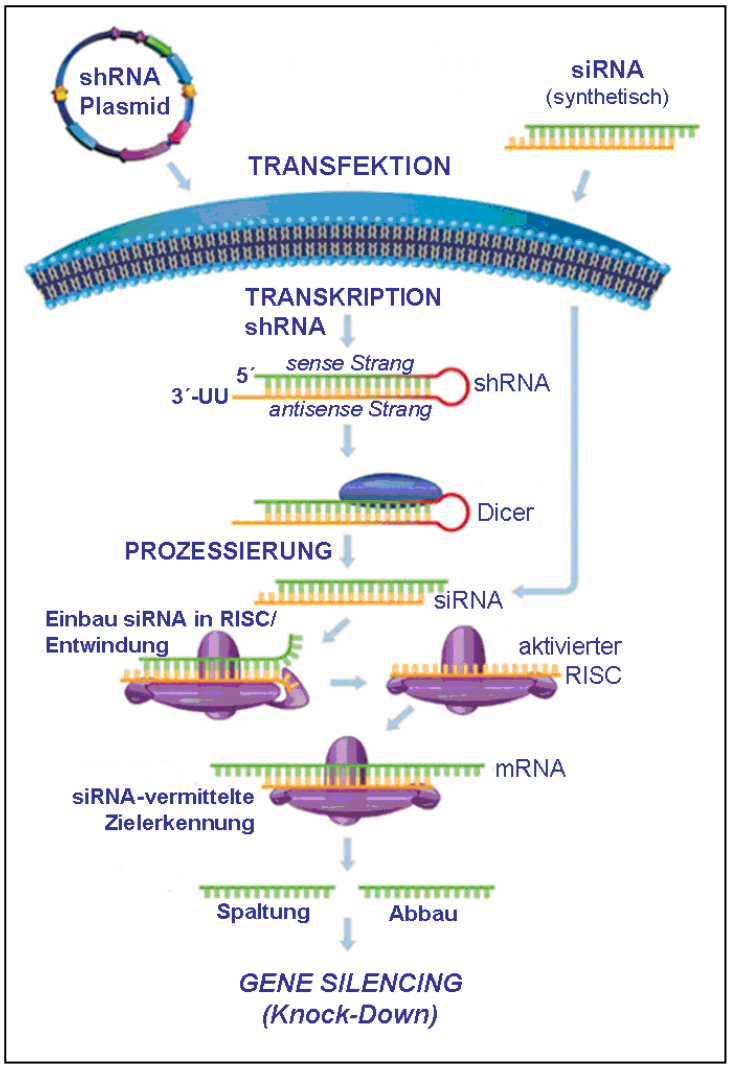


Abb. 5: shRNA- und siRNA-vermitteltes Gen-*Silencing*
[modifiziert nach *Next Generation RNA Interference*, in *Genetic Engineering & Biotechnology News* 2006, 26(4)]

2.2.2.1 Selektion von siRNA (*small interfering RNA*)-Sequenzen

Bei der Auswahl wirksamer siRNA wurden die von der Arbeitsgruppe Tuschl (Elbashir et al. 2001) publizierten Kriterien berücksichtigt. Die in Frage kommenden Sequenzen wurden mit humanen Sequenzen über Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) des NCBI-Servers verglichen, um eine Homologie zu anderen bekannten Genen auszuschließen. Die Herstellung der siRNA erfolgte durch die Fa. Sigma-Proligo.

2.2.2.2 Transienter *Knock-Down* mit synthetischen siRNA-Oligonukleotiden

Um die Effekte einer reduzierten *GNE*-Expression abschätzen zu können, wurden *Capan-1* Wildtypzellen transient mit synthetischen siRNA-Molekülen transfiziert. Für den Transfer wurde das speziell für die Transfektion von siRNA entwickelte *TransMessenger* Transfektionsreagenz der Fa. Qiagen eingesetzt.

24 Stunden vor der eigentlichen Behandlung wurden die adhärenten Zellen in einer Dichte von $7x10^4$ Zellen pro Vertiefung einer 6-Well Platte ausgesät, so dass zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von etwa 50-70% erreicht wurde. Es wurde jeweils 400ng siRNA nach Angaben des Herstellerprotokolls eingeschleust. Die Inkubation der Zellen mit den Transfektionskomplexen erfolgte über 7 Stunden im Brutschrank. Ein optimaler *Knock-Down* Effekt konnte erst durch eine weitere Transfektion 72 Stunden nach Einsaat der Zellen erzielt werden.
Die Quantifizierung der Hemmung auf mRNA-Ebene über qRT-PCR erfolgte 72 Stunden nach der letzten Behandlung; für die Analyse der Effekte auf Protein-/Phänotypebene (Anoikis-Test) wurden die Zellen zu diesem Zeitpunkt weitere 40 Stunden auf polyHEMA-beschichteten Platten (2.2.9.2) im Brutschrank inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch (Zellzyklusanalyse, 2.2.9.3) untersucht.

2.2.3 Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen

Die Gewinnung von Total-RNA erfolgte an einem speziell gesäuberten und ausgewiesenen RNA-Arbeitsplatz unter Verwendung von sterilem bzw. RNase-/DNase-freiem Einmalmaterial.

Die RNA-Isolierung wurde mit dem *RNeasy Mini Kit* und *QIAshredder*-Säulen (Qiagen) aus zuvor pelletierten Zellen bei Raumtemperatur durchgeführt, die extrahierte RNA widerum sofort auf Eis gekühlt.
Das Prinzip des *RNeasy Mini* RNA-Isolationssystems beruht auf der selektiven Bindung der RNA aufgeschlossener Zellen an eine Silikagel-Membran in Zentrifugationsröhrchen (Isolationssäulen), auf der die Nukleinsäure durch mehrere Waschschritte gereinigt und eluiert wird. Bei diesem Verfahren werden RNA-Moleküle, die kürzer als 200bp sind (damit auch stark fragmentierte RNA), ausgeschlossen.
Pro Extraktion wurden zwischen 1-$2x10^6$ Zellen eingesetzt. Diese wurden zunächst mit 350µl des mit β-Mercaptoethanol (Fluka Biochemica) komplettierten RLT-Lysispuffer aus dem Kit denaturiert und durch starkes Vortexen aufgeschlossen. Das erhaltene Lysat wurde über

QIAshredder-Zentrifugationssäulen homogenisiert. Die weitere Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers.
Alle RNA-Proben wurden mit RNase-freier DNaseI nach dem *RNase-Free DNase Set* (Qiagen)-Protokoll direkt auf der Isolationssäule behandelt, um eine mögliche Verunreinigung mit genomischer DNA zu eliminieren. Dazu wurden 10µl DNaseI-Stammlösung mit 70µl RDD-Puffer aus dem Kit versetzt. Die Elution der RNA erfolgte mit 40µl RNase-freiem Wasser.
Nach der Extraktion wurde die Konzentration der gelösten RNA mithilfe eines UV-Spektrophotometers (NanoDrop) bestimmt und die Integrität elektrophoretisch im Bioanalyzer (Agilent) überprüft. Bis zur experimentellen Verwendung wurde die RNA bei -80ºC gelagert.

2.2.4 Quantitative Nukleinsäureanalyse

Die Bestimmung der Konzentration der gereinigten Nukleinsäure erfolgte anhand der Messung der optischen Dichte (OD) mit dem NanoDrop®-ND-1000-Spektrophotometer (NanoDrop Technologies). Die RNA-Konzentration wird durch Absorptionsmesssung bei 260nm ermittelt. Dabei entspricht eine Absorptionseinheit (1OD) A_{260} 40µg RNA/ml. Zusätzlich gibt der Messwert bei 280nm einen Aufschluss über den Proteingehalt der Lösung. Der Absorptionsquotient A260/A280 stellt dementsprechend ein Maß für die Proteinverunreinigung der Nukleinsäureprobe dar.
Für die Experimente wurden ausschließlich reine RNA-Proben mit einem ermittelten Verhältnis zwischen 1,6 und 2,2 eingesetzt.

2.2.5 Evaluierung der RNA-Qualität

Die Integrität der gewonnenen RNA wurde mit dem *RNA 6000 Nano LabChip Kit* und den zugehörigen Reagenzien (Agilent) am 2100 Bioanalyzer determiniert. Die Beladung der Vertiefungen des Trägers mit Gelmatrix sowie den Proben erfolgte nach Herstellerangaben.
Basierend auf Kapillarelektrophorese werden die Pico-Green markierten Proben und der Standard von den vorgesehenen Vertiefungen aus durch die in die Glasoberfläche geätzten Mikrokapillaren im angelegten elektrischen Feld bewegt. An der sogenannten Trennkapillare (Abb. 6) erfolgt eine größenabhängige Auftrennung über die Gelpolymermatrix. Dabei registriert ein Fluoreszenzdetektor die RNA-Fragmente gemäß ihrer Laufzeiten.

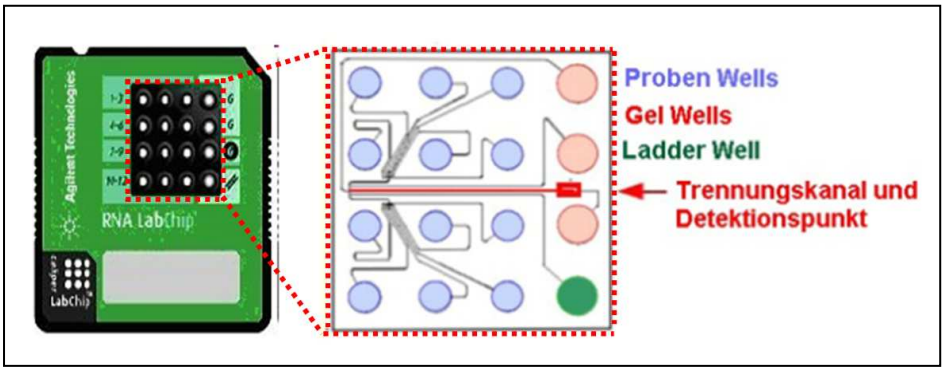


Abb. 6: Schema des Layouts des *Lab-On-A-Chip* (Agilent Bioanalyzer) Mikro-Kapillarkanalsystems

Aus den ermittelten Daten generiert die Bioanalyzer-Software (Agilent) sowohl Gel-ähnliche Bilder als auch Elektropherogramme (Abb. 7). Distinkte Peaks (Elektropherogramm) und Banden (Gel-ähnliche Darstellung), die die 18 und 28s RNA repräsentieren, dienen als primäre Indizien für eine gute Qualität der analysierten Probe. Zusätzlich erlaubt ein spezieller, in die Software integrierter Algorithmus die Ausgabe einer sogenannten *RNA Integrity Number* (RIN). Unter Bewertung des gesamten Kurvenverlaufs charakterisiert dieser Wert die Qualität der analysierten RNA bezüglich ihres Degradierungsgrades in einem Bereich zwischen 1 (vollständig degradiert) und 10 (hervorragende Qualität).

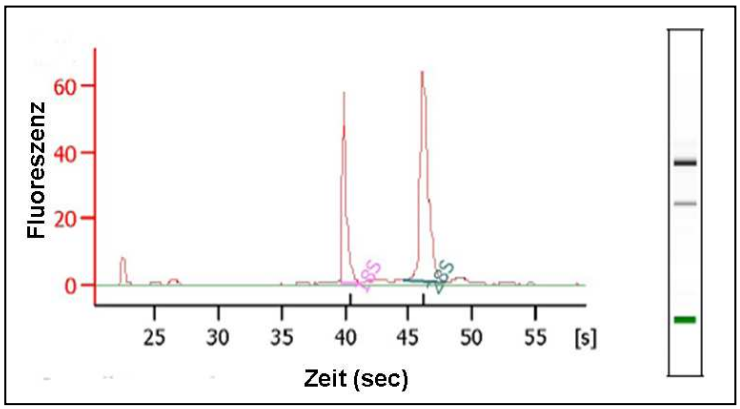


Abb. 7: Visualisierung der RNA-Qualität im Bioanalyzer durch die entsprechende Software als Elektropherogramm und in Gel-ähnlicher Darstellung Dargestellt ist die Messung einer RNA-Probe mit einem 28/18S-Verhältnis von 1,9 und einem RIN-Wert von 10,0.
[X-Achse Molekülgröße bzw. Laufzeit in sec; Y-Achse Fluoreszenz]

Da die Qualität der RNA für Microarray-Analysen von entscheidender Bedeutung ist, wurden für die Prozessierung (Amplifizierung und Fluoreszenzlabeling) ausschließlich Proben mit einem RIN zwischen 9 bis 10 eingesetzt.

2.2.6 Reverse Transkription (RT)

Bei der reversen Transkription handelt es sich um eine Methode, mit der RNA durch ein Enzym retroviralen Ursprungs – die reverse Transkriptase – in cDNA umgeschrieben wird. RNA ist unter physiologischen Bedingungen relativ instabil und kann durch die Aktivität ubiquitär vorkommender RNasen rasch abgebaut werden. Daher wurde die aus den Zellen gewonnene mRNA für die Expressionsanalyse mittels quantitativer *Real-Time* PCR (qRT-PCR) zunächst in koplementäre Erststrang-cDNA umgeschrieben. Die Reaktion wurde nach einer in der Arbeitsgruppe etablierten Arbeitsvorschrift durchgeführt.

Dazu wurden 500-3000ng einer RNA-Probe zunächst mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 23µl gebracht und mit 2µl eines Zufalls *(random)* Oligonukleotid Primer Hexamers (50µM) versetzt. Während einer 10-minütigen Inkubation bei 70ºC erfolgte die Denaturierung der RNA und das Anlagern der Primer. Im Anschluss wurden die Proben 10 Minuten auf Eis gelagert und ein Mastermix aus folgenden Komponenten hinzupipettiert:

10µl 5xRT-Puffer
5µl BSA (1mg/ml)
2,5µl dNTP-Mischung (dATP, dTTP, dGTP, dCTP ; 25mM)
1µl RNasin
2µl M-MLV Reverse Transkriptase
ad 25µl DEPC-Wasser

Diese Mischung wurde für eine Stunde bei 37ºC inkubiert (reverse Transkription). Im Anschluss daran wurde die Probe mit 100µl absolutem Ethanol versetzt und die DNA mindestens 30 Minuten bei -40ºC gefällt. Es folgte eine 20minütige Zentrifugation (15.000rpm) bei 4ºC. Nach einem Waschschritt mit 500µl 70%-igem Ethanol wurde die DNA getrocknet und schließlich in 50µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen. Die cDNA wurde bis zur weiteren Analyse bei -20ºC gelagert.

2.2.7 Quantitative *TaqMan Real-Time* RT-PCR (qRT-PCR)

Die *TaqMan* Technologie ist eine RT-PCR Methode, bei der das Produkt direkt durch ein Fluoreszenz-gelabeltes Oligonukleotid (Gensonde) markiert wird, das zu einem Teil der Zielsequenz komplementär ist.

Neben dem Reporterfarbstoff (VIC) am 5´-Ende ist 3´ ein nichtfluoreszierender Quencher (*Non-Fluorescent Quencher, NFQ*) an die Gensonde gebunden. Solange die Sonde intakt ist, unterdrückt der Quencher (engl. *to quench* abfangen, dämpfen) durch räumliche Nähe zum benachbarten Reporter dessen Fluoreszenz.

Während des PCR-Prozesses bindet die Sonde zwischen vorwärts- und rückwärts-gerichtetem Primer und wird bei der Synthese des Komplementärstranges zunächst verdrängt und letztlich durch die 5´-3´-Exonukleaseaktivität der *AmpliTaq* DNA-Polymerase abgebaut. Die dadurch resultierende räumliche Trennung von Reporterfarbstoff und Quencher führt zur Aussendung eines detektierbaren Fluoreszenzsignals durch den Reporter, das nach jedem PCR-Zyklus – quasi in Echtzeit (*Real-Time*) - festgehalten wird (Abb. 8).

Die Zunahme der Fluoreszenz mit der Zeit (40 Zyklen) in Bezug auf eine Referenzprobe (Kalibrator) ermöglicht schließlich eine quantitative Aussage über die Ausgangsmenge der untersuchten Transkripte.

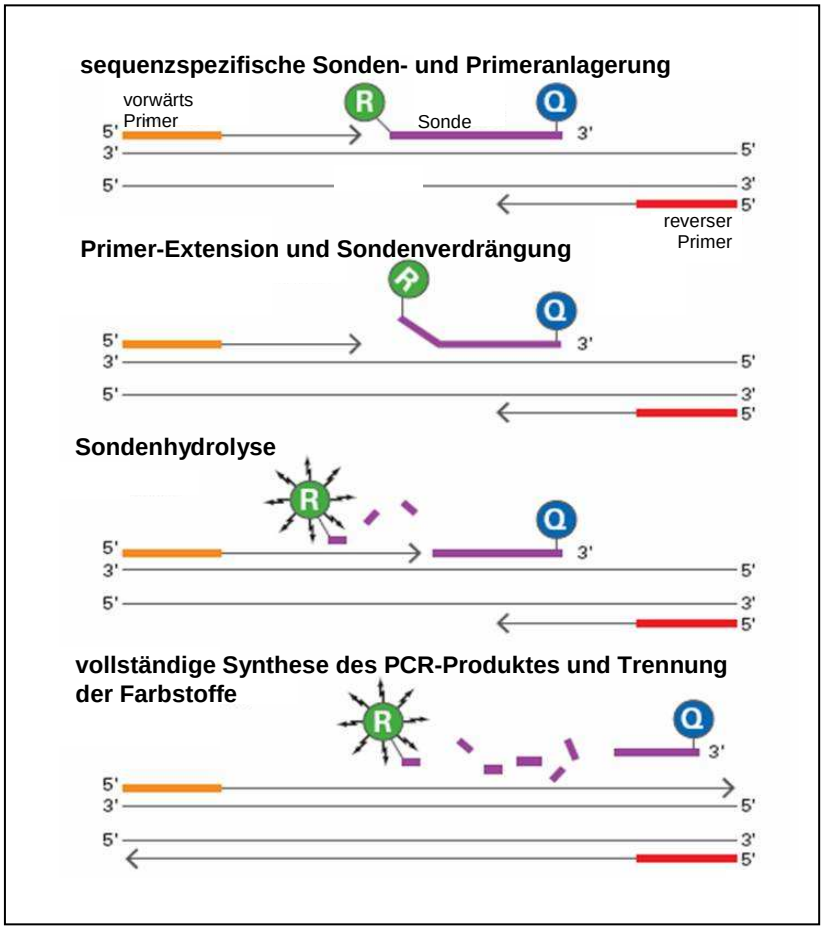


Abb. 8: Prinzip der *TaqMan*-PCR
[modifiziert nach Asuragen, Austin, USA; R=Reporter; Q=Quencher]

2.2.7.1 Durchführung der qRT-PCR

Die *TaqMan* PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung von vorgefertigten, genspezifischen Primer-Sonden-Gemischen – sogenannten „Assays on Demand“ (AoD) – und unter Verwendung eines *TaqMan*-Mastermixes (*TaqMan Universal PCR Master Mix*, Applied Biosystems) am *ABI Prism 7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems) durchgeführt. Der PCR-Mastermix beinhaltet neben der *AmpliTaq* Gold DNA-Polymerase unterschiedliche Puffer für die PCR-Reaktion, einen dNTP-Mix (dUTP statt dTTP) und den Farbstoff ROX, der als passive Referenz zur Fluoreszenzberechnung dient.
Als endogene Kontrolle wurde humanes β-Aktin eingesetzt. Diese dient bei der relativen Quantifizierung als aktive Referenz, um Unterschiede an eingesetzter cDNA zu normalisieren.

Der Reaktionsansatz für die qRT-PCR setzt sich wie folgt zusammen und wurde jeweils als Triplikat ausgeführt:

Reagenzien	Menge
2xTaqMan® Universal PCR Master Mix	5,0µl
20 x AoD/β-Aktin	0,5µl
DEPC-Wasser	ad 10µl

Die cDNA wurde bereits einen Tag vor der Analyse in die Platte (50ng/Well) pipettiert und über Nacht getrocknet. Vor der Messung wurden die 384-Well PCR-Platten mit 10µl Reagenzienmischung pro Vertiefung befüllt und mit selbstklebender Folie überzogen, kurz abzentrifugiert und die PCR-Reaktion unter den in Tabelle 1 aufgeführten Bedingungen durchgeführt.

Tab. 1: Reaktionsbedingungen der *TaqMan*-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	
AmpliTaq Gold Enzymaktivierung	95ºC	10min	
Denaturierung	95ºC	15sec	40x
Annealing, Elongation (Synthese)	60ºC	1min	

2.2.7.2 Auswertung der qRT-PCR ($\Delta\Delta C_T$-Methode)

Zur Auswertung der *TaqMan*-PCR wurde die *Sequence Detection Software SDS* (Version 2.2; Applied Biosystems) verwendet, die eine Visualisierung der detektierten PCR-Signale in Form von Amplifizierungsgraphen ermöglicht. Anhand der Darstellung wurde zunächst ein Signalschwellenwert für die einzelnen Proben festgelegt, der im exponentiellen Bereich der Kurven liegen sollte.

Die eigentliche Analyse der Daten erfolgte auf Basis der $\Delta\Delta C_T$-Methode. Dabei definiert der C_T-Wert den PCR-Zyklus (*CT,* engl. *threshold cycle* Schwellenwert Zyklus), bei dem das Fluoreszenzsignal der jeweiligen Probe den Schwellenwert signifikant übersteigt.

Die Normalisierung wurde als delta-C_T zunächst auf die endogene Kontrolle (C_T-Wert Probe minus C_T-Wert endogene Kontrolle, hier β-Aktin), bei der $\Delta\Delta C_T$-Berechnung schließlich auf die Kalibratorprobe (delta-C_T Probe minus delta-C_T Kalibratorprobe) bezogen. Die Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ gibt den relativen Expressionsunterschied der Probe in Bezug auf den Kalibrator wider.

2.2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Ermittlung des Gesamtproteingehalts eines Zelllysats wurde der sog. BCA-Test nach Pierce angewendet. Der Nachweis beruht auf der Komplexierung von Proteinen mit Cu^{2+} in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion). Die komplexierten Cu^{2+}-Ionen werden zu Cu^{+} reduziert, die mit Bicinchinonsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden. Die Absorption dieses Komplexes kann bei 660nm detektiert werden. Als Proteinstandard diente bovines Kälberserum in unterschiedlichen Konzentrationen (0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1,0 und 2,0 mg/ml).

Gemäß den Empfehlungen des Herstellers wurden jeweils 10µl der zu untersuchenden Proteinprobe (Zelllysat) und der Standardproben mit 150µl BCA-Reagenz (Pierce, Rockford, USA) durch Vortexen (1min) gemischt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich erfolgte die Messung der Absorption (ELISA-Reader). Der Proteingehalt der Probe ergibt sich aus dem Vergleich der ermittelten Extinktion mit der aus den Standardwerten erstellten Eichgeraden.

2.2.9 *In vitro* Assays zur Untersuchung der Genfunktion

2.2.9.1 Untersuchung der DNA-Methylierung

Durch Promotor-Hypermethylierung inaktivierte Gene können durch den DNA-Methyltransferase Inhibitor *5-Aza-2´-Deoxycytidin* (*5-Aza-dC*) reaktiviert werden. Bei *5-Aza-dC* handelt es sich um ein Cytidin-Analogon, das anstelle des natürlichen Nukleosids in sich teilende DNA eingebaut wird. Grundlegende strukturelle Unterschiede zum Cytosin verhindern die weitere Übertragung von Methylgruppen durch das Enzym DNA-Methyltransferase 1. Die daraus resultierende Hypomethylierung der Nukleinsäure im Promotorbereich führt zur Chromatinrelaxierung und ermöglicht die Bindung von Transkriptionsfaktoren.

Für die Analyse wurden $6x10^4$ Zellen pro Vertiefung einer 6-Well Platte eingesät und nach jeweils 24 Stunden 5 Tage lang unterschiedlichen Konzentrationen (1 bzw. 5µM) von *5-Aza-dC* ausgesetzt. Die Quantifizierung des Einflusses von Methylierung auf die Genexpression erfolgte nach RNA-Extraktion aus den behandelten Zellen und reverser Transkription in cDNA via quantitativer *Real-Time* PCR.

2.2.9.2 PolyHEMA Assay (Anoikis-Test)

Eine gezielte Unterbrechung des Zell-Matrix-Kontakts bildet die Voraussetzung dafür, Anoikis-positive von Anoikis-negativen Zellen in Suspension zu identifizieren (Kozlova et al. 2001). Der polyHEMA Assay ermöglicht die Untersuchung transformierter Zellen, die unabhängig von Verankerung an das Substrat wachsen (Fukazawa et al. 1995). *In vitro* kann der Verlust der Adhäsion eukaryotischer Zellen an die extrazelluläre Matrix durch die Beschichtung von Kulturplatten mit dem nichtionischen (unpolaren) Agens polyHEMA simuliert werden. Adhärente Zellen werden normalerweise auf aufgerauter, negativ geladener Kunststoffware kultiviert.

Beschichtung der Platten:
10g polyHEMA (Poly-2-Hydroxyethyl-Methacrylat) wurden in 1l absolutem Ethanol unter leichtem Erwärmen (30-40ºC) gelöst und bei 37ºC im Dunkeln gelagert. Die für die Anoikis-Ermittlung eingesetzten 6-Well Zellkulturplatten wurden mit jeweils 3ml polyHEMA-Lösung pro Vertiefung beschichtet und in einem Trockeninkubator bei 37ºC getrocknet.

Für den eigentlichen Test wurden $1x10^5$ Zellen pro Well in 2ml Komplettmedium in die beschichteten Platten ausgesät. Nach 40-stündiger Inkubation im Brutschrank erfolgte die Apoptosedetektion im Durchflusszytometer (Zellzyklusanalyse, 2.2.9.3).

2.2.9.3 FACS-Analyse Apoptose-assoziierter DNA-Fragmentierung: Bestimmung des Zellzyklusprofils (Zellzyklusanalyse)

Ein wichtiges Merkmal apoptotischer Zellen ist das Auftreten von Nukleusfragmentierung sowie DNA-Degradierung, die Folgen der Aktivierung endogener Nukleasen im Verlauf des programmierten Zelltods sind.
Die FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)-Analyse ermöglicht die Detektion von Zellen bzw. Bestimmung ihres DNA-Gehalts über Fluoreszenzmarkierung. Markierte Zellen werden in diesem System mit Laserlicht angeregt und die emittierte Fluoreszenz ermittelt.
In Anlehnung an die von Nicoletti 1991 beschriebene Methode wird dazu die DNA zunächst durch Einlagerung von Propodiumiodid spezifisch gefärbt und im Durchflusszytometer quantifiziert (Emissionsmaximum 617nm). Auf diese Weise ist es möglich, entsprechend der DNA-Menge den Anteil der Zellen in der jeweiligen Zyklusphase zu determinieren und gleichsam den Anteil apoptotischer Zellen zu erfassen. Apoptotische Zellen weisen einen DNA-Gehalt auf, der noch unter dem von ruhenden Zellen (G0) bzw. von Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus liegt (sog. „sub-G1"-Phase). Die gemessenen Werte werden an einen Computer übermittelt und mithilfe entsprechender Software (*CellQuest*) in Form von Histogrammen visualisiert. Apoptotische Kerne erscheinen als breiter, hypodiploider DNA-Peak, der leicht von dem DNA-Doppelpeak nicht-apoptotischer Zellen mit diploidem (und tetraploidem) DNA-Gehalt unterschieden werden kann (Abb. 9).

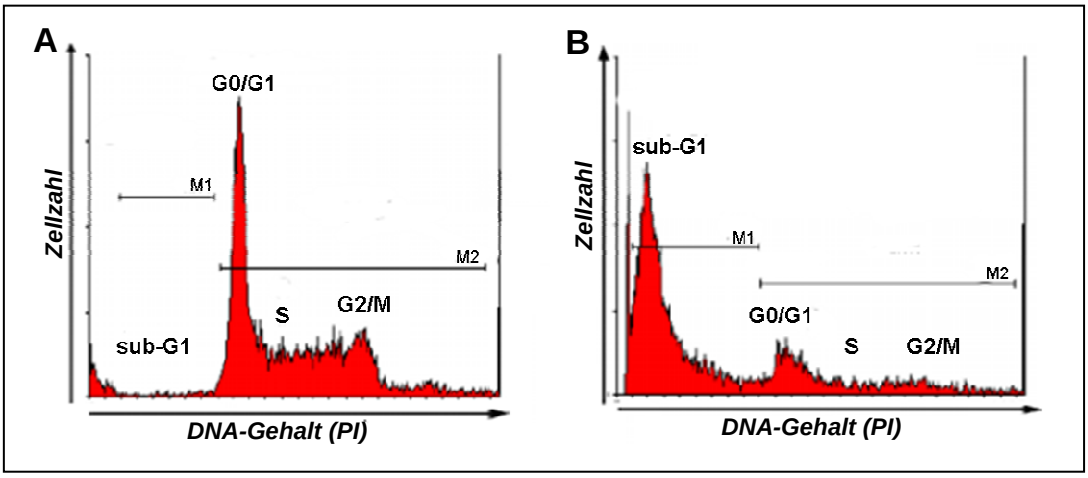


Abb. 9: Darstellung des Zellzyklusprofils über FACS-Analyse. A: Typisches DNA-Histogramm der FACS-Analyse nach PI-Markierung. **B**: Deutlicher Anstieg der sub-G1-Population in apoptotischen Zellen.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die zu untersuchenden Zellen 5min bei 1500rpm zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 900µl PBS resuspendiert. Durch mehrfaches Aspirieren über eine Multipipette mit aufgesetzter 10µl Spitze konnte eine Einzelzellsuspension generiert werden. Unter permantem Vortexen wurde im Anschluss dreimal tropfenweise 700µl eiskaltes, absolutes Ethanol zugegeben. Vor weiterer Prozessierung mussten die Proben mindestens 30min bei -20ºC lagern. Danach wurden die Zellen 5min bei 1500rpm zentrifugiert, mit 1ml PBS gewaschen und mit 500µl PI-Färbelösung 30min im Dunkeln bei 37ºC inkubiert.
Anschließend erfolgte die Bestimmung des Zellzyklusprofils auf Basis des DNA-Gehalts im *FACScalibur* Durchflusszytometer (Becton Dickinson). Dazu wurden jeweils $1x10^4$ Zellen untersucht. Über die zugehörige Software *CellQuest* konnte anhand der ausgegebenen Histogramme eine prozentuale Aussage über die Anoikisrate gemacht werden. Diese ergibt sich aus der Relation der Apoptose-relevanten Fraktion in Bezug zu einer Negativkontroll-Probe.

2.2.10 Glykananalytische Methoden: Charakterisierung von Sialinsäuren

2.2.10.1 Desialylierung durch Neuraminidase-Verdau

Neuraminidasen sind eine Gruppe von Enzymen, die die Abspaltung terminaler Sialinsäuren von Glykoproteinen katalysieren.
Für den Nachweis des Anteils membrangebundener Sialinsäure wurde eine Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* eingesetzt. Pro Ansatz wurden $1x10^6$ Zellen, die sich optimalerweise in der logarithmischen Wachstumsphase befinden sollten, mit 100mU Sialidase (in DMEM, pH 6,8) für 20min bei 37ºC inkubiert. Der Kulturüberstand enthält nach dieser Behandlung die abgelöste Sialinäure.

2.2.10.2 Fluorimetrische Sialinsäurebestimmung mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Glykanstrukturen bzw. ihre Bestandteile können über Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie – kurz HPLC - charakterisiert werden. Dabei handelt es sich um ein chromatographisches Verfahren zur Auftrennung und Analyse von Stoffgemischen basierend auf Säulenchromatographie. Das Auftrennungsprinzip gleicht anderen Chromatographietechniken: die zu analysierende, flüssige Probe (mobile Phase) wird unter

konstanten Bedingungen durch eine Säule (stationäre Phase) befördert. Dabei wechselwirken die Probenkomponenten in unterschiedlichem Ausmaß mit dem Säulenmaterial. Beim Austritt aus der Säule werden die einzelnen Stoffe mithilfe eines geeigneten Detektors nachgewiesen.

Das in vorliegender Arbeit angewendete Verfahren beruht auf der Umsetzung des Neuraminsäureanteils der zu untersuchenden Probe mit 1,2-Diamino-4,5-Methylendioxybenzol (DMB) zu einem fluoreszierenden Derivat (Hara et al. 1987), das flüssigkeitschromatographisch detektiert werden kann. Mit dieser Methode können sowohl Sialinsäuren als auch andere 2-Ketosäuren markiert und quantifiziert werden.

Zur Ermittlung der Sialinsäuremenge wurde der membranständige Neu5Ac-Anteil zunächst mittels Neuraminidasebehandlung enzymatisch von der Zelloberfläche abgetrennt. Nach Zentrifugieren für 4min bei 1100rpm erfolgte die Fluoreszenzmarkierung. Für diesen Schritt wurden 50µl Neuraminsäure-haltiger Überstand 2,5h im Dunkeln mit 2µl 1,25M H_2SO_4, 48µl A.d. und 100µl DMB-Lösung auf 60ºC erwärmt. Die Reaktion wurde im Anschluss durch eine zweiminütige Inkubation auf Eis gestoppt. Von entstandener Mischung wurden anschließend 10µl auf ein HPLC-Trennungssystem aufgetragen, das mit einer RP-C18-Säule (*Lichrospher 100*, Partikelgröße 5µm, 0,4cm Innendurchmesser) ausgestattet war. Für die isokratische Auftrennung wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Methanol und Acetonitril in A.d. im Verhältnis 7:9:84 (v/v/v) verwendet und eine konstante Flussrate von 1ml/min eingestellt. Die fluoreszierenden DMB-Sialinsäure-Derivate konnten über ein Durchfluss-Fluoreszenzspektralphotometer bei einer Anregungswellenlänge von 373nm und Emissionswellenlänge von 448nm nachgewiesen werden. Über das angeschlossene Datenverarbeitungssystem (*LabSolutions LCsolution*, Version 1.03, Fa. Shimadzu) war die simultane Datenanalyse möglich. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch den Vergleich mit einer *N*-Acetylneuraminsäure-Referenz. Die bekannte Konzentration dieses Standards und die gemessene Peakhöhe der Probe mit unbekannter Sialinsäuremenge wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt, so dass über Anwendung der Dreisatzmethode der Sialinsäureanteil der analysierten Probe in Bezug zum Gesamtproteingehalt (BCA-Methode nach Pierce, 2.2.8) der Zellen bestimmt werden konnte.

2.2.10.3 Spezifische Detektion von Sialinsäure über FACS-Analyse (Lektin-FACS)

Für die Analyse der globalen Sialylierung membranständiger Glykokonjugate im Allgemeinen sowie zur Untersuchung des Vorkommens bestimmter terminaler Sialinsäureformen im Speziellen wurden die Zellen durchflusszytometrisch im FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)-Gerät (Fa. BD Biosciences) gemessen.

Die FACS-Methode beruht auf der Isolierung und Erkennung einzelner Zellen einer Zellpopulation auf Basis unterschiedlicher Parameter, wie Größe, Granularität oder Oberflächeneigenschaften. Die zu untersuchenden Zellen werden dafür meist mit einem Antikörper inkubiert, der gegen ein spezifisches Antigen gerichtet ist. Dieser Antikörper kann entweder direkt oder indirekt über einen Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper nachgewiesen werden. Für die Sialinsäuredetektion wurden Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Lektine eingesetzt. Dabei handelt es sich um komplexe, ubiquitäre Proteine, die spezifisch Kohlenhydratstrukturen erkennen und binden.
Im Durchflusszytometer werden die markierten Zellen von einem Laserstrahl erfasst, wodurch es zur Anregung des gebundenen Farbstoffs kommt. Die daraus resultierende Lichtemission einer bestimmten Wellenlänge ermöglicht die Charakterisierung von mehreren Tausend Zellen eines Probenstromes von Einzelzellen, der innerhalb kürzester Zeit am Argonlaser vorbeigeleitet wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit den Lektinen PNA (*Peanut* Agglutinin) und SNA (*Sambucus nigra* Agglutinin), die mit dem Fluorochrom Fluorescein (FITC) konjugiert sind, gearbeitet. PNA ist ein aus der Erdnuss isoliertes Glykoprotein, das bevorzugt an Galaktosyl (β-1,3) *N*-Acetylgalaktosamin bindet. Dabei handelt es sich um eine ubiquitäre Struktur (sog. „T-Antigen“) membranständiger Glykoproteine und –lipide. Die Assoziation von PNA mit diesem Oberflächenrezeptor wird durch Sialinsäurepräsentierung verhindert. Im Gegensatz dazu reagiert SNA, ein aus der Holunderbeere gewonnenes Lektin, mit endständiger Sialinsäure, die terminal an Galaktose (in α-2,6- bzw. α-2,3-Bindung) gebunden ist.

Pro Messung wurden etwa $1x10^6$ Zellen zunächst zentrifugiert (4min bei 1100rpm), einmal mit HBSS (ohne Phenolrot) und FACS-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde anschließend mit 50µl Lektinlösung (PNA 12,5µg/ml, SNA 40µg/ml) versetzt, vorsichtig gemischt und eine Stunde gekühlt (4ºC) im Dunkeln inkubiert. Ungebundene Lektine wurden durch zweimaliges Waschen mit HBSS entfernt, die Zellen in 500µl FACS-Puffer aufgenommen und die Fluoreszenz der markierten Zellen im FACS-Gerät gemessen.

2.2.11 Microarray-basierte Genexpressionsuntersuchung

Bei der Microarray-Technologie handelt es sich um ein Hochdurchsatzverfahren, das die simultane Erfassung der Expression mehrerer Tausend Gene ermöglicht und auf Basis dieser Daten ein umfassendes Expressionsprofil erstellbar macht. Das grundlegende Prinzip beruht auf der Hybridisierung von markierten Nukleinsäuremolekülen an komplementäre, genspezifische Sequenzen, die auf der Oberfläche eines Arrays immobilisiert vorliegen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden kommerziell erhältliche *GeneChips* (*Human Genome U133 Plus 2.0, Human Gene 1.0 ST*) der Fa. Affymetrix eingesetzt.

2.2.11.1 Analyse auf Affymetrix *GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0*

Für die genomweite Expressionsuntersuchung von *Capan-1* Wildtypzellen und Transfektanden kam bei vorliegender Arbeit der *Human Genome U133* Array der Fa. Affymetrix zum Einsatz. Dieses Format erlaubt die Analyse von mehr als 38.000 humaner Gene, die durch über 47.000 Transkripte abgebildet werden. Jedes Gen ist durch ein oder mehrere 25-mere Oligonukleotid-Sonden (sog. *Probe Sets*) repräsentiert, deren Sequenz von einem 300-600bp langen Bereich am 3´-Ende des Transkripts abgeleitet ist. Die *Probe Sets* ihrerseits bestehen aus 11-20 verschiedenen Sondenpaaren *(Probe Pair)*, bei denen jeweils sog. *Perfect Match* (PM)- und *Mismatch* (MM)-Oligonukleotide kombiniert werden. Letztere weisen einen Basenaustausch in der Mitte der Sequenz auf und dienen der Abschätzung unspezifischer Interaktionen zwischen Probe und Chip (z.B. durch Kreuzhybridisierung).

Die Gesamt-RNA wurde entsprechend des von Affymetrix vorgegebenen *One-Cycle* Protokolls in biotinylierte cRNA umgeschrieben. Ausgehend von 1µg RNA erfolgte zunächst eine reverse Transkription mithilfe des Enzyms SuperScript II unter Einsatz von T7-Oligo(dT)-Primern. Im nachfolgenden Schritt konnte die RNA-Matrize durch RNase H entfernt und der komplementäre cDNA-Strang durch DNA-Polymerase I und DNA-Ligase synthetisiert werden. Nach Aufreinigung der vorliegenden doppelsträngigen cDNA wurde diese mittels T7-Polymerase *in vitro* transkribiert (lineare Amplifikation) und in Anwesenheit Biotin-markierter Nukleotide gelabelt.
Die resultierende Biotin-markierte *antisense*-cRNA wurde mit dem Aufreinigungsmodul des Affymetrix-Systems (*GeneChip Sample Cleanup Module*) gereinigt, in 10µl DEPC-Wasser eluiert und spektrometrisch (NanoDrop) quantifiziert. Schließlich wurde die Nukleinsäure

mithilfe des im Kit enthaltenen Fragmentierungspuffers in 20-40 Nukleotide lange Stücke zerkleinert sowie die erhaltenen Fragmentgrößen elektrophoretisch (Bioanalyzer) bestimmt.

2.2.11.2 Analyse auf Affymetrix *GeneChip® Human Gene 1.0 ST*

Das *GeneChip Gene 1.0 ST* Format von Affymetrix bildet mehr als 28.000 Gene ab, die jeweils über durchschnittlich 26 Oligonukleotid-Sonden (25-mere) repräsentiert sind.
Die wesentlichen Unterschiede des *ST*-Genchips zum *U133*-Array liegen im *Probe Pair*-Design und in der genomischen Lokalisierung der Sonden. Beim *ST*-Format bestehen die *Probe Sets* nur aus *Perfect Match* Sonden. Eine generelle Determinierung unspezifischer Hintergrundsignale erfolgt hier nicht über *Mismatch*-Oligonukleotide, sondern über einen Satz von etwa 20.000 sogenannter „Background"-Sonden, die auf den Chip aufgebracht sind. Die Sonden selbst decken im Gegensatz zum 3´-basierenden *U133*-Arraydesign den gesamten Genbereich ab, so dass ein realistischeres Bild der Expression widergegeben werden kann.

Ausgehend von 300ng RNA erfolgte gemäß der Herstelleranleitung (*100ng Total RNA Labeling Protocol)* die Synthese von biotinylierter cDNA (*sense*-Orientierung). In Übereinstimmung mit dem *One-Cycle* Protokoll des *U133*-Microarrays wurde nach reverser Transkription und Zweitstrang-Synthese die vorliegende doppelsträngige cDNA *in vitro* in cRNA transkribiert. Allerdings wurde nach dem Reinigungsschritt (*GeneChip Sample Cleanup Module*) und der Konzentrationsbestimmung im NanoDrop ein weiterer Amplifizierungsschritt eingebaut, der die cRNA mithilfe von SuperScript II reverser Transkriptase in cDNA umschreibt. Letztendlich liegt nach Hydrolyse der cRNA (RNase H-Behandlung) und Reinigung einzelsträngige cDNA in *sense*-Orientierung vor. Diese wurde schließlich spektrophotometrisch quantifiziert (NanoDrop), Biotin-gelabelt und fragmentiert.

2.2.11.3 Präprozessierung der Affymetrix-Microarrays

Hybridisierung

Die Hybridisierung von jeweils 15µg fragmentierter cRNA bzw. cDNA auf Humangenom *U133* Genchips bzw. *ST*-Arrays und die nachfolgende Verarbeitung (Waschen, Färben mit Streptavidin-Phycoerythrin, Scannen, Aufzeichnung der Daten) wurde als Dienstleistung von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Norbert Hübner (MDC) übernommen.

Analyse und statistische Evaluierung der Chipdaten

Die Verarbeitung der Microarray-Rohdaten zur statistischen Analyse besteht vorrangig aus zwei zentralen Elementen: der Korrektur unspezifischer Hintergrundsignale und der Normalisierung.

Zunächst wurden die bei der Datenextraktion gewonnenen Dateien, die im *CEL*-Format ausgegeben werden, in die Software *GeneSpring GX* (Version 10.0; Agilent) importiert. *GeneSpring* bietet unterschiedliche Hintergrundkorrektur- bzw. Normalisierungsmethoden an, die generell dem Ausgleich der technischen Varianz der Experimente dienen.

Bei vorliegender Untersuchung wurde der sog. *GC-RMA*-Algorithmus (*GC-Robust Multi-Array Averaging*; Wu et al. 2004) verwendet, der als robuste Methode für die Multichip-Analyse standardmäßig für die Affymetrix-Arrays Anwendung findet. Die Hintergrundkorrektur über die *GC-RMA*-Methode berücksichtigt die unspezifischen Signale, die auf der unterschiedlichen Basensequenz (GC-Gehalt) der einzelnen Sonden basieren. Die korrigierten Signale der unterschiedlichen Arrays werden schließlich unter Verwendung der Quantilnormalisierung auf ein einheitliches Niveau gebracht und die generierten Daten in logarithmischer Form ausgegeben.

Von erheblicher Bedeutung bei der Analyse von Microarray-Daten stellt die Überprüfung der Qualität des Experiments dar, da bereits ein minderwertiger Chip die Ergebnisse erheblich beeinflussen kann (Heber et al. 2006). Der Grad des linearen, positiven Zusammenhangs der einzelnen Chipversuche kann über Berechnung des Pearson Korrelationskoeffizienten r auf Basis der normalisierten Signalwerte abgeleitet werden. Unter der Annahme, dass ab einem Wert von 0,8 eine sehr hohe Korrelation und bei 1,0 ein vollständig positiver Zusammenhang zwischen den Daten besteht, sollten Chips mit $r \leq 0{,}8$ von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Die Visualisierung der Korrelationskoeffizienten, die über den paarweisen Vergleich der Chips untereinander ermittelt wurden, erfolgte als Heatmap.

Die statistische Signifikanz der differenziellen Expression der einzelnen Gene wurde über den Welch-Test ermittelt. Im Gegensatz zum herkömmlichen *t*-Test wird dieser unter der Annahme angewendet, dass die Varianz zwischen den Gruppen unterschiedlich groß sein kann. Um die Anzahl „falsch positiver“ Ereignisse zu minimieren, die die *t*-Test Kriterien bestehen könnten, wurden die *p*-Werte, wenn möglich, mit der sog. *False Discovery Rate* (FDR) nach Benjamini und Hochberg (1995) korrigiert.

3. Ergebnisse

3.1 Globale Expressionsanalyse Sialylierungs-relevanter Gene in P16- und Mock-Transfektanden der Pankreaskarzinom-Zelllinie *Capan-1*

Differenzielle Sialylierung ist eng verknüpft mit Metastasierung und Invasion von Tumorzellen (Uemura et al. 2009). Aufgrund der exponierten terminalen Position auf Glykokonjugaten der Zellmembran und ihrer biochemischen Eigenschaften vermitteln Sialinsäuren charakteristische Merkmale. Der Einfluss eines veränderten Sialinsäuremusters auf die Adhäsion und Migration von Zellen wurde bereits beschrieben und scheint direkt mit der Überlebensfähigkeit einer Tumorzelle zu korrelieren (Zhuo et al. 2008).
In diesem Zusammenhang wurde zunächst untersucht, welche transkriptionellen Veränderungen im Hinblick auf den Sialinsäuremetabolismus *in vitro* für die Ausprägung des Anoikis-Phänotyps bedeutend sein könnten. Dazu wurde das differenzielle Genprofil Apoptose-resistenter Mock (*Capan-1/-p16/-Anoikis*)- und Anoikis-sensibler P16-Transfektanden (*Capan-1/+p16/+Anoikis*) der humanen Pankreaskarzinom-Zelllinie *Capan-1* über eine globale Microarray-Analyse mittels Affymetrix *GeneChips*® ermittelt. Wie Andre et al. (2007) bereits zeigen konnten, ist die stabile Expression des Tumorsuppressors $p16^{INK4a}$ in diesen Zellen mit bedeutenden Veränderungen auf Glykosylierungs- und Sialylierungsebene verbunden.

Ein grundlegendes Problem der Microarray-Analyse stellt häufig die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und damit die Spezifität der biologischen Aussagekraft der Experimente dar (Shi et al. 2008). Daher wurde für das Screening zur Identifizierung valider, Anoikis-assoziierter Marker eine erweiterte Strategie angewendet. Durch die Kombination zweier unabhängiger Technologien von Affymetrix sollten besonders robuste Kandidatengene gefunden werden. Auf dieser Basis wurden die Transkriptionsdifferenzen in *Capan-1* Transfektanden sowohl über *U133*-Microarrays als auch über die neuere Chipgeneration *Human Gene 1.0 ST* untersucht und verglichen. Der Hauptunterschied dieser beiden Plattformen beruht vornehmlich in der Art der gebundenen Sonden und der zu hybridisierenden Proben. Im Vergleich zu den 3´-basierenden *U133*-Arrays decken die 25-mere, die auf den *ST*-Chip aufgebracht sind, den gesamten Transkriptbereich ab. Außerdem werden für die Hybridisierung auf *ST*-Arrays *sense*-cDNA-Targets generiert, während auf den herkömmlichen *U133*-Chip *antisense*-cRNA appliziert wird.
Die Amplifizierungs- und Labelingprotokolle der verwendeten Affymetrix-Technologien basieren auf der reversen Transkription der Ausgangs-RNA in cDNA, die anschließend in *antisense*-cRNA *in vitro* transkribiert wird. Das Proben-Prozessierungsprotokoll des *ST*-

Arrays sieht außerdem einen zusätzlichen Amplifizierungsschritt vor. Zunächst wird die synthetisierte cRNA nochmals in cDNA umgeschrieben. Nach enzymatischem Abbau des Zweitstranges entsteht als Endprodukt einzelsträngige cDNA in *sense* Orientierung. Die Details der einzelnen Protokolle sind den Punkten 2.2.11.1 für den *U133-GeneChip* bzw. 2.2.11.2 für den *ST-GeneChip* des Methodenteils zu entnehmen.

Für die Untersuchung wurde amplifizierte, Biotin-markierte Nukleinsäure aus unterschiedlichen Zellkulturchargen hybridisiert, mit Streptavidin-Phycoerythrin gefärbt und die Fluoreszenzsignale nach dem Scanvorgang über entsprechende Software (*GeneChip® Operating Software*) extrahiert. Die ausgegebene Datei – das sog. „CEL-File“ – wurde für die weitere Datenverarbeitung und statistische Auswertung mithilfe der Analysesoftware *GeneSpring GX* genutzt. Insgesamt wurden jeweils zwei Chips von Kontrolltransfektanden (Mock) und *Capan-1*/+P16 Zellen über die beiden unterschiedlichen Plattformen analysiert.

3.1.1 Qualitätskontrolle der Microarray-Daten

Die Beurteilung der Qualität bzw. Reproduzierbarkeit der Microarray-Experimente erfolgte auf Grundlage der Korrelation der normalisierten Daten. Ein robustes Maß für den Grad des Zusammenhangs der einzelnen *GeneChips* lieferte die Ermittlung des Pearson Korrelationskoeffizienten *(r)*. Dieser wurde über den paarweisen Vergleich der einzelnen Arrays berechnet und bewegte sich in einem Bereich zwischen 0,9 und 1,0. Dabei lag der Mittelwert für die *U133*-Arrays bei r=0,92 und für die *ST*-Arrays bei r=0,94. Unter der Annahme hoher Reproduzierbarkeit im Bereich von 0,8 bis 1,0 korrelieren alle Chips besonders gut. Abbildung 10 visualisiert die berechneten Korrelationskoeffizienten für jedes analysierte *U133*- (Abb. 10A) bzw. *ST*-Chippaar (Abb. 10B) in Form eines sog. Korrelationsplots (Heatmap). Der Farbcode gibt die Stärke der jeweiligen Korrelation wider. Insgesamt lässt sich eine positiv lineare Übereinstimmung innerhalb der Gruppen Mock und P16 erkennen.

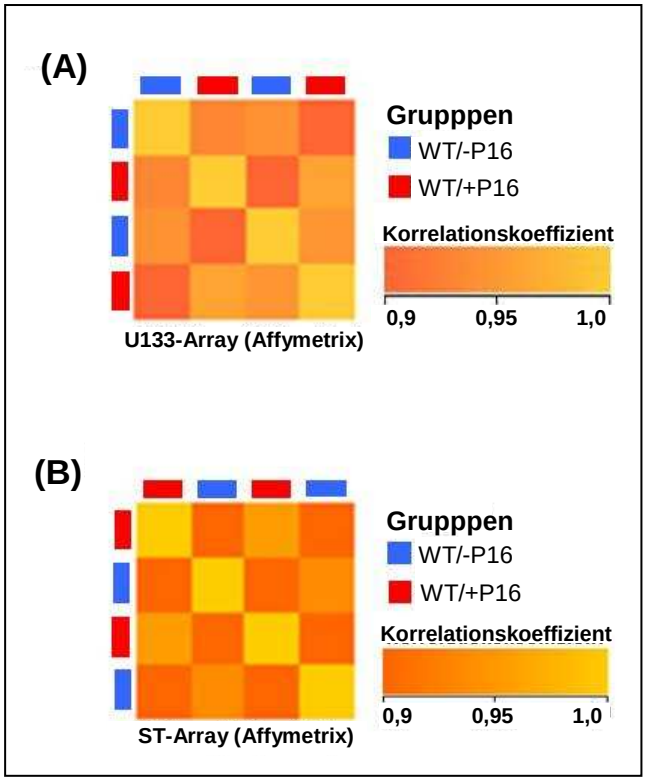


Abb. 10: Visualisierung der Qualität der humanen Affymetrix *GeneChips* für die *in vitro* Expressionsstudie von *Capan-1*/Mock- und P16-Transfektanden auf jeweils zwei *U133* (A)- und *ST*-Arrays (B), dargestellt als Heatmap (Korrelationsplot) Auf Basis der Pearson-Korrelation wurde für jeden *GeneChip* zu allen anderen Chips der jeweilige Korrelationskoeffizient ermittelt, der anhand der Farbskala im Korrelationsplot (Heatmap) widergegeben wird. Zur Unterscheidung der verglichenen Gruppen wurden Mock (WT/-P16)- und P16 (WT/+P16)-transfizierten *Capan-1* Zellen bestimmte Farben zugeteilt.
[blau=*Capan-1*/Mock-Kontrolltransfektanden; rot=*Capan-1*/P16-Transfektanden; WT=*Capan-1* Wildtypzellen]

3.1.2 Statistische Analyse zur Identifizierung differenziell regulierter Gene

Um Anoikis-relevante Gentranskripte mit signifikant differenzieller Expression zwischen resistenten Mock-Kontrollen und suszeptiblen P16-transfizierten Pankreaskarzinom-Zellen *Capan-1* zu identifizieren, kam das Welch-Verfahren (*t*-Test) zur Anwendung. Durch die anschließende Korrektur möglicher falsch-positiver Ereignissse (*False Discovery Rate*, FDR) beim Vergleich der beiden Gruppen *Capan-1*/Mock vs. *Capan-1*/P16 konnten allerdings weder auf *U133*- noch auf *ST-GeneChips* signifikante Transkripte gefunden werden, die die gewählten Kriterien bestehen. Dies ist in der statistisch gesehen geringen Probenanzahl pro untersuchter Gruppe (n=2) begründet. Daher war im konkreten Fall keine Angleichung der erhaltenen *p*-Werte möglich. Die Zusammenfassung der Ergebnisse der statistischen Datenprüfung, die von der eingesetzten Analysesoftware *GeneSpring GX* generiert wurde, ist in Tabelle 2 für Mock- gegen P16-Transfektanden auf *U133*-Chips sowie Tabelle 3 für den entsprechenden Vergleich auf *ST*-Microarrays dargestellt.

Anhand dieser Zusammenstellung ist ersichtlich, dass über *ST*-Arrays eine geringere Anzahl differenziell regulierter Gene mit einem großen Unterschied (FC≥3,0) gefunden werden konnten als über *U133*-Arrays. In Bezug zur Gesamtzahl repräsentierter Sonden (28869 Sonden) wurden auf *Human Gene 1.0 ST* Chips nur 3,4% Transkripte mit einem *Fold Change* über 3,0 (980 *Probe Sets;* Tab.3) zwischen den Gruppen Mock und P16 detektiert, im Vergleich zu 6,2% für die analoge Analyse über die *U133*-Plattform (Gesamtanzahl Sonden 54675, FC≥3,0 3399 *Probe Sets;* Tab. 2). Diese grundlegenden Unterschiede im Ergebnis zwischen beiden Affymetrix-Technologien verdeutlichen die Relevanz eines kombinatorischen Ansatzes zur Ermittlung allgemeingültiger Markergene.

Tab. 2: Zusammenfassung der differenziell regulierten *Probe Sets* des Vergleichs Mock- vs. P16-Transfektanden der *Capan-1* Zellen auf *U133-GeneChips* nach *p*-Wert und *Fold Change* Die Analyse der statistischen Signifikanz erfolgte auf Basis des *t*-Tests nach Welch ohne *p*-Wert-Korrektur durch *False Discovery Rate* (FDR). [Affymetrix *GeneChip Human Genome U133*; n=2]

Fold Change	***p-Wert***					
	alle *p*	***p* ≤ 0,05**	***p* ≤ 0,02**	***p* ≤ 0,01**	***p* ≤ 0,005**	***p* ≤ 0,001**
alle FC	54675	4359	1720	858	411	73
≥ 1,1	34887	4250	1683	839	406	73
≥ 1,5	13862	3321	1384	708	351	68
≥ 2,0	7368	2541	1111	585	295	58
≥ 3,0	3399	1658	782	433	227	48

Tab. 3: Ergebnisse der statistischen Ermittlung der Transkripte mit signifikanten Expressions-unterschieden zwischen *Capan-1*/+P16 Zellen und Kontrolltransfektanden (Mock) auf *ST-GeneChips* Die Resultate wurden durch Anwendung des Welch-Testverfahrens ohne FDR berechnet.
[Affymetrix *GeneChip Human Gene 1.0 ST*; n=2]

Fold Change	***p-Wert***					
	alle *p*	***p* ≤ 0,05**	***p* ≤ 0,02**	***p* ≤ 0,01**	***p* ≤ 0,005**	***p* ≤ 0,001**
alle FC	28869	1538	605	299	144	27
≥ 1,1	14680	1369	534	271	129	25
≥ 1,5	5253	939	380	200	98	18
≥ 2,0	2374	575	259	147	76	16
≥ 3,0	980	312	162	89	47	10

3.1.3 Selektion Anoikis-assoziierter Marker

Zur selektiven Identifizierung potenter molekularer Marker mit großer Bedeutung für Anoikis sollten im Plattform-übergreifenden Vergleich besonders diejenigen herausgefiltert werden, die in beiden Datensätzen einen hohen transkriptionellen Unterschied zwischen *Capan-1/-p16/-Anoikis* (Mock-Transfektanden) und *Capan-1/+p16/+Anoikis* (P16-Transfektanden) aufweisen. Gemäß dieses grundlegenden Auswahlkriteriums wurden die 3399 *Probe Sets* (*U133-GeneChip*, Tab. 2) und die 980 Transkripte (*ST-GeneChip*, Tab. 3) umfassenden Listen untersucht, die alle differenziell regulierten Gene mit einem hohen *Fold Change* über 3,0 enthalten. Insgesamt wurden 5 Gene identifiziert, die über beide Array-Technologien durch die stärksten Expressionsunterschiede (FC) auffielen und damit die validesten Marker in diesem Zusammenhang darstellen. Dabei handelt es sich um *DAPK1, FSTL1, GNE, LDHB* und *SERPINB2*. Diese sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass *GNE* und *DAPK1* in P16-substituierten und Anoikis-empfindlichen *Capan-1* Zellen deutlich vermindert transkribiert werden, während die Expression der übrigen ausgewählten Gene (*FSTL1, LDHB, SERPINB2)* entsprechend erhöht ist.

Tab. 4: Übersicht der 5 Gene, die via Plattform-übergreifender Microarray-Analyse von *Capan-1/+P16/+Anoikis* (P16-Transfektanden) gegen *Capan-1/-P16/-Anoikis* (Mock-Kontrolltransfektanden) aufgrund ihres hohen Expressionsunterschiedes selektiert wurden Dargestellt ist die Transkriptionsrichtung (Tendenz) sowie der jeweilige *Fold Change* und *p*-Wert jedes Kandidatengenes auf *U133* (n=2)- und *ST-GeneChips* (n=2) von Affymetrix.
[↓=Genexpression in P16-Zellen niedriger als in Mock-Zellen; ↑=Genexpression in P16-Zellen höher als in Mock-Zellen]

			U133 GeneChip P16 vs. Mock		***ST GeneChip*** P16 vs. Mock	
Gen-symbol	**Genname**	**Tendenz**	**FC**	***p*-Wert**	**FC**	***p*-Wert**
DAPK1	*Death-Associated Protein Kinase 1*	↓	221,25	5,30E-03	47,49	2,94E-02
FSTL1	*Follistatin-Like 1*	↑	244,08	1,52E-02	76,79	5,33E-02
GNE	*Glucosamine (UDP-N-Acetyl)-2-Epimerase/N-Aetylmannosamine Kinase*	↓	139,28	2,20E-03	44,77	1,48E-02
LDHB	*Lactate Dehydrogenase B*	↑	432,31	3,40E-03	143,71	1,75E-02
SERPINB2	*Serpin Peptidase Inhibitor, Clade B (Ovalbumin), Member 2*	↑	180,59	1,63E-02	68,11	1,40E-01

Die Untersuchung des allgemeinen Funktionsspektrums der ausgewählten Kandidatengene erfolgte auf Grundlage der sog. *GO* (Gene Ontology™)-Analyse über die Affymetrix NetAffx™-Datenbank. Diese ermöglicht die Klassifizierung von Genen gemäß ihrer biologischen Eigenschaften bzw. zellulären Lokalisierung nach bestimmten Kategorien, sog. „*GO*-terms" (Baehrecke et al. 2004). Um Hinweise auf eine putativ funktionelle Relevanz der Genprodukte für Anoikis zu erhalten, lag der Fokus hauptsächlich auf den den Ontologiegruppen „*biological process*" und „*molecular function*". Tabelle 5 zeigt die entsprechenden *GO*-Klassen für die 5 selektierten Markergene. Zumindest für *DAPK1* (*Death-Associated Protein Kinase 1*) und *SERPINB2* (*Serpin Peptidase Inhibitor, Clade B, Member 2*) geht daraus ein deutlicher Bezug zu Apoptose hervor. Neuere Studien verweisen darüber hinaus auf eine pro-apoptotische Funktion des *FSTL1*-Proteins (Chan et al. 2008). Dagegen scheint die Lactat-Dehydrogenase B (*LDHB*) eine Rolle bei der malignen Transformation und Tumormetastasierung zu spielen (Leiblich et al. 2006).

Tab. 5: Überblick über die funktionelle Klassifizierung der 5 Kandidatengene gemäß den *GO*-Kategorien „biological process" und „molecular function"

Gensymbol	Genname	*GO*-TERM biological process	*GO*-TERM molecular function
DAPK1	*Death-Associated Protein Kinase 1*	protein amino acid phosphorylation; induction of apoptosis by extracellular signals; anti-apoptosis; signal transduction; protein kinase cascade	nucleotide/protein/calmodulin/ATP binding; protein/serine/threonine kinase activity; transferase activity
FSTL1	*Follistatin-Like 1*	BMP signaling pathway	calcium ion/heparin binding
GNE	*Glucosamine (UDP-N-Acetyl)-2-Epimerase/N-Aetylmannosamine Kinase*	carbohydrate/UDP-N-acetylglucosamine/N-acetylneuraminate metabolic process; cell adhesion; lipopolysaccharide biosynthetic process	nucleotide/ATP binding; UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase/transferase/phosphotransferase/isomerase activity
LDHB	*Lactate Dehydrogenase B*	carbohydrate/lactate metabolic process; anaerobe glycolysis	catalytic activity; L-lactate dehydrogenase/oxidoreductase activity; binding of NAD or NADH
SERPINB2	*Serpin Peptidase Inhibitor, Clade B (Ovalbumin), Member 2*	anti-apoptosis; wound healing	serine-type endopeptidase activity and inhibitor

Von allen Genen mit Bezug zum zellulären Sialinsäuremetabolismus zeigte das Enzym UDP-*N*-Acetylglukosamin 2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamin-Kinase (*GNE*) insgesamt den höchsten Transkriptionsunterschied. Dieser äußert sich durch eine signifikant reprimierte Expression in Anoikis-sensiblen *Capan-1*/P16-Transfektanden, die sich auf *ST*-Arrays in einem *Fold Change* von über 40 (FC=44,77; *p*=1,48E-02; Tab. 4) und auf *U133*-Chips von annähernd 140 (FC=139,28; *p*=2,20E-03; Tab. 4) manifestiert. Auf Basis der zentralen katalytischen Bedeutung der *GNE* bei der Sialinsäurebiosynthese und der fehlenden Charakterisierung möglicher weiterer Funktionen des Proteins wurde bei vorliegender Arbeit die Rolle der *GNE* bei der Ausprägung des Anoikisphänotyps im *in vitro* Modell *Capan-1* im Detail analysiert.

3.2 Signifikant differenzielle Expression des Enzyms UDP-*N*-Acetylglukosamin 2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamin-Kinase *(GNE)* in *Capan-1* Mutanten

Unter den Sialylierungs-relevanten Genen, die zwischen P16-negativen und P16-substituierten *Capan-1* Zellen differenziell transkribiert werden, zeigte die UDP-*N*-Acetylglukosamin 2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamin-Kinase *(GNE)* über kombinatorische Microarray-Analyse das auffälligste Regulierungsmuster. Dieses manifestierte sich in einem distinkten Transkriptionsverlust in P16-Transfektanden verbunden mit einer hohen Expressionsdifferenz zur Mock-Kontrolle (*U133-GeneChips* FC=139,28; *ST-GeneChips* FC= 44,77).

Durch Einbeziehung von *Capan-1* Wildtypzellen konnte via quantitativer *Real-Time* PCR das über *GeneChips* identifizierte Regulationsmuster bestätigt werden. Die relative Expression wurde dazu auf Grundlage der $\Delta\Delta C_T$-Methode erhoben. Gemäß des quantitativen Charakters der Methode lagen die durch *TaqMan*-PCR ermittelten *Fold Changes* deutlich über denen der Chipuntersuchung. Wie aus Abbildung 11 hervorgeht, ist die *GNE*-Transkription in Bezug zur unabhängigen Referenz-Zelllinie *SW480* (humane kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie) in Anoikis-positiven P16-Transfektanden fast vollständig gehemmt (relative mRNA-Menge *GNE* 0,01±0,0), während in Mock-Kontrollzellen eine über 2000fach höhere Transkriptmenge (20,1±7,1) detektiert werden konnte; im nativen Wildtyp liegt das Niveau im Vergleich dazu über 4000fach höher (42,6±7,9) als in P16-Zellen.

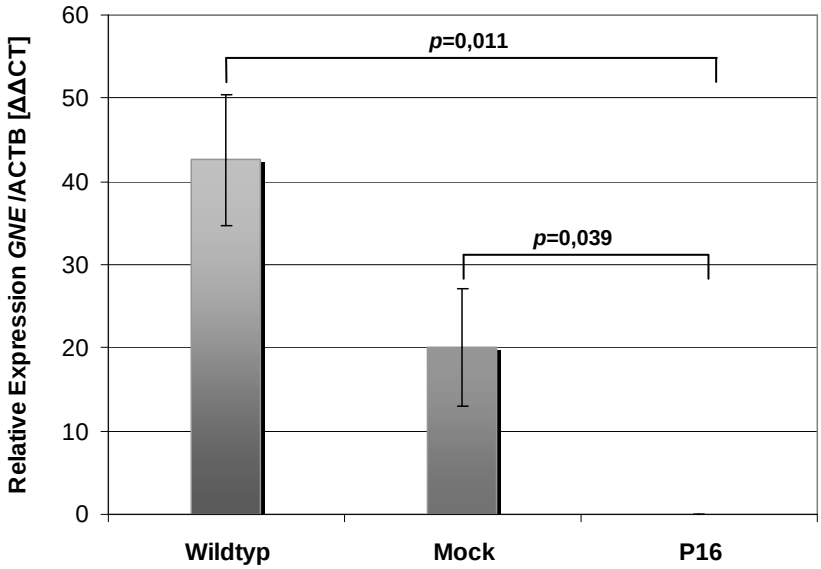


Abb. 11: Quantifizierung der *GNE* in *Capan-1/+P16/+Anoikis* Zellen im Vergleich zur Mock-Kontrolle und zum nativen Wildtyp verdeutlicht eine signifikant verminderte Expression in P16-transfizierten *Capan-1* Zellen Die mRNA-Menge der *GNE* wurde in jeweils 3 unabhängigen Nukleinsäureproben von Zellen unterschiedlicher Charge und Passage via quantitativer *Real-Time* PCR als Triplikatansatz ermittelt und auf die humane kolorektale Karzinom-Zelllinie *SW480* bezogen. Die Quantifizierung erfolgte anhand des Housekeepers β-Aktin über die $\Delta\Delta C_T$-Methode. Die Signifikanz (*p*-Wert) der differenziellen Expression wurde über den Student´schen *t*-Test erhoben und ist im Säulendiagramm für P16- vs. Mock-Transfektanden bzw. Wildtypzellen angegeben.
[Wildtyp=*Capan-1* Wildtypzellen; Mock=*Capan-1*/Mock-Kontrolltransfektanden; P16=*Capan-1*/P16-Transfektanden].

3.3 Bedeutung der *GNE* in Tumorzelllinien und im Karzinom

Untersuchungen an humanen Normalgeweben bestätigten eine starke Expression der *GNE* verbunden mit einer hohen Enzymaktivität vorwiegend in sekretierenden Organen, wie der Leber, belegten allerdings ein vergleichsweise mäßiges Niveau im Pankreas (Lucka et al. 1999).

Zur Bewertung einer potenziellen Bedeutung für das Pankreaskarzinom wurde die spezifische *GNE*-Expression in transformierten humanen Zelllinien (Abb. 12) und Geweben (Abb. 13) analysiert. Eine umfassende dahingehende Recherche ermöglichte dabei die online-Datenbank *ONCOMINE* (Rhodes et al. 2004; www.oncomine.org). Diese Plattform umfasst derzeit etwa 30.000 Genomprofile aus mehreren hundert Microarray-Studien unterschiedlicher Krebsarten, davon allein 20 der malignen Bauchspeicheldrüse.

Abbildung 12 stellt den *ONCOMINE*-Datensatz von Wooster et al. (2008) dar, der das genomweite Transkriptionsprofil von 318 Zelllinien auf Affymetrix *U133 Plus 2.0 GeneChips* erfasst. Im Vergleich von Tumorzelllinien unterschiedlichsten Ursprungs ist das durchschnittliche Expressionsniveau der *GNE* in 9 verschiedenen Pankreaszelllinien deutlich erhöht (Abb. 12/Spalte 16). Eine annähernde Transkriptionshöhe wird abgesehen davon im Zervikal (n=7; Abb. 12/Spalte 4)- bzw. Ovarialkarzinom (n=5; Abb. 12/Spalte 15) erreicht.

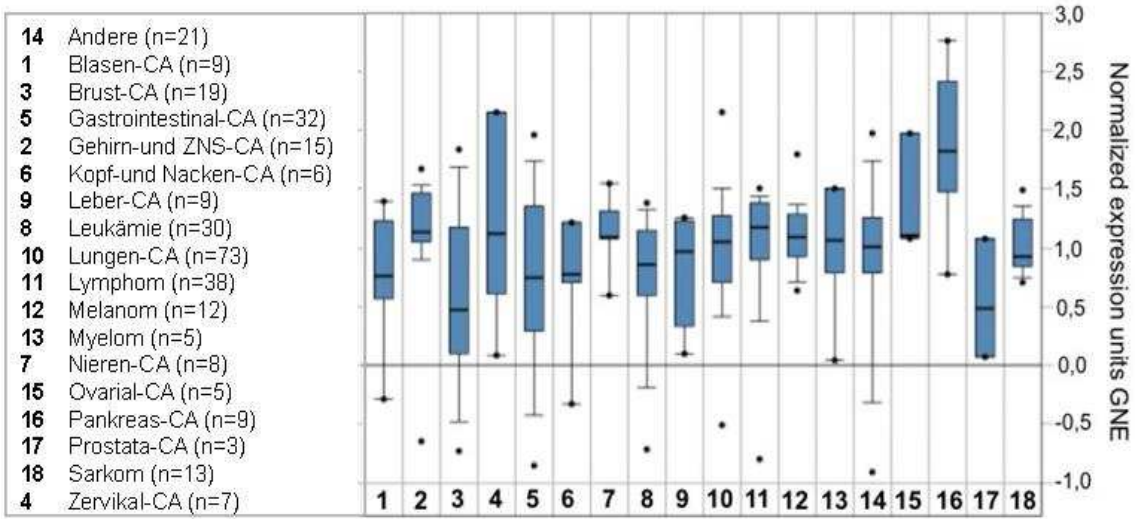


Abb. 12: Vergleich der Expression der *GNE* in Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs und Zahl verdeutlicht eine signifikante Erhöhung in Pankreaskarzinom-Zellen Dargestellt sind die Daten von Wooster et al. (2008) in Form von Boxplots, die der krebsspezifischen Microarray-Datenbank *ONCOMINE* entnommen wurden. Die Legende gibt den Ursprung der Zellen in alphabetischer Reihenfolge sowie die jeweilige Anzahl der analysierten Zelllinien (n) auf Affymetrix *GeneChips U133* wider.
[Quelle *ONCOMINE*; Studie GlaxoSmithKline, Wooster et al. 2008; CA=Karzinom]

In vivo scheint eine erhöhte *GNE*-Transkription kein primär Pankreas-assoziiertes Phänomen darzustellen. Su et al. (2001) untersuchten 174 Tumore verschiedener Gewebe auf Affymetrix *GeneChips 95a*. Ziel der Studie war die molekulare Klassifizierung der aggressivsten Krebsarten, wie Pankreas-, Brust-, Prostata-, Leber- und Lungenkrebs zur Erstellung einer spezifischen Genexpressionssignatur. Die Resultate dieser Untersuchung in Bezug auf *GNE*, die der Plattform *ONCOMINE* entnommen wurden, sind in Abbildung 13 zusammengefasst. Im Vergleich zu anderen Krebsgeweben ist die mRNA-Menge der *GNE* in der malignen Bauchspeicheldrüse relativ hoch. Die mediane Transkriptionsstärke liegt im Leber- und Prostatakarzinom jedoch noch darüber.

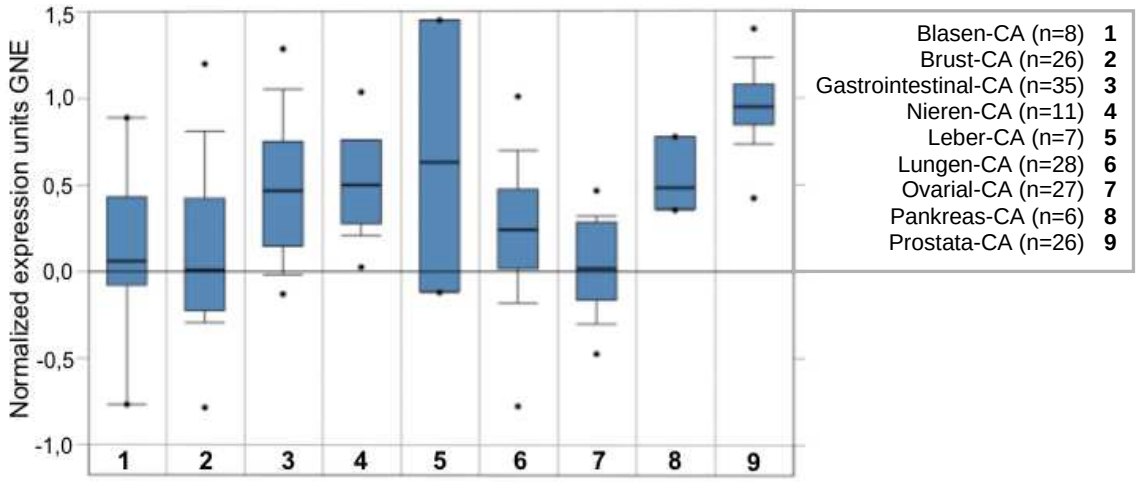
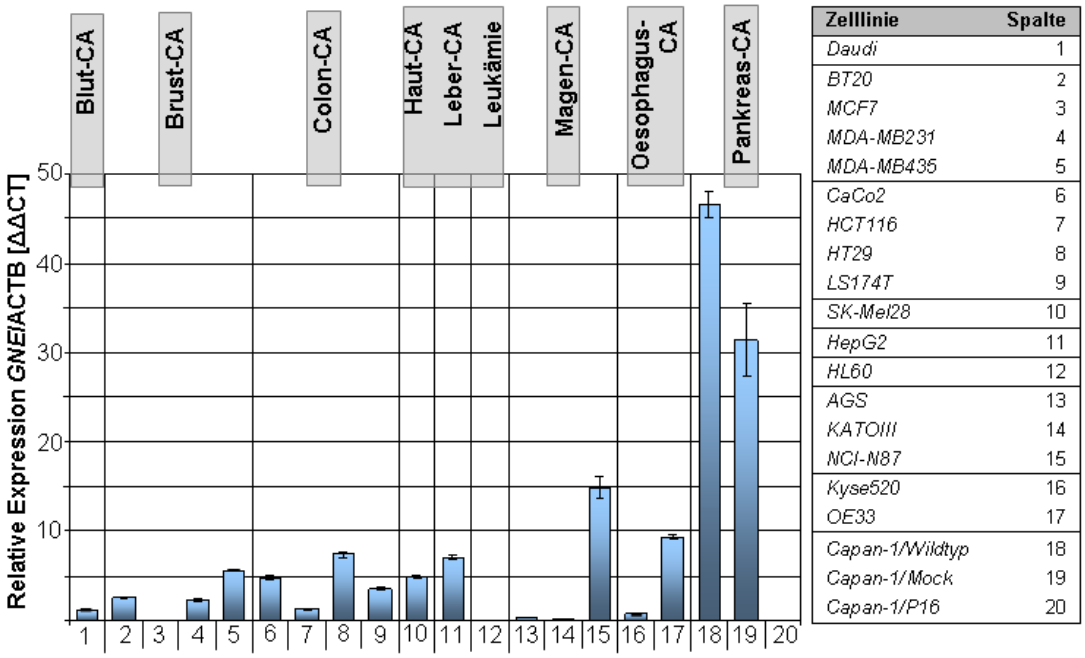


Abb. 13: Differenzielle *GNE*-Expression in Tumorproben verschieder Organe Su et al. (2001) erstellten über Affymetrix *GeneChips 95a* ein Transkriptionsprofil für die wichtigsten humanen Tumore, das über die online-Plattform *ONCOMINE* veröffentlicht ist. Die Legende gibt den Gewebeursprung sowie die Anzahl der in der Studie analysierten Proben an. [Quelle *ONCOMINE*; Studie Su et al. 2001]

Zusätzlich wurde die Expression der *GNE* in Tumorzelllinien quantifiziert, die in der AG Kemmner etabliert sind und die aus verschiedenen Ursprungsgeweben hervorgehen. Insgesamt wurden 20 unterschiedliche Zelllinien über *TaqMan*-PCR untersucht und die Expressionshöhe über die $\Delta\Delta C_T$-Methode evaluiert. Wie anhand Abbildung 14 ersichtlich, ist das Transkriptionsniveau in *Capan-1* Pankreaskarzinom-Zellen im Vergleich zu allen anderen analysierten Zellen deutlich erhöht (Spalte 18).



Zelllinie	Spalte
Daudi	1
BT20	2
MCF7	3
MDA-MB231	4
MDA-MB435	5
CaCo2	6
HCT116	7
HT29	8
LS174T	9
SK-Mel28	10
HepG2	11
HL60	12
AGS	13
KATOIII	14
NCI-N87	15
Kyse520	16
OE33	17
Capan-1/Wildtyp	18
Capan-1/Mock	19
Capan-1/P16	20

Abb. 14: Die *GNE*-Expression in kultivierten Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs belegt eine hohe Transkription in der Pankreaskarzinom-Zelllinie *Capan-1* Die mRNA-Menge der *GNE* wurde im Triplikatansatz in 20 verschiedenen Zelllinien mittels *TaqMan*-PCR untersucht und auf die Transkription in *SW480*-Zellen (Kalibrator) bezogen. Die Quantifizierung erfolgte in Bezug zu β-Aktin über die $\Delta\Delta C_T$-Methode.
Der Ursprung der Tumorzelllinien ist innerhalb des Säulendiagramms (grau hinterlegt) angegeben. Die analysierten Zelllinien sowie ihre Zuordnung zur Darstellung gibt die Legende wider. [CA=Karzinom]

3.4 Ausprägung der *GNE*-Expression in *Capan-1* Zellen auf Proteinebene

3.4.1 Chromatographische Quantifizierung der Membransialylierung

Um den Grad der Gesamtsialylierung zu erfassen, wurden die transfizierten (Mock, P16) und nativen *Capan-1* Pankreaskarzinom-Zellen flüssigkeitschromatographisch via HPLC untersucht. Dazu wurde zunächst der terminale Neuraminsäureanteil enzymatisch von der Membran gelöst und mit 1,2-Diamino-4,5-Methylendioxybenzol (DMB) komplexiert, das fluorimetrisch gemessen werden kann. Nach Auftrennung durch *reversed*-Phasen HPLC wurden die DMB-Sialinsäurederivate über ein Durchfluss-Fluoreszenzspektralphotometer detektiert. Die Ermittlung der Sialinsäuremenge erfolgte in Bezug zum Gesamtproteingehalt der Zellen.
Im Hinblick auf die Schlüsselstellung der *GNE* für die Sialinsäuresynthese wurde erwartet, dass sich ein Defizit des Enzyms auf Ebene der Oberflächensialylierung äußern würde. Analog zu dieser Annahme erbrachte die fluorimetrische Untersuchung, dass in P16-Transfektanden mit sowohl transkriptionellem (verminderte Expression) als auch translationellem (verminderte Epimeraseaktivität; persönliche Mitteilung durch Prof. S. Hinderlich, University of Applied Biosciences, Beuth-Hochschule für Technik, Berlin) *GNE*-

Verlust eine signifikante Reduktion membrangebundener Sialinsäure (2,2±1,1nmol/mg) vorliegt. Im Vergleich zum Wildtyp mit 13,4±3,8nmol/mg sowie zu Mock-Transfektanden mit 15,9±2,0nmol Neu5Ac/mg konnte insgesamt eine über 80% geringere Menge in P16-substituierten *Capan-1* Zellen detektiert werden (Abb. 15).

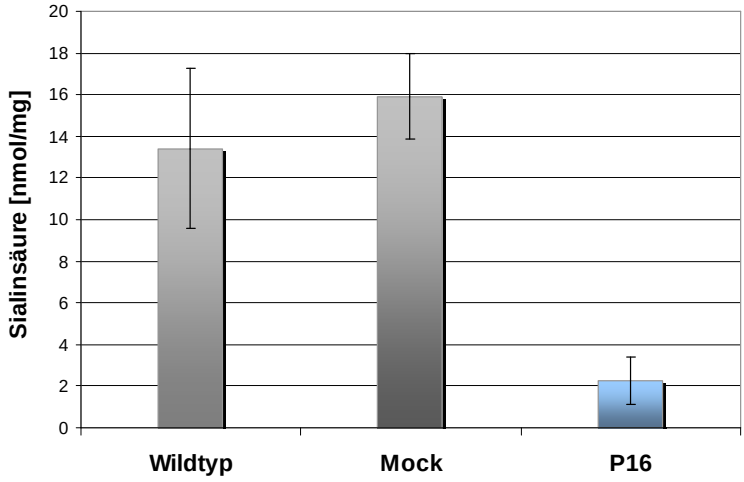


Abb. 15: Bestimmung des membranständigen Sialinsäuregehalts von *Capan-1* Wildtypzellen und Transfektanden Der Sialinsäureanteil im Kulturüberstand Neuraminidase-behandelter Zellen (100mU) wurde mit 1,2-Diamino-4,5-Methylendioxybenzol (DMB) derivatisiert und mittels HPLC aufgetrennt. Die gekoppelte Sialinsäure wurde über einen Fluoreszenzdetektor erfasst. Die Bestimmung der Sialinsäuremenge erfolgte anhand einer Eichkurve mit einem Neu5Ac-Standard und im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge der Zellen. Es wurden jeweils drei unabhängige Messungen durchgeführt.
[Wildtyp=*Capan-1* Wildtypzellen; Mock=*Capan-1*/Mock-Kontrolltransfektanden; P16=*Capan-1*/P16-Transfektanden].

3.4.2 Fluorimetrische Detektion membranständiger Sialinsäurestrukturen

Parallel zur Bestimmung mittels HPLC wurde die Menge terminaler Sialinsäure über FACS-Analyse untersucht. Dazu wurden *GNE*-defiziente, hyposialylierte P16-Transfektanden im Vergleich zu Wildtypzellen mit den FITC-markierten Pflanzenlektinen PNA (*Peanut* Agglutinin) und SNA (*Sambucus nigra* Agglutinin) behandelt, die an spezifische Glykanstrukturen binden (Abb. 16). Eine quantitative Unterscheidung des Sialylierungsstatus war über vorgeschalteten Neuraminidase-Verdau möglich (Abb. 17).
Das Erdnusslektin PNA bindet an terminale β-1,3-gebundene Galaktose, wenn die für die Interaktion kritischen Molekülbereiche desialyliert vorliegen. Die Affinität des SNA beruht dagegen auf der sterischen Lage der Sialinsäure im Glykokonjugat der Zelloberfläche und assoziiert bevorzugt mit α-2,6- bzw. in geringerem Ausmaß mit α-2,3-glykosidisch verknüpfter Sialinsäure. Dementsprechend bietet die Methode der Lektinmarkierung den Vorteil, über die Quantifizierung hinaus übergeordnete strukturelle Informationen über die Glykanzusammensetzung der Membran zu liefern. Das Resultat der Lektin-basierten FACS-

Untersuchung des *Capan-1* Wildtyps und P16-Mutanten ist in Abbildung 16 als Histogramm dargestellt.

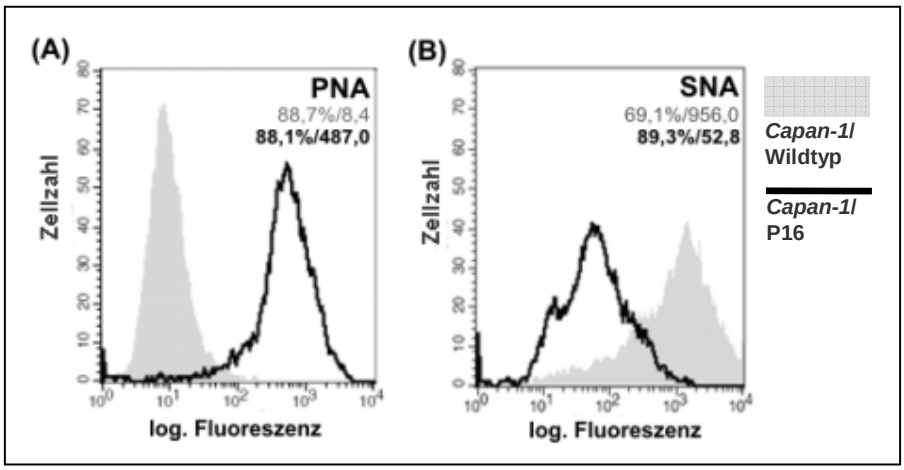


Abb. 16: Untersuchung der terminalen Sialinsäurekomposition im *Capan-1* Wildtyp und in P16-Transfektanden durch pflanzliche Lektine Semilogarithmische Darstellung der FACS-Analyse von *Capan-1/+P16* Zellen (schwarze Linie) im Vergleich zu Wildtypzellen (flächig grau) nach Oberflächenmarkierung mit den FITC-gelabelten Lektinen PNA (A) und SNA (B). Die Zahlenwerte geben den Prozentsatz positiver Zellen und die Fluoreszenzintensität (Median) wider.

PNA, das endständige Galaktosen auf Glykoproteinen und -lipiden erkennt, bindet an der Zelloberfläche P16-positiver *Capan-1* Zellen 58fach (Median-Fluoreszenzintensität FITC 487,0) stärker im Vergleich zum Wildtyp (Median-Fluoreszenzsignal 8,4; Abb. 16A). Der Fluoreszenzunterschied in den Mutanten nach Entfernung terminaler Sialinsäure durch Neuraminidase-Behandlung fällt dagegen schwächer aus (Fluoreszenz ohne Sialidase 487,0 vs. Fluoreszenz +Sialidase 478,3) als innerhalb der Wildtypzellen (Fluoreszenz ohne Sialidase 8,4 vs. Fluoreszenz +Sialidase 437,1; Abb. 17). Demnach sind die Galaktosylgruppen in *GNE*-defizienten *Capan-1*/+P16 Zellen weniger stark sialyliert als im Wildtyp.

Das SNA-Signal hingegen war in den Transfektanden (Median-Fluoreszenzintensität FITC 52,8) 18,1fach niedriger als im Wildtyp (Fluoreszenzstärke FITC 956,0; Abb. 16B). Eine enzymatische Vorbehandlung hatte eine signifikante Reduzierung der Fluoreszenz von SNA im Fall des Wildtyps (Fluoreszenz ohne Sialidase 956,0 vs. Fluoreszenz +Sialidase 456,6) zur Folge, zeigte allerdings kaum Effekte in p16-positiven Zellen (FITC-Fluoreszenz unbehandelte P16-Zellen 52,8 vs. Fluoreszenz +Sialidase 35,9; Abb. 17). Dieses Ergebnis deutet auf Unterschiede im α-2,6- bzw. α-2,3-Sialylierungsstatus zwischen den beiden untersuchten Zellpopulationen hin, die sich in einer verstärkten Maskierung der Membranoberfläche mit Sialinsäure in *Capan-1* Wildtypzellen äußert.

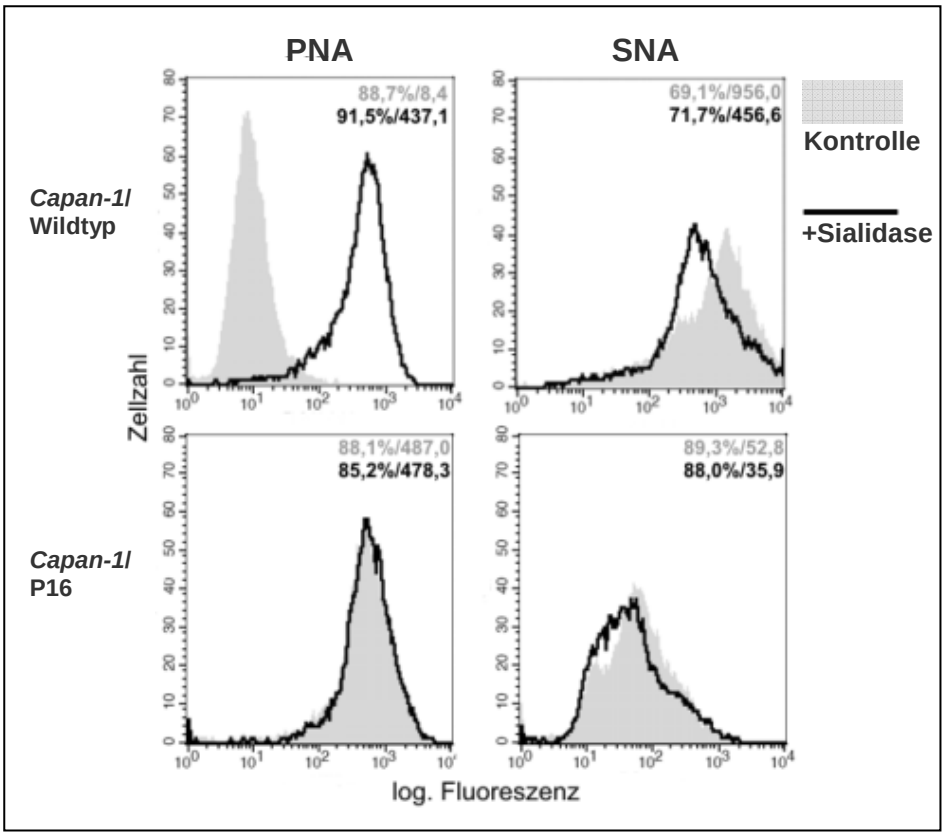


Abb. 17: Quantifizierung der Sialinsäurezusammensetzung auf der Zellmembran P16-positiver *Capan-1* Zellen und des Wildtyps durch Lektine *Capan-1* Wildtypzellen und P16-Transfektanden wurden mit den FITC-gelabelten Pflanzenlektinen PNA und SNA markiert. Die Bestimmung der Neuraminsäuremenge erfolgte durch zusätzliche enzymatische Vorbehandlung der Zellen mit Neuraminidase. Die Zahlenwerte geben den prozentualen Anteil Lektin-gefärbter Zellen und die Medianfluoreszenz an.
[grau schattiert=Lektin-markierte Zellen; schwarze Linie=Sialidase-behandelte, Lektin-markierte Zellen]

3.5 Transkriptionelle Regulierung der *GNE* in Anoikis-sensiblen, P16-substituierten *Capan-1* Zellen

Die Methylierung von CpG-Inseln im Promotorbereich von Genen sowie Modifikation von Histonen gehören zu den wichtigsten Regulationsmechanismen der Genexpression auf epigenetischer Ebene. Durch Blockierung der DNA-Methylierung können auf diese Weise stillgelegte Gene transkriptionell reaktiviert werden.

Vorangegangene Studien belegen eine potenzielle Bedeutung epigenetischer Inaktivierung der *GNE* durch Promotormethylierung in unterschiedlichen hyposialylierten Zellen (Giordanengo et al. 2004; Oetke et al. 2003). Daher wurde im Folgenden untersucht, inwieweit die transkriptionelle Reduktion des Enzyms in P16-Mutanten auf Gen-*Silencing* durch *de novo* Methylierung zurückzuführen ist.

Eine Behandlung von *Capan-1/+P16* Zellen mit ansteigender Konzentration (0, 1, 5µM) des DNA-Methyltransferase Inibitors 5-Aza-dC bewirkt eine geringfügig zunehmende Aktivierung der *GNE*-Transkription (Abb. 18). In Relation zur Enzymexpression im Wildtyp ist der Effekt als gering einzustufen, da er nicht annähernd dessen Basalniveau erreicht. Vielmehr lässt sich auch an Wildtypzellen durch die Applikation unterschiedlicher Mengen dieses Agens´ eine transkriptionelle Induktion beobachten.

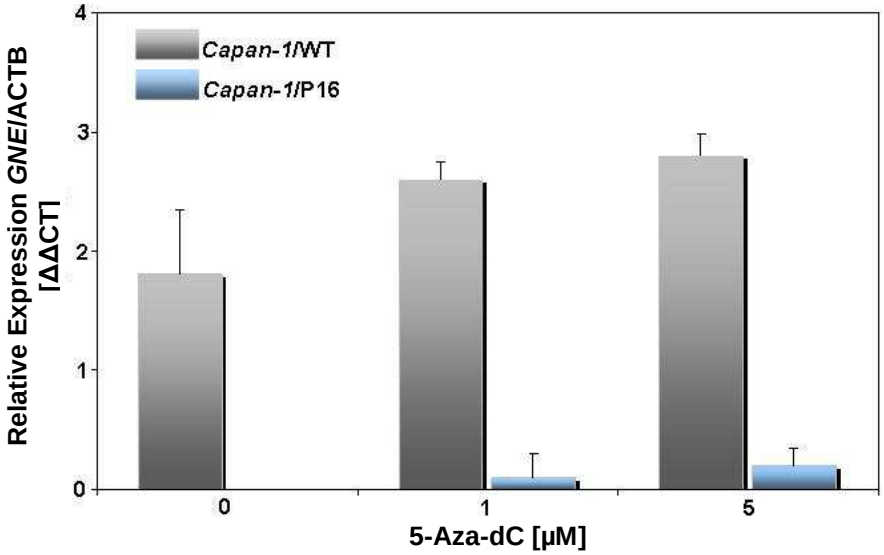


Abb. 18: Keine Wiederherstellung der *GNE*-Expression durch Demethylierung in hyposialylierten *Capan-1/+P16* Zellen P16-Transfektanden und *Capan-1* Wildtypzellen wurden 72h mit ansteigenden Konzentrationen (0, 1, 5µM) des Methyltransferase-Inhibitors 5-Aza-2´-Deoxycytidin (5-Aza-dC) inkubiert. Nach RNA-Isolierung wurde der Effekt via *GNE*-spezifischer qRT-PCR (40 Zyklen) über die $\Delta\Delta C_T$-Methode ermittelt. Als interne Kontrolle für die Integrität und Vereinheitlichung der eingesetzten cDNA-Mengen diente der Housekeeper β-Aktin. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Versuchen in Bezug auf *SW480* Kolonkarzinom-Zellen, die als unabhängiger Kalibrator dienten. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben.

3.6 *In vitro* Untersuchung des funktionellen Einflusses der *GNE* auf Anoikis

Die signifikant verminderte Expression der *GNE* in Anoikis-sensiblen P16-Transfektanden konnte durch die bereits dargestellten Experimente auf Effektorebene verifiziert werden. In Korrelation zur reduzierten mRNA-Menge des bifunktionalen Schlüsselenzyms der Sialinsäurebiosynthese war der Anteil exponierter Neu5Ac in den Mutanten deutlich dezimiert (HPLC-Analyse, Lektin-FACS), was mit einer geringeren Enzymaktivität einhergeht (mündlicher Hinweis Prof. S. Hinderlich, Beuth-Hochschule für Technik, Berlin).

Möglicherweise gibt es einen generellen Mechanismus, der das Zellschicksal in Richtung Apoptose bzw. Proliferation determiniert und von der *GNE*-Verfügbarkeit abhängt (Wang et al. 2006). Daher sollte analog zu vorliegenden Daten der Einfluss einer gezielten Supprimierung der *GNE* über RNA-Interferenz auf die Ausbildung des Anoikis-Phänotyps

untersucht werden. Die Inhibierung wurde über transiente Transfektion Sequenz-spezifischer *small interfering RNA* (siRNA) im Anoikis-resistenten *Capan-1* Wildtyp induziert.

3.6.1 Etablierung der *GNE*-spezifischen siRNA-Transfektionsstrategie im *Capan-1* Wildtyp

Um eine möglichst hohe Effizienz der RNA-Interferenz zu erzielen, wurden im Vorfeld verschiedene experimentelle Parameter und ihr Einfluss auf die relative *GNE*-Expression untersucht. Die Effektivität und Spezifität der jeweiligen Versuchsbedingungen wurden in einem qRT-PCR basierten Verfahren validiert (Expressionshemmung ≥ 70%).

Als kritischster Faktor für eine erfolgreiche Repression auf mRNA-Ebene durch *RNAi* gilt die Dichte der Zellen zum Transfektionszeitpunkt. Daher wurden unterschiedliche Zellzahlen in ein 6-Well-Format ausgesät und die Zelldichte nach 24h mikroskopisch kontrolliert. Optimalerweise sollten adhärente Zellen zu diesem Zeitpunkt eine Konfluenz von 50-80% aufweisen (Carlson et al. 2007). Diesem Richtwert entsprach eine Menge von $7x10^4$ Zellen, die fortan für die weiteren Experimente eingesetzt wurde und die effizientesten *Knock-Down* Resultate lieferte.
Generell ist die Wirkung verschiedener siRNAs, die von einer mRNA-Sequenz abgeleitet werden, variabel. Die Effektivität der kurzen RNA-Doppelstränge wird im Allgemeinen auf den Grad der induzierten mRNA-Degradierung bezogen. Entsprechend der durch Tuschl (Elbashir et al. 2001) etablierten Kriterien für die Erstellung effizienter siRNA wurden daher im Vorfeld vier unterschiedliche Target-Sequenzen für die *GNE* entworfen, durch die Fa. Sigma-Proligo chemisch synthetisiert und transient in *Capan-1* Wildtypzellen transfiziert. Als Kontrolle diente eine kommerziell erhältliche Negativkontroll-siRNA (*AllStars Negative Control siRNA*, Fa. Qiagen), die keine Sequenzhomologie zu Säugergenen aufweist. Das hemmende Potenzial der verwendeten siRNAs war heterogen, wobei sich die Sequenz *siGNE-3* (Material, 2.1.5) bei allen Vorabexperimenten (Ergebnisse nicht gezeigt) als höchst effektiv erwies und daher im weiteren Verlauf in allen Versuchsansätzen verwendet wurde.
Es ist bereits bekannt, dass eine Transfektion mit hoher siRNA-Konzentration von über 100nM unspezifische biologische Auswirkungen, sog. „off-target"-Effekte, hervorbringt (Jackson et al. 2004). Daher wurden die verschiedenen siRNAs in einer Endkonzentration von nur 50nM erfolgreich eingesetzt. Für die Transfektion wurde ein speziell für siRNA entwickeltes Reagenz (*TransMessenger*, Fa. Qiagen) verwendet, das auf kationischen Liposomen basiert. Es erwies sich nach dem ersten Experiment, dass die vom Hersteller angegebenen Mengenverhältnisse zwischen siRNA zu *TransMessenger* von 1:4 am geeignetsten waren.

Eine weitere wichtige Rahmenbedinung für die Etablierung der optimalen experimentellen siRNA-Transfektionsstrategie stellt die Inkubationsdauer der Zellen mit den Komplexen aus kurzer Doppelstrang-RNA und Liposomenreagenz dar. *Capan-1* Wildtypzellen wurden für 3, 5, 7h und über Nacht mit den Transfektionskomplexen behandelt, wobei die Viabilität der Zellen mikroskopisch beobachtet wurde. Der stärkste hemmende Effekt auf die *GNE*-Expression resultierte aus einer Zeitspanne von 7h. Allerdings war es nötig, die Zellen im Abstand von 48h erneut zu transfizieren. Aufgrund der Halbwertszeit des *GNE*-Proteins von über 72h (unveröffentlicht; persönliche Mitteilung durch Prof. S. Hinderlich, Beuth-Hochschule für Technik, Berlin) konnte erst durch eine weitere Behandlung ein Einfluss auf die Ausbildung des Anoikis-Phänotyps (PI-FACS) detektiert werden.

3.6.2 Evaluierung des siRNA-vermittelten *Knock-Down* Effekts

Entsprechend des durch Vorversuche etablierten Protokolls wurden *Capan-1* Wildtypzellen mit *GNE*-spezifischer siRNA (400ng entsprechend 50nM) wiederholt transfiziert (Methoden, 2.2.2.2). Die Effizienz der Transkriptionsminderung wurde über quantitative *Real-Time* PCR 72h nach der letzten Behandlung in Relation zur Negativkontroll-siRNA (Qiagen) erhoben. Eine entsprechende Behandlung führte zu einer durchschnittlich fast 80 prozentigen (78,0±0,07; n=3) *GNE*-Hemmung auf mRNA-Ebene (Abb. 19).

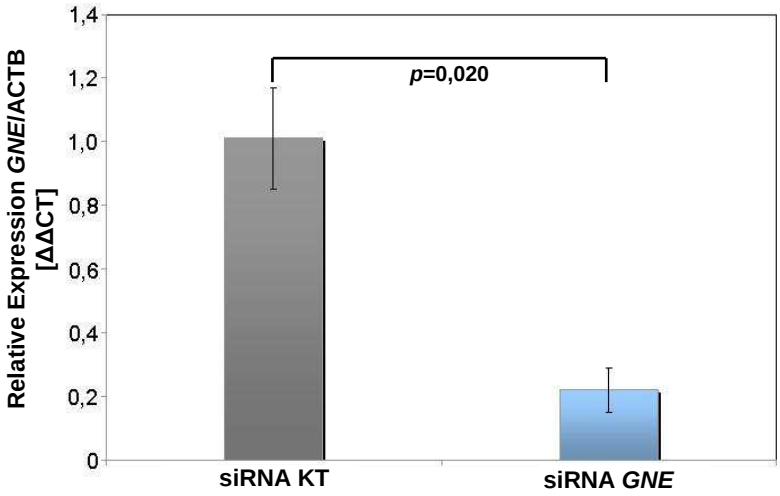


Abb. 19: Relative *GNE*-Transkriptmenge nach Expressionsinhibierung durch Target-spezifische siRNA
Capan-1 Wildtypzellen wurden im Abstand von 48h mit 50nM *GNE*-spezifischer und *AllStars* Negativkontroll siRNA (Qiagen) wiederholt transfiziert. 72h nach der letzten Behandlung wurden die Zellen geerntet und RNA aus den Zelllysaten gewonnen, die revers in cDNA transkribiert wurde. Die über qRT-PCR ermittelte Reduktion der relativen Expression der *GNE* (normiert auf β-Aktin; rel. Expression 0,22±0,07) zur Negativkontroll-siRNA (rel. Expression 1,01±0,16) lag durchschnittlich bei 78% und war signifikant (p=0,020). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten an.
[siRNA KT=*AllStars* Negativkontroll-siRNA; siRNA GNE=*GNE*-spezifische siRNA]

3.6.3 Wirkung der *GNE*-Repression auf die Ausbildung des Anoikis-Phänotyps

Zur Ermittlung der Anoikisrate durch Minderung der *GNE*-Expression wurden die siRNA-behandelten *Capan-1* Wildtypzellen 40h auf polyHEMA-beschichteten Platten in Suspension kultiviert. Nach selektivem Anfärben der Nukleinsäure mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propodiumiodid (PI) wurde der DNA-Gehalt durchflusszytometrisch im FACS untersucht. Entsprechend der Menge an DNA ist bei dieser Methode eine Zuordnung der Einzelzellen zur jeweiligen Zellzyklusphase möglich.

Abbildung 20 zeigt den Effekt des siRNA-vermittelten *Knock-Downs* der *GNE* auf Anoikis-Induktion im Wildtyp aus drei Experimenten. Eine Supprimierung der Enzymexpression durch den Transfer von Target-spezifischer siRNA resultierte in einem im Vergleich zur Negativkontrolle 3,6fachen Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen in der sub-G1 Phase. Dieser Effekt ist signifikant (p=0,019) und erreicht annähernd das Apoptoseniveau, das für *GNE*-defiziente P16-Transfektanden beschrieben wird (4,9facher Anstieg sub-G1 Zellfraktion; Plath et al. 2000). Der via FACS-Messung detektierte Anstieg Anoikis-sensibler Zellen durch RNA-Interferenz verdeutlicht einen distinkten Einfluss der *GNE* auf die Phänotypausprägung in *Capan-1* Pankreaskarzinom-Zellen.

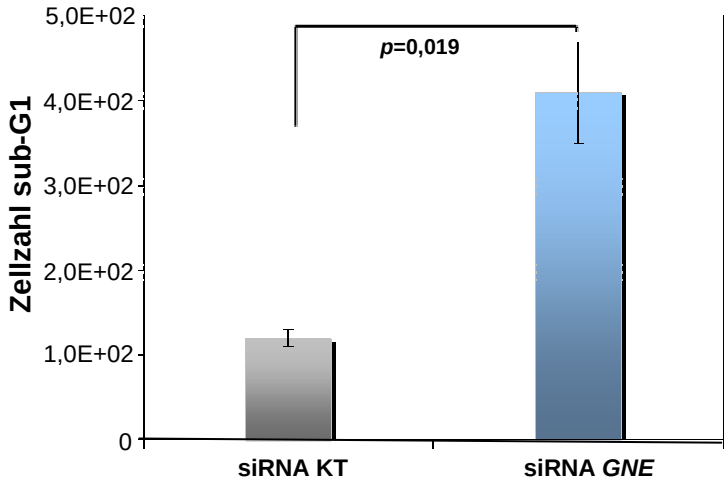


Abb. 20: Wirkung der siRNA-vermittelten *GNE*-Hemmung auf die Ausbildung von Anoikis *Capan-1* Wildtypzellen wurden 72h nach wiederholter Transfektion mit siRNA (400ng, 50nM) für weitere 40h in polyHEMA-beschichtete Platten überführt. Nach PI-Färbung gemäß der Nicoletti-Methode erfolgte die durchflusszytometrische Analyse im FACS. Dargestellt ist die detektierte Anzahl der Zellen in der Apoptose-assoziierten sub-G1 Phase des Zellzyklus durch Applikation *GNE*-spezifischer siRNA im Vergleich zu Negativkontroll-siRNA (*AllStars* Negativkontroll-siRNA, Qiagen). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei Experimenten.
[siRNA KT=*AllStars* Negativkontroll-sRNA; siRNA GNE=*GNE*-spezifische siRNA]

Im Vergleich zum Effekt auf die sub-G1 Phase hatte die gezielte *GNE*-Repression durch RNA-Interferenz auf die weiteren Zellzyklusphasen in Relation zur Transfektionskontrolle einen weniger starken Einfluss (Tab. 6).

Tab. 6: Effekt der *GNE*-siRNA Transfektion auf den Zellzyklus im *Capan-1* Wildtyp Die Tabelle zeigt den prozentualen Anteil (±STABW) von *GNE*- und Negativkontroll-siRNA-behandelten Wildtypzellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen. Dieser wurde über durchflusszytometrische Untersuchung (FACS) PI-markierter Zellen in drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

Zellzyklusphase	*Transfektionskontrolle*	*siRNA GNE*
sub-G1	2,3 ± 1,5	5,7 ± 2,9
G0/G1	73,3 ± 4,0	70,7 ± 3,3
S	8,6 ± 2,4	6,6 ± 2,1
G2/M	15,8 ± 4,4	16,9 ± 3,3

3.7 Microarray-basierte Charakterisierung der *GNE*

Diverse Studien deuten darauf hin, dass das Enzym *GNE* neben seiner Schlüsselstellung bei der Biosynthese von Sialinsäure vielfältige andere Funktionen erfüllen könnte (Wang et al. 2006). Aufgrund der Lokalisierung im Nukleus von Säugerzellen (Krause et al. 2005) wäre eine Beteiligung an transkriptionellen Prozessen denkbar. Dementsprechend sollte untersucht werden, inwieweit das humane Genomprofil von differenzieller *GNE*-Expression abhängt.

Zur Identifizierung von Genen, deren Transkription vom *GNE*-Vorkommen beeinflusst wird, wurden Enzym-defiziente P16-Transfektanden und siRNA-behandelte *Capan-1* Zellen im Vergleich zu Zellen mit erhöhter mRNA-Menge (Mock- und Kontroll-siRNA transfizierte *Capan-1* Pankreaskarzinom-Zellen) über Affymetrix *GeneChips* analysiert.
Das primäre Gütekriterium der Untersuchung lag in der Detektion allgemeingültiger Marker. Daher wurde für die Ermittlung der transkriptionellen Unterschiede zwischen *Capan-1/+P16/-GNE* (P16-Transfektanden) und *Capan-1/-P16/+GNE* (Mock-Kontrolltransfektanden) der kombinatorische, Plattform-übergreifende Ansatz aus 3.1 in die Analyse mit einbezogen. Unter der Annahme konvergenter Validität sollten Messdaten unterschiedlicher Testverfahren (hier unterschiedlicher Microarray-Technologien), die die gleiche Probe abbilden (P16/Mock), hoch miteinander korrelieren und statistisch gesehen übertragbare Resultate liefern. Auf dieser Grundlage wurde dieser Datensatz mit dem Genprofil verglichen, der aus der gezielten *GNE*-Repression im *Capan-1* Wildtyp durch *RNAi* resultiert. Dazu wurden die Transkriptionsdifferenzen zwischen siRNA- und Kontroll-siRNA

behandelten *Capan-1* Zellen aus vier unabhängigen Experimenten auf *Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChips* (Affymetrix) untersucht.

3.7.1 Qualitätskontrolle der Microarray-Daten

Die Qualität der Microarray-Experimente zur Erhebung des Expressionsprofils siRNA-transfizierter *Capan-1* Zellen wurde analog der unter 3.1.1 erläuterten Methode untersucht. Anhand der Ermittlung der Pearson-Korrelation war ein Rückschluss auf die Güte der Microarray-Daten möglich. Diese ergab eine sehr starke Korrelation, dementsprechend eine äußerst hohe Reproduzierbarkeit der *RNAi-GeneChips* im Vergleich zueinander. Der mittlere Korrelationskoeffizient lag bei 0,99. Zur Darstellung der Ähnlichkeit der Microarrays innerhalb der Gruppen siRNA-Kontrolle gegen siRNA-*GNE* wurde ein Korrelationsplot (Abb. 21) erstellt. Die paarweise berechneten Korrelationskoeffizienten sind als Heatmap dargestellt und gegeneinander aufgetragen. Die jeweilige Stärke der Korrelation geht aus dem verwendeten Farbschema hervor. Anhand dessen wird ein großer Zusammenhang innerhalb der Gruppen sowie zwischen den Gruppen deutlich, der auf Unterschieden in der Expression beruht.

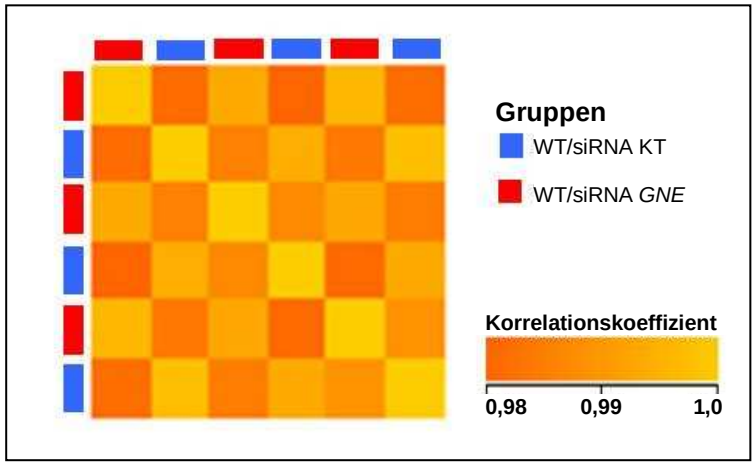


Abb. 21: Qualität der Humangenom *U133 GeneChips* (Affymetrix) für die Genexpressionsstudie des spezifischen *Knock-Downs* der *GNE* in *Capan-1* Pankreaszellen auf Basis der Pearson-Korrelation
Dargestellt ist eine Heatmap (Korrelationsplot) der paarweisen Ermittlung des Korrelationskoeffizienten. Die Farbskala gibt die berechneten Koeffizienten wider, die sich im Bereich sehr guter Übereinstimmung ($r \geq 0{,}8$) bewegen. Die beiden Gruppen *Capan-1* Wildtyp/Kontroll-siRNA (siRNA KT) bzw. *Capan-1* Wildtyp/*GNE*-siRNA sind der Übersichtlichkeit halber farbig gekennzeichnet.
[WT=*Capan-1* Wildtypzellen; blau=*Capan-1* Wildtyp/Kontroll-siRNA; rot=*Capan-1* Wildtyp/*GNE*-siRNA; *U133 GeneChips* n=4]

3.7.2 Statistische Analyse zur Identifizierung differenziell regulierter Gene

Die Signifikanz der Expressionsunterschiede wurde auf Basis des *t*-Tests nach Welch verifiziert und ohne *p*-Wert Korrektur über die *False Discovery Rate* (FDR) ermittelt. Wie aus der Zusammenfassung der Ergebnisse der statistischen Datenprüfung ersichtlich (Tab. 7), konnten im schwächsten Signifikanzbereich (p≤0,05) bei einem *Fold Change* von ≥1,1 eine große Anzahl von 5541 Transkripten gefunden werden, deren Expression sich durch die Applikation von siRNA gegen *GNE* im Vergleich zu Kontrollzellen (Behandlung mit *Allstars* Negativkontroll-siRNA, Qiagen) verändert. Allerdings scheint der spezifische *Knock-Down* weniger *Probe Sets* mit großen transkriptionellen Unterschieden hervorzubringen. Dementsprechend konnten bei einem *p*-Wert kleiner 0,05 und einem *Fold Change* über 3,0 in *Capan-1* Zellen mit gezielter *GNE*-Repression nur 17 (Tab. 7) *Probe Sets* detektiert werden. Im Gegensatz dazu ist der Anteil differenziell regulierter Transkripte zwischen *GNE*-defizienten *Capan-1*/+P16 und entsprechenden Mock-Kontrollen, der über die beiden Affymetrix-Technologien *ST*- und *U133-GeneChips* aus 3.1.2 erfasst wurde, deutlich höher. Die Unterschiede sind womöglich auf die beiden experimentellen Systeme zurückzuführen, die eine reduzierte *GNE* mRNA-Menge hervorbringen. So beruht im Fall von P16-transfizierten Zellen das verminderte Enzymvorkommen auf dem stabilen, Plasmid-basierten Transfer des Tumosuppressors $p16^{INK4a}$ in *Capan-1*. Im Gegensatz dazu ist der reprimierende Effekt durch die Applikation synthetischer siRNA transient und wird nur zeitlich begrenzt induziert.

Tab. 7: Zusammenfassung der statistischen Ermittlung differenziell regulierter Transkripte durch *RNAi* gegen *GNE* in *Capan-1* Pankreaskarzinom-Zellen auf Affymetrix *GeneChips U133* Dargestellt sind die *Probe Sets* mit signifikanten Expressionsunterschieden zwischen *GNE*-siRNA und Negativkontroll-siRNA (*AllStars* Negativ-siRNA, Qiagen) transfizierten Zellen. Die Analyse der statistischen Signifikanz erfolgte auf Basis des *t*-Tests nach Welch ohne *p*-Wert Korrektur. [Affymetrix *GeneChip Human Genome U133*, n=4]

Fold Change	***p-Wert***					
	alle *p*	***p* ≤ 0,05**	***p* ≤ 0,02**	***p* ≤ 0,01**	***p* ≤ 0,005**	***p* ≤ 0,001**
alle FC	54675	5832	3151	1947	1166	310
≥ 1,1	18573	5541	3090	1913	1154	309
≥ 1,5	1128	992	819	640	479	155
≥ 2,0	144	138	128	11	96	39
≥ 3,0	17	17	17	16	15	9

3.7.3 Extraktion von Markergenen mit putativ *GNE*-abhängiger Transkriptionsregulierung

Zur Selektion valider und reproduzierbarer Kandidatengene, deren Transkription potenziell mit der Verfügbarkeit der *GNE* korreliert, wurde ein erweiterter Microarray-Ansatz vorgesehen, der schematisch in Abbildung 22 widergegeben ist. Dieser beinhaltete zum einen die Berücksichtigung der beiden unabhängigen *GeneChip*-Technologien *Human Genome U133* und *Human Gene ST* von Affymetrix (siehe 3.1) und zum anderen die Einbeziehung der zwei *in vitro* Modelle für differenzielle *GNE*-Expression (siRNA-*GNE* vs. siRNA-Kontrolle, P16- vs. Mock-Transfektanden).

Für die Identifizierung übertragbarer Marker wurden zunächst Transkripte mit einem *Fold Change* über 1,5 gesucht, die zwischen *GNE*-defizienten P16- und Mock-Transfektanden auf beiden Affymetrix-Plattformen differenziell reguliert sind. Um die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Chipformate zu gewährleisten, führt die verwendete Auswertesoftware *GeneSpring GX* einen bioinformatischen Translationsprozess durch. Da die Differenzen der verwendeten Microarray-Technologien in der Gesamtmenge repräsentierter *Probe Sets* bzw. der Anzahl der Sonden pro Gen liegen, impliziert der Vorgang primär eine artifizielle, formale Angleichung der generierten Genlisten. In der Schnittmenge beider Datensätze konnten auf diese Weise 6533 differenziell regulierte Transkripte gefunden werden (Abb. 22).

Parallel dazu wurde das Genprofil von *Capan-1* Zellen auf *U133-GeneChips* (n=4) untersucht, deren *GNE*-Defizit auf spezifischem, siRNA-vermittelten *Knock-Down* beruht. Für die Untersuchung wurden nur die Transkripte berücksichtigt, die im schwächsten Signifikanzniveau ($p \leq 0{,}05$) einen *Fold Change* über 2,0 aufwiesen. Diesen Kriterien entsprachen 138 *Probe Sets* (Tab. 7).

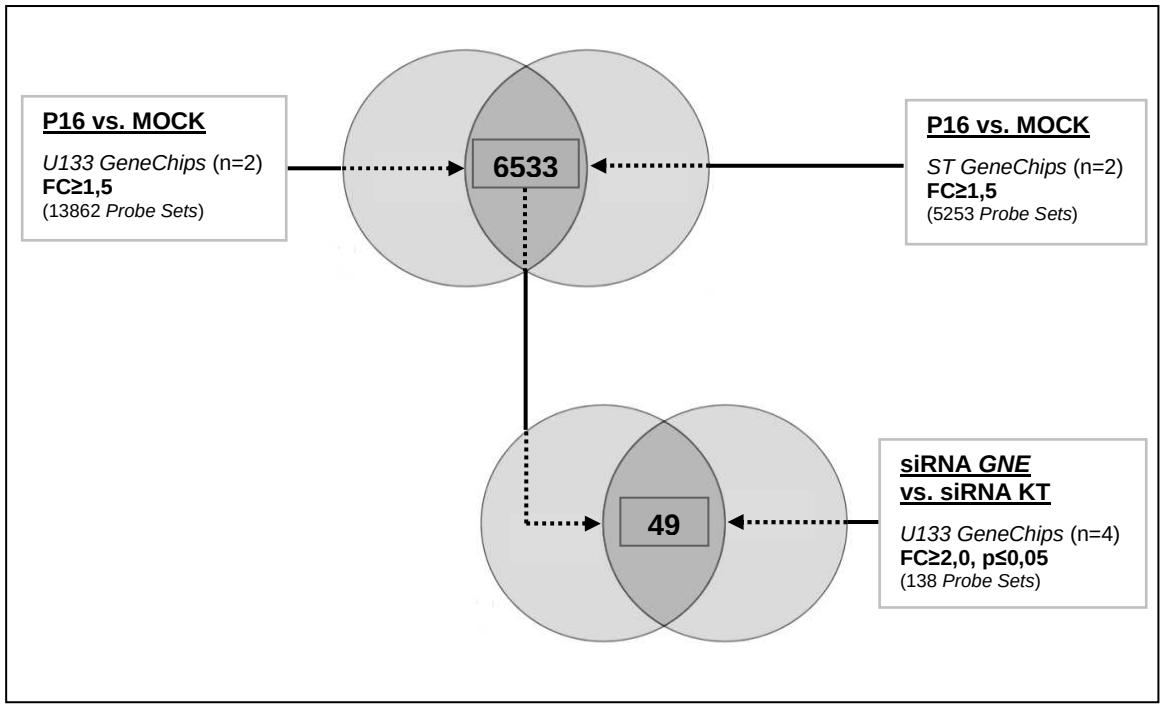


Abb. 22: Schema der Microarray-basierten Extraktion putativer Kandidatengene mit *GNE*-abhängiger Transkriptionsregulierung Zur Selektion von Klassifikatoren wurden zwei Vergleiche von *GNE*-defizienten *Capan-1* Zellen gegen Zellen mit höherem Transkriptionsniveau durchgeführt. Für die Genexpressionsanalyse von *Capan-1*/+P16 (P16-Transfektanden) gegen *Capan-1*/-P16 (Mock-Transfektanden) wurden in der Schnittmenge beider Affymetrix-Plattformen *U133*- und *ST-GeneChips* (n=2) 6533 *Probe Sets* gefunden, die einen *Fold Change* ≥1,5 aufweisen. Bei der Untersuchung des Transkriptionsprofils von *GNE*-siRNA gegen Negativkontroll-siRNA behandelten *Capan-1* Zellen auf *U133*-Arrays (n=4) wurden für einen *Fold Change* ≥2,0 und *p*-Wert ≤0,05 138 *Probe Sets* identifiziert. Beim Vergleich der beiden Genlisten konnten insgesamt 49 Transkripte gefunden werden, die 34 annotierten Genen entsprechen.

In der Schnittmenge zwischen den 6533 *Probe Sets* des Vergleichs P16/Mock auf *U133*- bzw. *ST*-Arrays (n=2) und der 138 Transkripte umfassenden Liste des *RNAi*-Datensatzes wurden letztlich 49 differenziell regulierte Transkripte identifiziert. Diese entsprechen 34 annotierten Genen.

Insgesamt wurde die finale Selektion auf 9 Kandidatengene beschränkt, die aufgrund ihres *Fold Changes* und ihrer statistischen Signifikanz (*p*-Wert) im *RNAi*-Datensatz auffielen. In Enzym-defizienten siRNA- und P16-transfizierten *Capan-1* Zellen werden *COL13A1*, *PLAT*, *PRTFDC1* und *VPS24* im Vergleich zu siRNA- bzw. Mock-Kontrolltransfektanden vermindert transkribiert. Dagegen werden *ASNS, CHAC1, JDP2, PSAT1* und *TRIB3* entsprechend verstärkt exprimiert.

Umfassende Literaturrecherchen ergaben, dass mindestens fünf dieser 9 Gene mit Apoptose- bzw. Anoikisprozessen verknüpft sind, vier widerum werden mit ER-Stress Phänomenen bzw. der sog. „Unfolded Protein Response“ (UPR) in Verbindung gebracht. Eine Zusammenfassung der Genselektion auf Basis dieser Parameter zeigt Tabelle 8 anhand des *Knock-Down*-Datensatzes.

Tab. 8: Auswahl von 9 Genen, die durch *GNE* reguliert sein könnten Die Selektion erfolgte anhand der über Microarray-Analyse ermittelten Signalunterschiede (FC) und *p*-Werte im *RNAi*-Datensatz. Zusätzlich gibt die Zusammenstellung die Transkriptionsrichtung (Tendenz) sowie den Bezug des jeweiligen Markers zu Apoptose- bzw. ER-Stress-Prozessen (X) an.
[↓=Genexpression in *Capan-1*/*GNE*-siRNA niedriger als in *Capan-1*/Kontroll-siRNA; ↑=Genexpression in *Capan-1*/*GNE*-siRNA höher als in *Capan-1*/Kontroll-siRNA]

Gen-symbol	Genname	Tendenz	FC	*p*-Wert	Apoptose	ER-Stress
ASNS	*Asparagine Synthetase*	↑	3,89	3,94E-04		X
CHAC1	*ChaC, Cation Transport Regulator Homolog 1 (E. coli)*	↑	5,26	2,85E-04	X	X
COL13A1	*Collagen, Type XIII, Alpha 1*	↓	2,26	6,41E-04		
JDP2	*Jun Dimerization Protein 2*	↑	2,52	5,00E-03	X	X
PLAT	*Plasminogen Activator, Tissue*	↓	2,51	3,00E-03	X	
PRTFDC1	*Phosphoribosyl Transferase Domain Containing 1*	↓	2,31	5,00E-03		
PSAT1	*Phosphoserine Aminotransferase 1*	↑	2,56	8,28E-04		
TRIB3	*Tribbles Homolog 3 (Drosophila)*	↑	2,84	2,37E-04	X	X
VPS24	*Vacuolar Protein Sorting 24 Homolog (S. cerevisiae)*	↓	2,04	7,00E-03	X	

3.7.4 Validierung des Profils *GNE*-assoziierter Gene über *Real-Time* PCR

Zur Validierung des über Affymetrix-Analyse detektierten Expressionsprofils sollten die 9 Gene überprüft werden, die durch die selektive Hemmung von *GNE* durch *RNAi* differenziell reguliert werden und anhand ihres Signalverhältnisses (FC) sowie ihrer Signifikanz ausgewählt wurden. Die Resultate der *TaqMan*-Validierung der Genselektion einschließlich *GNE* sind in Abbildung 23 dargestellt. Die relative Expression wurde anhand der $\Delta\Delta C_T$-Methode berechnet.

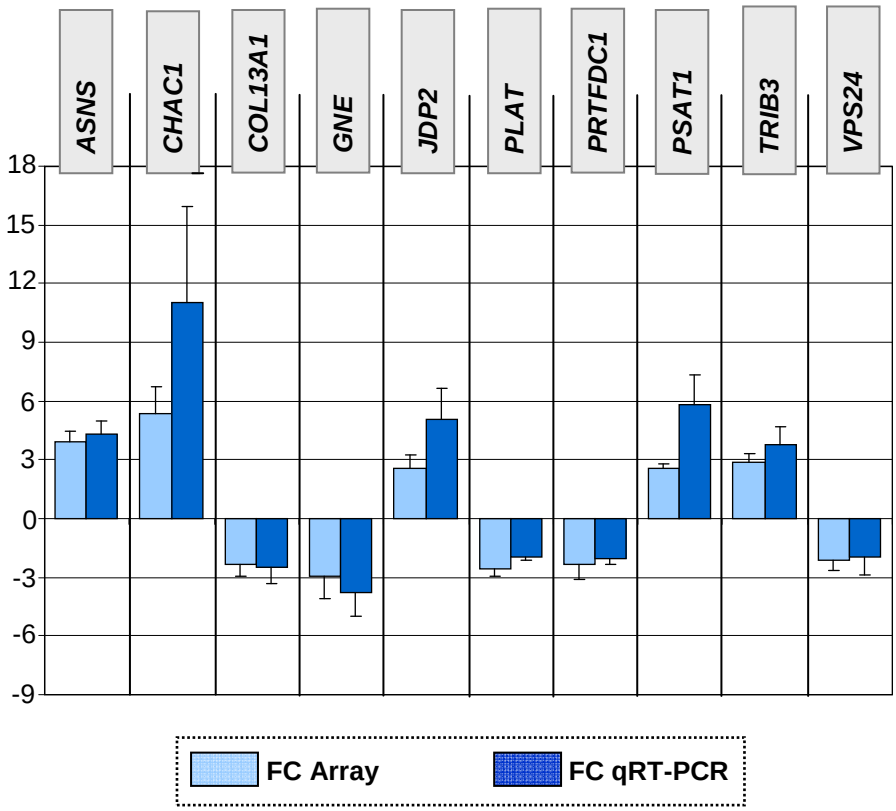


Abb. 23: Bestätigung der Microarray-Daten über quantitative *Real-Time* PCR anhand des jeweils ermittelten *Fold Changes* Dargestellt sind die Expressionsunterschiede der 9 ausgewählten Kandidatengene einschließlich *GNE*, die über *GeneChip*-Analyse (hellblaue Balken) und via qRT-PCR (dunkelblaue Balken) für den Vergleich *Capan-1*/*GNE*-siRNA gegen *Capan-1*/Kontroll-siRNA (n=4) detektiert wurden. Für die qRT-PCR wurden jeweils 50ng cDNA als Triplikat mit Gen-spezifischen Primern amplifiziert. Die Expression der Markergene wurde auf den Housekeeper β-Aktin normiert. Die relative Expression wurde auf Grundlage der $\Delta\Delta C_T$-Methode ermittelt.

Die über Microarray-Analyse detektierte Transkriptionsrichtung der ausgewählten Gene konnte über quantitative RT-PCR bestätigt werden. In Bezug zur *GNE*-Expression ist das Transkriptionsniveau der Gene *ASNS*, *CHAC1, JDP2, PSAT1* und *TRIB3* erhöht; die mRNA-Menge von *COL13A1, PLAT, PRTFDC1* und *VPS24* ist in *GNE*-defizienten siRNA-Transfektanden vermindert. In einigen Fällen sind Schwankungen der Genexpression im Vergleich der beiden Methoden erkennbar. Diese können zum einen auf den Unterschieden der reversen Transkription beruhen, da im *GeneChip*-Experiment Oligo (dT)-Primer und für die RT-PCR Zufallshexamer-Primer eingesetzt wurden. Zum anderen wurden die genspezifischen Primer für die *TaqMan*-PCR aus dem offenen Leserahmen der jeweiligen mRNA gewählt, während die Oligonukleotid-Sonden des *U133*-Chips zur Analyse der siRNA-behandelten Zellen aus dem 3´-Transkriptbereich stammen.

3.7.5 Einfluss der *GNE* auf die Expression ER-Stress relevanter Schlüsselelemente

Die vorliegenden Ergebnisse der erweiterten Microarray-Analyse deuten auf eine distinkte Involvierung der *GNE* in die transkriptionelle Regulierung ER-Stress assoziierter Gene hin. Um die Zusammenhänge zu konkretisieren, wurde über quantitative *Real-Time* PCR die relative mRNA-Menge weiterer wichtiger Elemente mit zentraler Bedeutung für diesen Prozess evaluiert. Diese traten nicht in der Schnittmenge beider *in vitro* Modelle für differenzielle *GNE*-Transkription auf.

GRP78 – auch als *BiP* bekannt - ist ein ER-ständiges Chaperon und gilt als wichtigster Modulator unterschiedlicher Effektorantworten bei ER-Stress (Li et al. 2006). Zur Untersuchung einer möglichen Abhängigkeit der *BiP*-Expression vom *GNE*-Vorkommen wurden Transkriptionsunterschiede zwischen *Capan-1*/siRNA-*GNE* und *Capan-1*/siRNA-Kontrolle (n=4) analysiert. Das Resultat der *TaqMan*-PCR ist in Abbildung 24 widergegeben und zeigt keinen dahingehenden Einfluss der *GNE*.

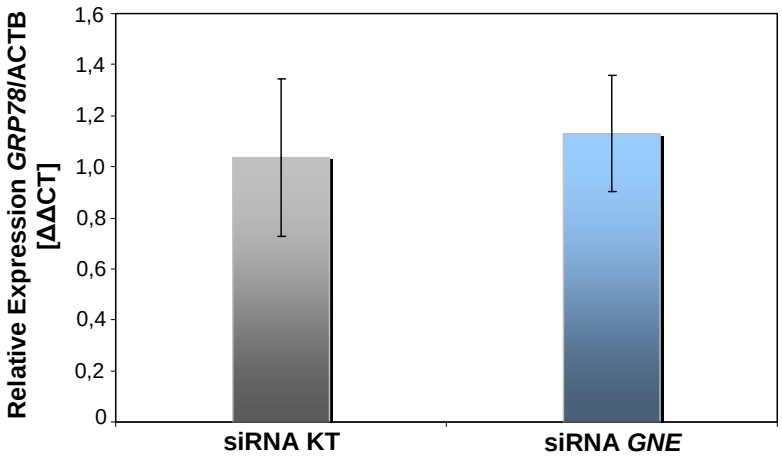


Abb. 24: siRNA-vermittelte *GNE*-Hemmung zeigt keine Veränderung auf die Expression des ER-Chaperons *GRP78* Die relative mRNA-Menge wurde in cDNA aus 4 unabhängigen siRNA-Experimenten im Vergleich zu Kontroll-siRNA (*AllStars* Negativkontroll-siRNA, Qiagen) über quantitative RT-PCR untersucht und auf Basis der $\Delta\Delta C_T$-Methode quantifiziert. Die Normierung erfolgte in Bezug auf β-Aktin.
[siRNA KT=*AllStars* Negativkontroll-siRNA; siRNA GNE=*GNE*-spezifische siRNA]

Im Gegensatz dazu korreliert die gezielte *GNE*-Repression durch *RNAi* mit der Erhöhung der relativen Expression des Transkriptionsfaktors *DDIT3* bzw. *CHOP* (Abb. 25). Dieser reguliert bei anhaltendem ER-Stress vornehmlich pro-apoptotische Reaktionen, die in Zellzyklusarrest resultieren (Bento et al. 2009). Der Effekt ist signifikant (p=0,002) und manifestiert sich in einem 3,6fachen Unterschied zwischen Kontrollzellen (rel. Expression 1,05±0,35) und *GNE*-siRNA transfizierten *Capan-1* Zellen (3,82±0,68).

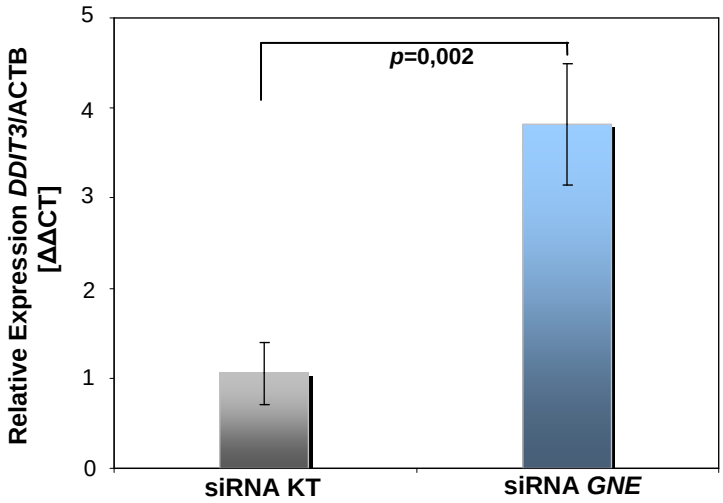


Abb. 25: Quantifizierung der *DDIT3* mRNA-Expression durch spezifischen *Knock-Down* der *GNE* Die mRNA-Menge von *DDIT3* wurde zwischen *Capan-1*/Kontroll-siRNA und *Capan-1/GNE*-siRNA aus vier Experimenten über quantitative *Real-Time* PCR ermittelt. Die relative mRNA-Menge wurde in Relation zur β-Aktin Transkription erhoben. Die Signifikanz der differenziellen Expression zwischen den Gruppen wurde über den Student´schen *t*-Test berechnet (p=0,002).
[siRNA KT=*AllStars* Negativkontroll-siRNA; siRNA GNE=*GNE*-spezifische siRNA]

3.7.6 *In vivo* Expression der identifizierten Marker im humanen Pankreasgewebe: Evaluierung über die online-Datenbank *ONCOMINE*

Aufgrund mangelnder Verfügbarkeit an Pankreasgewebe sollte der ermittelte Expressionstrend der ausgewählten Gene anhand publizierter *in vivo* Microarray-Studien validiert werden. Dazu wurden die identifizierten Gene mit *GNE*-abhängiger Transkription mit Daten der online-verfügbaren Plattform *ONCOMINE* (www.oncomine.org*)* verglichen.

Abbildung 26 visualisiert die Expression der Kandidatengene - einschließlich *GNE* - in unterschiedlichen Chip-basierten Untersuchungen des transformierten Pankreas anhand von Boxplots, die der Datenbank entnommen wurden. Mit Ausnahme von *JDP2* und *PRTFDC1* wurden für alle putativ *GNE*-abhänige molekulare Marker signifikante Datensätze für den Vergleich zwischen Normalgewebe des Pankreas und Pankreas–Adenokarzinom gefunden.
Die Details der jeweiligen Studien, aus denen die Daten stammen, sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

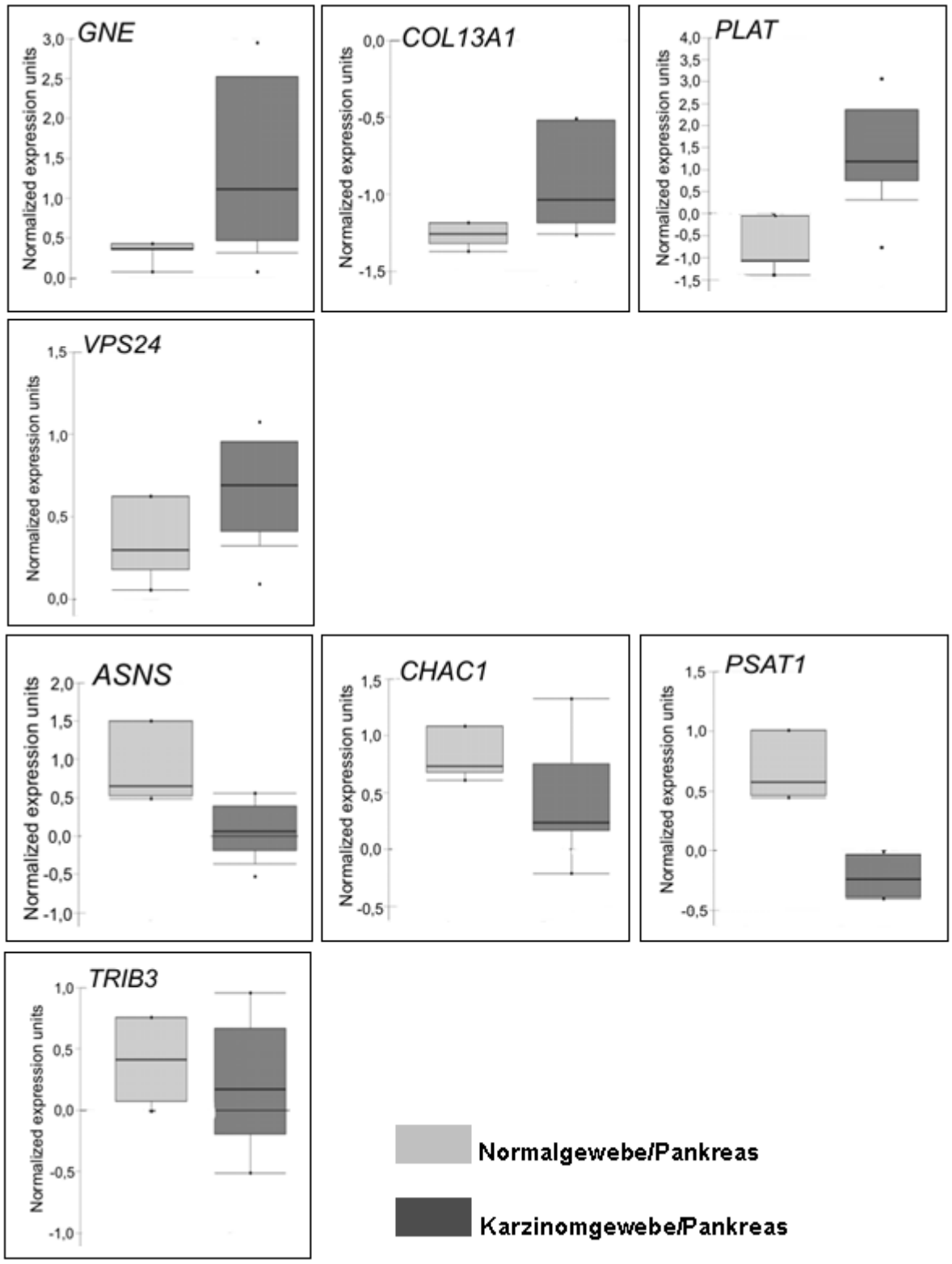


Abb. 26: Expression der über Microarray-Analyse identifizierten Kandidatengene mit potenzieller Abhängigkeit zur *GNE* im transformierten Pankreas Dargestellt ist das über *ONCOMINE* extrahierte Transkriptionsprofil der selektierten Marker zwischen Normalgewebe im Vergleich zu Pankreas-Adenokarzinomgewebe unterschiedlicher Anzahl aus verschiedenen, publizierten Microarray-Studien.
[Quelle: *ONCOMINE*-Datenbank; hellgrau=Pankreas-Normalgewebe; dunkelgrau=Pankreaskarzinom-Gewebe]

Tab. 9: Übersicht der publizierten Studien, in denen normales und malignes Pankreasgewebe untersucht wurde und in denen die Kandidatengene, die *in vitro* als abhängig von der *GNE*-Expression ermittelt wurden, als differenziell exprimiert beschrieben sind Die Expressionsdaten wurden der *ONCOMINE*-Datenbank entnommen. Angegeben ist die Anzahl der für die jeweilige Studie verwendeten Normal- und Krebsgewebeproben, das Signifikanzniveau (*p*-Wert) sowie der detektierte Expressionstrend von Normal- gegen Tumorgewebe.
[↓=Genexpression Normalgewebe niedriger als Tumor; ↑=Genexpression Normalgewebe höher als Tumor]

Gen-symbol	Studie	n=Normal-gewebe	n=Pankreas-gewebe	Trend Normal vs. Tumor	*p*-Wert
ASNS	Logsdon et al. 2003	5	10	↑	7,00E-03
CHAC1	Buchholz et al. 2005	6	8	↑	3,10E-02
COL13A1	Segara et al. 2005	6	11	↓	2,00E-03
GNE	Iacobuzio et al. 2003	5	11	↓	3,00E-03
PLAT	Iacobuzio et al. 2003	5	11	↓	1,40E-04
PSAT1	Segara et al. 2005	6	11	↑	3,38E-05
TRIB3	Buchholz et al. 2005	6	8	↑	2,35E-01
VPS24	Iacobuzio et al. 2003	5	11	↓	2,20E-02

Über den Vergleich mit den verfügbaren Microarray-Datensätzen humaner Pankreasgewebe der online-Datenbank *ONCOMINE* konnte das Genexpressionsprofil von 8 der 10 *in vitro* identifizierten Kandidatengene (einschließlich *GNE*) verifiziert werden.

Iacobuzio et al. (2003) konnten zeigen, dass die *GNE* im Normalgewebe im Vergleich zu Krebsproben deutlich und signifikant vermindert transkribiert wird (*p*=3,00E-03). Darüber hinaus fällt auf, dass alle weiteren Gene, deren Expression in *GNE*-defizienten P16- und siRNA-transfizierten *Capan-1* Zellen reduziert ist, wie *COL13A1*, *PLAT* und *VPS24*, auch im normalen Pankreasgewebe weniger stark exprimiert wird als im transformierten Gewebe. Andererseits werden die Gene, die in den behandelten Zellen *in vitro* transkriptionell aktiviert wurden auch im Karzinom vermehrt transkribiert.

4. Diskussion

Die Metastasierung transformierter Zellen wird häufig durch die Ausbildung von Anoikisresistenz begünstigt. Anoikis stellt eine Spezialform der Apoptose dar, die durch den Verlust des Zellkontakts zur extrazellulären Matrix induziert wird. Plath et al. (2000) konnten zeigen, dass die Suszeptibilität für Anoikis in der Pankreaskarzinom-Zelllinie *Capan-1* durch die Reexpression des Zellzyklusinhibitors $p16^{INK4a}$ wiederherstellbar ist. Diese Beobachtung korreliert mit einer transkriptionellen Erhöhung des Integrins $\alpha_5\beta_1$. Unterschiedliche Arbeiten belegen, dass posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierung oder Sialylierung, die Integrinfunktion modulieren und mit einem malignen Phänotyp assoziiert sind.

Vor diesem Hintergrund war das Ziel vorliegender Arbeit, die molekularen Mechanismen, die der $P16^{INK4a}$-vermittelten Anoikisinduktion zugrunde liegen, auf Basis des Expressionsprofils Sialylierungs-relevanter Moleküle in *Capan-1* Pankreaskarzinom-Zellen zu analysieren und funktionell zu charakterisieren.

4.1 Expressionsanalyse wichtiger Elemente des Sialinsäuremetabolismus in *Capan-1* Pankreaskarzinom-Zellen

Neuere Erkenntnisse konnten bereits einen distinkten Einfluss des Tumorsuppressors $P16^{INK4a}$ auf Glykosylierung – eine bedeutende posttranslationale Modifikation, die etwa die Hälfte aller eukaryotischen Proteine und ca. 80% aller Zelloberflächenproteine aufweisen (Gu et al. 2009) – demonstrieren (Andre et al. 2007). Membrangebundene Kohlenhydrate bzw. die Zuckeranteile von Glykokonjugaten nehmen eine zentrale Rolle bei der Interaktion der Zelle mit der extrazellulären Umgebung ein. Dementsprechend sind Glykane in vielfältigste biologische Prozesse, wie Zelladhäsion, Signaltransduktion und Immunantwort, involviert, tragen darüber hinaus zur strukturellen Stabilität und Aktivität von Proteinen bei (Varki 1993). In diesem Zusammenhang untersuchten Andre et al. durch die Kombination unterschiedlicher Verfahren das Glykanprofil P16-positiver *Capan-1* Pankreaskarzinom-Zellen (Andre et al. 2007). Neben Microarray-basierter Expressionsanalyse ausgewählter Glykosyltransferasen kamen sowohl 2D-Chromatographie als auch eine umfassende durchflusszytometrische Detektion mittels Zucker-spezifischer Pflanzenlektine zum Einsatz. Bei dieser Untersuchung konnten bedeutende quantitative und qualitative Unterschiede in der membranständigen Oligosaccharidzusammensetzung festgestellt werden.

In Erweiterung der Studie von Andre et al. wurde im Rahmen dieser Arbeit das Gesamt-Transkriptom Anoikis-sensibler P16-Transfektanden (*Capan-1/+P16/+Anoikis*) im Vergleich zum Mock-Kontrollklon (*Capan-1/-P16/-Anoikis*) von *Capan-1* untersucht. Der Schwerpunkt lag in der Identifizierung und Selektion Anoikis-assoziierter Klassifikatoren mit spezifischem Bezug zum Sialinsäuremetabolismus. Auf der Grundlage eines kombinatorischen Ansatzes zweier unterschiedlicher Microarray-Technologien von Affymetrix wurde eine Plattform-neutrale und damit potenziell übertragbare Gensignatur gefunden. Diese basierte auf der Genexpressionsanalyse der *Capan-1* Mutanten unterschiedlicher Zellkulturchargen und -passagen sowohl auf *U133*- als auch auf *ST-GeneChips* (n=2).

Vor der statistischen Datenprüfung wurde zunächst die Qualität der Experimente evaluiert. Dies gilt als essenzieller Schritt bei der Auswertung von Microarray-Experimenten, da bereits ein Chip von minderer Qualität die Aussagekraft der Resultate reduzieren und verfälschen könnte (Heber et al. 2006). Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit wird charakteristischerweise der Pearson Korrelationskoeffizient angewendet, der als robustester Algorithmus in diesem Zusammenhang gilt (Hardin et al. 2007). Dieser ergab eine hohe Güte der einzelnen *GeneChips* der jeweiligen Plattform im paarweisen Vergleich zueinander.

Die grundlegenden Unterschiede der beiden Affymetrix-Technologien, die vorrangig im Sondendesign und der Art der hybridisierten Nukleinsäure (*U133-GeneChip*: *antisense*-cRNA; *ST-GeneChip*: *sense*-cDNA) liegen, wurden anhand der statistischen Verteilung der *Probe Sets* deutlich. Im Bereich hoher transkriptioneller Unterschiede (FC) wurde über beide eingesetzte Plattformen eine unterschiedliche Menge differenziell regulierter Transkripte detektiert. Die Identifizierung von Klassifikatoren über unabhängige Microarray-Systeme gilt im Hinblick darauf als valide Methode zur Selektion reproduzierbarer, molekularer Marker(Warnat et al. 2005).

Um besonders aussagekräftige, Anoikis-relevante Kandidatengene zu finden, wurde daher via Plattform-übergreifendem Ansatz im Genprofil von P16- und Mock-Transfektanden speziell nach Transkripten mit großen Expressionsunterschieden gesucht. Der Fokus lag dabei bewusst auf einer kleinen Auswahl von Genen, die die potenziell bedeutsamste Rolle bei der Ausprägung des apoptotischen Phänotyps spielen könnten. Auf diese Weise wurden beim Vergleich differenziell regulierter Gene 5 Marker herausgefiltert, die über beide Technologien die höchsten *Fold Changes* aufwiesen. Bei den identifizierten Genen handelte es sich um *DAPK1, FSTL1, GNE, LDHB* und *SERPINB2*. *DAPK1* und *GNE* werden in *Capan-1/+P16/+Anoikis* stark vermindert exprimiert, während die Expression von *FSTL1, LDHB* und *SERPINB2* deutlich erhöht ist.

Ein Überblick über die allgemeinen Funktionen der Kandidatengene konnte über eine *GO*-Analyse gewonnen werden. Es zeigte sich, dass innerhalb der relevanten Kategorien „biological process“ und „molecular function“ zumindest *DAPK1* und *SERPINB2* deutlich mit

Apoptose in Verbindung stehen. Die nachfolgende Literaturrecherche ergab eine unterschiedlich hohe Korrelation der selektierten Marker mit apoptotischen Vorgängen im Kontext von Tumorerkrankungen. Im Folgenden sollen daher die Microarray-Ergebnisse der ausgewählten Transkripte im Hinblick auf bereits veröffentlichte Befunde bewertet werden.

Über die funktionelle Relevanz der *FSTL1* im Krebs war bislang wenig bekannt. Unterschiedliche Studien beschreiben eine reduzierte Transkription in verschiedenen humanen Tumorzelllinien (Mashimo et al. 1997; Sumitomo et al. 2000). Chan et al. konnten in einer aktuellen Untersuchung (2008) zeigen, dass eine gezielte Überexpression in Ovarialkarzinomzellen mit einer deutlich geringeren Proliferationsrate sowie verminderter Zellmigrations- und Invasionsfähigkeit korreliert. In Übereinstimmung mit der erhöhten Transkriptmenge von *FSTL1* in Anoikis-empfindlichen P16-transfizierten *Capan-1* Zellen war dies mit einem deutlichen Anstieg apoptotischer Zellen in der sub-G1 Phase des Zellzyklus verbunden. Der negative Effekt auf die Überlebensfähigkeit der Zellen beruht offensichtlich auf der distinkten Aktivierung wichtiger Elemente des Zelltod-fördernden, extrinsischen Signalweges. In einem qRT-PCR basierten Verfahren stellten Chan et al. die signifikante Expression des Zelltodrezeptors *FAS* und seines Liganden *FASL* fest, konnten darüber hinaus auch eine vermehrte Transkription wichtiger Effektorcaspasen (Caspase-3, -7) nachweisen.

Die Lactat-Dehydrogenase B *(LDHB)* katalysiert vorwiegend die Konversion von Lactat zu Pyruvat, das als energiereicher Nährstoff essenziell für das Wachstum gesunder Zellen verantwortlich ist. In unterschiedlichsten Tumoren führt die *de novo* Methylierung von Promotorbereichen des *LDHB*-Gens zur effektiven Expressionsreduzierung des Enzyms (Balinsky et al. 1983; Kawamoto 1994; Koukourakis et al. 2005), die mit einer Erhöhung des metastasierenden Potenzials einhergeht (Leiblich et al. 2006). Eine gesteigerte *LDHB*-Transkription bewirkt in malignen Zellen, wie in P16-substituierten *Capan-1* Pankreaskarzinom-Zellen, im Unterschied zu normalen Zellen dagegen eine Induktion von Apoptose und Tumorsupprimierung (Thangaraju et al. 2009). Dieser Effekt beruht hauptsächlich auf der Pyruvat-bedingten Hemmung der Histondeacetylase (Thangaraju et al. 2009) und einer damit verbundenen selektiven Veränderung der Expression von Proteinen, die den mitotischen Zellzyklus regulieren (Huang et al. 2009; Sambuccetti et al. 1999).

SERPINB2, das auch als Plasminogen-Aktivator Inhibitor 2 (*PAI-2*) bekannt ist, gehört zur Proteaseinhibitor-Familie. Die grundlegende Funktion des Proteins liegt in der Hemmung des Plasminogenaktivators, der für die Auflösung von Blutgerinnseln verantwortlich ist (Dougherty et al. 1999). Es ist bekannt, dass das Plasminogenaktivator-/Plasmin-System außerdem eine bedeutende Rolle für das Tumorwachstum, die Invasion und Metastasierung spielt (Duffy 2001). Dies liegt hauptsächlich in der Funktion des Plasminogenaktivators begründet, der die Konversion von Plasmin zu aktivem Plasminogen katalysiert.

Plasminogen seinerseits bewirkt die Degradierung einer Vielzahl von Proteinen der extrazellulären Matrix, was die Tumorausbreitung begünstigt. Die Aktivität des Plaminogenaktivators vom Urokinase-Typ wird effektiv durch zwei Inhibitoren, den Plasminogen-Inhibitor 1 *(PAI-1)* und 2 *(PAI-2)*, reguliert. Eine verstärkte Expression von *PAI-2* korreliert mit einer guten Überlebensprognose von Krebspatienten (Foeckens et al. 1995) und ist - analog zur erhöhten *SERPINB2*-Expression in *Capan-1/+P16/+Anoikis – in vivo* mit Apoptose assoziiert (Suwa et al. 2008).

Die duale physiologische Rolle der Zelltod-assoziierten Proteinkinase 1 (*DAPK1*) als Tumorsuppressor und Apoptoseinduktor gilt als etabliert (Gade et al. 2008). Daher ist eine verminderte Expression - anders als in Anoikis-suszeptiblen P16-transfizierten *Capan-1* Zellen – im Allgemeinen nicht mit Apoptose assoziiert. Vielmehr führt die in vielen Krebsarten auf Promotor-Hypermethylierung zurückzuführende Transkriptionsminderung zu einem gesteigerten Metastasierungs- und Invasionspotenzial (Dansranjavin et al. 2006). Im Gegensatz dazu konnten Jin et al. in zwei unabhängigen Studien zeigen, dass eine gezielte *DAPK1*-Supprimierung über *antisense*-cDNA in unterschiedlichen Zelllinien und Primärzellen analog zu *Capan-1/+P16* Zellen im Zelltod resultiert (Jin et al. 2001; Jin et al. 2003). Das Protein triggert womöglich bedingt durch seine komplexe multimere Struktur abhängig vom apoptotischen Stimulus und dem zellulären Kontext verschiedene Effektorantworten, die das Zellschicksal bestimmen (Jin et al. 2003).

Die Tatsache, dass die Mehrzahl der selektierten Gene einen starken Zusammenhang mit Zelltod-relevanten Prozessen aufweisen, bestätigt zum einen die Validität der Marker für Anoikis und belegt zum anderen die Eignung der Pankreaskarzinom-Zelllinie als spezifisches Modellsystem zur Untersuchung der zugrundeliegenden molekularen Zusammenhänge. Überdies wird deutlich, dass die *in vitro* identifizierten Transkripte auch im humanen malignen Gewebe von Bedeutung sind.

Von allen Genen mit funktioneller Relation zum Sialinsäurestoffwechsel zeigte die UDP-*N*-Acetylglukosamin 2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamin-Kinase *(GNE)* mit einer signifikanten Expressionsminderung in $P16^{INK4a}$-substituierten Zellen (FC *U133-GeneChip*=139,28; FC *ST-GeneChip*=44,77) das herausragendste differenzielle Regulierungsmuster, das über *TaqMan*-PCR unter Einbeziehung des *Capan-1* Wildtyps bestätigt werden konnte. Die *GNE* ist ein zytosolisches, bifunktionelles Enzym, das durch seine Schlüsselstellung für die Sialinsäurebiosynthese bekannt ist (Hinderlich et al. 1997; Stäsche et al. 1997). Die zentrale Bedeutung der *GNE* beruht auf der Katalyse der beiden ersten und gleichzeitig Geschwindigkeits-bestimmenden Schritte dieses Stoffwechselweges, der zur Produktion von Neu5Ac führt und damit die Bereitstellung des Vorläufers aller natürlich vorkommenden Sialinsäuren sichert. Sialinsäuren stellen eine große Familie von Neuraminsäurederivaten dar, die terminal an Glykokonjugate gebunden sind (Varki et al. 2008). Aufgrund der

exponierten Position sind diese sauren Zucker an allen Interaktionen des Glykans direkt beteiligt und spielen demzufolge eine entscheidende Rolle für viele biologische Abläufe auf der Zelloberfläche. Neben dem hohen Stellenwert für die Sialinsäurebiosynthese ist die *GNE* bislang wenig charakterisiert. Unterschiedliche Hinweise deuten allerdings auf eine Multifunktionalität des Proteins hin (Krause et al. 2005; Wang et al. 2006; Weidemann et al. 2009). Auf dieser Basis wurde im weiteren Verlauf der Arbeit die funktionelle Relevanz der *GNE* für Anoikis im Detail untersucht.

4.2 Rolle der *GNE* in Tumorzelllinien und im Krebs

Insbesondere *in vitro* scheint die *GNE*-Expression in transformierten Pankreaszellen von Bedeutung zu sein. Durch den Vergleich mit einer umfangreichen Untersuchung von Wooster et al. (2008) wurde anhand der Microarray-basierten Analyse von Genomprofilen unterschiedlichster Krebszelllinien, die über die online-Datenbank *ONCOMINE* abrufbar sind, eine hervorragende Stellung der *GNE*-Transkription in Pankreaskarzinom-Zellen deutlich. Diese Beobachtung ist kongruent mit dem Expressionstrend des Enzyms in 20 verschiedenen, in der AG Kemmner etablierten Tumorzelllinien. Ein differenzierteres Ergebnis lieferte die *in vivo* Studie von Su et al. (2001), die via Affymetrix *GeneChips* die häufigsten Krebsarten, wie Brust-, Leber-, Lunge-, Prostata- und Pankreaskarzinom auf molekularer Ebene klassifizierten. In malignen humanen Geweben ist das erhöhte *GNE*-Vorkommen demnach nicht primär auf die Bauchspeicheldrüse beschränkt, sondern zeigt im Prostatakrebs eine weitaus höhere mRNA-Menge. Allerdings fällt auf, dass das mediane Expressionsniveau annähernd so hoch ist wie im Leberkrebs.

Dies steht im deutlichen Gegensatz zur *GNE*-Transkription im humanen Normalgewebe. Lucka et al. (1999) detektierten via Northern Blot die höchste Expression in sekretierenden Organen, wie der Leber und Darmschleimhaut, aber auch in der Plazenta. Im Vergleich zu allen anderen untersuchten Organen war die ermittelte Transkriptmenge im Pankreas dagegen gering. Im Hinblick auf die vergleichsweise hohe Expression in Krebszelllinien und –organen weist diese Beobachtung auf eine möglicherweise veränderte Rolle bzw. eine funktionelle Bedeutung der *GNE* für die Progression bzw. die Manifestierung von Tumorerkrankungen, speziell in der Bauchspeicheldrüse, hin.

Das Pankreas-Adenokarzinom kennzeichnet - im Vergleich zu anderen Krebsarten - eine frühe aggressive, lokale Invasion verbunden mit einem hohen metastasierenden Potenzial. Die späte Detektion der Erkrankung sowie die weitestgehende Therapieresistenz betroffener Patienten führen zu einer niedrigen 5-Jahres-Überlebensprognose von nur 3% (Bister et al. 2007). Sialinsäuren gelten als Schlüsselelemente bei der Vermittlung pathologischer Ereignisse, die der Tumorprogression zugrunde liegen (Fuster et al. 2005). Insbesondere

Hypersialylierung führt in vielen Krebsarten zur Ausprägung des charakteristischen Phänotyps transformierter Zellen, der sich durch veränderte Zellmigration, Invasion, Adhäsion und Metastasierung auszeichnet (Uemura et al 2009). Auch für das Pankreaskarzinom konnten dahingehende Veränderungen nachgewiesen werden. So wird das maligne Potenzial dieser Erkrankung zum einen mit dem differenziellen Vorkommen der sialylierten Kohlenhydrat-Antigene Sialyl-Lewis^{a} und –Lewis^{x} in Verbindung gebracht (Peracaula et al. 2005). Zum anderen ist die verstärkte Proliferation, v.a. in invasiven Tumorarealen der Bauchspeicheldrüse, mit erhöhtem Polysialinsäurevorkommen korreliert (Kameda et al. 1999). Da die grundlegende biologische Funktion der *GNE* in der Bereitstellung von Neu5Ac als Vorstufe aller natürlicher Sialinsäuren liegt, wäre eine bedeutsame physiologische Aufgabe im transformierten und stark metastasierenden Pankreas denkbar. Eine dahingehende direkte Korrelation der *GNE*-Expression mit Tumorerkrankungen und Krebs wurde bisher allerdings nicht beschrieben.

4.3 Qualitative und quantitative Untersuchung der Effekte reduzierter *GNE*-Expression auf Sialinsäureebene

Analog zur verminderten *GNE*-Expression in P16-positiven, Anoikis-empfindlichen *Capan-1* Zellen war eine deutlich reduzierte Enzymaktivität messbar (persönliche Mitteilung durch Prof. S. Hinderlich, University of Applied Biosciences, Beuth-Hochschule für Technik, Berlin). Diese korrelierte mit signifikanter Hyposialylierung der Zelloberfläche, die sich durch eine etwa 80% geringere Gesamtsialinsäuremenge in P16-Transfektanden im Vergleich zum Mock-Kontrollklon (HPLC-Analyse) äußerte. Allerdings kann auf Basis der allgemeinen Sialinsäurekonzentration nicht auf die spezifische Sialylierung der Zelloberfläche geschlossen werden. Daher wurde, in Ergänzung zur molekularen und biochemischen Charakterisierung durch Andre et al. (2007), über die Bindungsanalyse der Zucker-spezifischen Lektine PNA und SNA via FACS ein zusätzlicher Beitrag zur Untersuchung des Sialinsäureprofils im *Capan-1* Modellsystem geleistet. Entsprechend der über HPLC detektierten verminderten Neuraminsäuremenge und der damit einhergehenden Demaskierung subterminaler Galaktosereste innerhalb der Glykokonjugate der Zellmembran war die Bindung von PNA in P16-Transfektanden im Vergleich zu Wildtypzellen signifikant erhöht. Die reduzierte Sialylierung wurde darüber hinaus durch die Analyse mit dem Lektin SNA deutlich, das neben α-2,6- auch α-2,3-verknüpfte Neu5Ac erkennen kann (Produktinformation des Anbieters Vector Laboratories, Burlingame, USA).

Im Rahmen der onkogenen Transformation und Metastasierung wird im Allgemeinen die bedeutende Rolle der vermehrten Präsentierung α-2,6-gebundener Sialinsäure hervorgehoben. Diese korreliert in unterschiedlichsten Krebsarten mit der erhöhten

Expression der Sialyltransferase ST6Gal-I (β-Galaktosid α2,6-Sialyltransferase I), die als wichtigstes Enzym für die Produktion α-2,6-verknüpfter Sialokonjugate gilt (Dall´Olio et al. 2001; Poon et al. 2005; Wang 2005). Allerdings konnte eine differenzielle Transkription des entsprechenden Enzyms zwischen Mock- und P16-transfizierten *Capan-1* Zellen über Microarray-Untersuchung nicht detektiert werden (Ergebnis nicht gezeigt). Vielmehr ergab die detaillierte Analyse der *U133*- und *ST-GeneChip*-Datensätze ein deutlich geringeres Vorkommen der Sialyltransferase ST3Gal-V (β-Galaktosid α2,3-Sialyltransferase V) in P16-positiven Zellen im Vergleich zur Mock-Kontrolle (Ergebnis nicht gezeigt; FC *U133-GeneChips*=15,53±0,78, FC *ST-GeneChips*=8,50±5,67, n=2), die für Differenzen auf Ebene der α-2,3-Sialylierung verantwortlich ist.

Die hervorragende Stellung von α-2,3-Sialylierung ist *in vivo* für den Bauchspeicheldrüsenkrebs bereits beschrieben worden. Über immunhistologische Techniken detektierte Itai et al. (1988) eine signifikante Akkumulierung von α-2,3-Sialinsäure im Serum von Krebspatienten und im Tumorgewebe. Umgebendes Normalgewebe des Pankreas, das von metastasierenden Zellen infiltriert wird, weist einen entsprechend geringeren Anteil auf.

Wang et al. (2006) konnten darüber hinaus eine direkte und positive Verbindung zwischen der *GNE*-Expression und der ST3Gal-V-Transkription herstellen. In Übereinstimmung mit P16-transfizierten *Capan-1* Zellen korrreliert eine auf *RNAi* basierende, stabile (shRNA) *GNE*-Repression in humanen Nierenzellen *(Hek293)* mit reduzierter mRNA-Expression der Sialyltransferase ST3Gal-V. Anders als in *Capan-1/+P16/+Anoikis* resultiert der spezifische *Knock-Down* nicht in Apoptose, sondern führt in *Hek293*-Zellen über die gezielte Aktivierung der *ERK1/2*-Signalkaskade zu Proliferation. Die abweichenden Ergebnisse in Bezug auf den physiologischen Einfluss der *GNE* könnten in den unterschiedlichen experimentellen *in vitro* Systemen liegen. Zumindest läßt sich aus den Erkenntnissen von Wang et al. der Stellenwert der *GNE* für fundamentale Prozesse der Zelle, wie Proliferation bzw. Apoptose, ableiten und deutet damit auf eine potenzielle Involvierung in Anoikis-relevante Prozesse hin.

4.4 Transkriptionelle Regulierung der *GNE* in *Capan-1* Zellen und Mutanten

Die molekularbiologische Ursache für die signifikant verminderte *GNE*-Expression in P16-Mutanten ist unklar. Während die biochemischen Eigenschaften und die Struktur des Enzyms in den letzten Jahrzehnten eingehend untersucht und beschrieben wurden, ist nur wenig über dessen transkriptionelle Regulierung bekannt. Unterschiedliche Befunde sprechen für eine mögliche Beteiligung epigenetischer Mechanismen. Methylierung von Promotorbereichen führt in Krebszelllinien, wie Morris Hepatomzellen (Oetke et al. 2003),

sowie in HIV-infizierten Lymphozyten (Giordanengo et al. 2004) zu einer deutlich dezimierten mRNA-Menge der *GNE* und zu Hyposialylierung aufgrund verminderter Enzymaktivität.
Die Applikation des Methylierungsinhibitors 5-Aza-dC in *GNE*-defizienten p16-Transfektanden induzierte lediglich eine schwache Aktivierung auf Transkriptionsebene. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Oetke et al. durch identische Behandlung unterschiedlicher Krebszelllinien war der Effekt allerdings nicht so hoch wie in normal sialylierten Zellen (Oetke et al. 2003). Die zusätzliche transkriptionelle Induktion im *Capan-1* Wildtyp deutet in diesem Zusammenhang darauf hin, dass epigenetische Methylierung nicht als alleiniger Effekt die differenzielle Expression bedingt. Vielmehr könnte diese posttranskriptionelle Modifizierung einen generellen Mechanismus zur Feinregulierung der *GNE* darstellen.

4.5 Funktionelle Relevanz der *GNE* für Anoikis

Wie bereits durch Andre et al. beschrieben (2007), korreliert die differenzielle Glykosylierung in Mutanten von *Capan-1* Pankreaskarzinom-Zellen mit der erhöhten Reifung, Aggregation und Bindungsaktivität des $\alpha_5\beta_1$-Integrins, das in P16-positiven Zellen vermehrt exprimiert wird (Plath et al. 2000). Integrine sind heterodimere Glykoproteine, die in ihrer Funktion als Transmembranrezeptoren vorrangig die Bindung von Zellen an Proteinkomponenten der ECM, wie Kollagen, Laminin, Vitronektin und Fibronektin, herstellen (Bellis 2004; Seales et al. 2003) und seit Prägung der Terminologie als zentrale Vermittler der Anoikis gelten (Frisch et al. 1997). Die Ligandenbindung und die damit verbundene Konformationsänderung der Integrinrezeptoren aktiviert dabei unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden, die das Überleben der Zelle bzw. die Einleitung von Apoptose bestimmen (Jin et al. 2004). Die β_1-Untereinheit wird ubiquitär exprimiert und bildet mit unterschiedlichen α-Integrinen αβ-Kombinationen (Bellis 2004), wobei die Paarung die Spezifität für die jeweiligen Liganden determiniert. So ist das $\alpha_5\beta_1$-Integrin als Fibronektinrezeptor bekannt (Seales et al. 2003), dessen transkriptioneller Verlust *in vivo* häufig mit maligner Transformation und einer erhöhten Tumorigenität korreliert (Barrios et al. 2009). Kuwada et al. (2005) konnten dagegen eine *de novo* Expression des Fibronektinrezeptors in Kolonkarzinom-Zellen mit der Minderung von Proliferation und Metastasierung in Verbindung bringen. In diesem Zusammenhang wird das $\alpha_5\beta_1$-Integrin als Protein mit Tumorsuppressor-ähnlicher Aktivität beschrieben. Plath et al. (2000) konnten zeigen, dass in $P16^{INK4a}$-transfizierten *Capan-1* Pankreaskarzinom-Zellen das vermehrte Vorkommen des Fibronektinrezeptors direkt mit der Manifestierung des Anoikisphänotyps korreliert. Über die Applikation von *antisense*-cDNA gegen die α_5-Untereinheit war der pro-apoptotische Effekt revertierbar.

Im Allgemeinen wird die Funktionalität der Integrine im Hinblick auf Zelladhäsion an ECM-Komponenten bzw. Ligandenkontakt über Glykosylierung und Sialylierung reguliert (Bellis 2004; Christie et al. 2008; Seales et al. 2005). Der funktionelle Einfluss der Kohlenhydratzusammensetzung der Zellmembran auf die Interaktion mit Proteinen ist dabei vermutlich struktureller Natur, da die eingeführten Konformations- und Ladungsänderungen zur Maskierung bzw. Demaskierung kritischer Bindungsbereiche des Moleküls führen (Bellis 2004; Seales et al. 2005). So stimuliert eine gezielte Desialylierung *in vitro* die Bindung von $\alpha_5\beta_1$ an Fibronektin (Bellis 2004), aber auch an andere interagierende Proteine, wie Galektin-1 (Gal-1; Fischer et al. 2005; Suzuki et al. 2006).

Andre et al. (2007) konnten parallel zum bekannten erhöhten Vorkommen des Fibronektinrezeptors in P16-substituierten *Capan*-Zellen einen transkriptionellen Anstieg von Gal-1 detektieren. Die genaue biologische Funktion der bisher über 15 identifizierten, hochkonservierten humanen Galektine ist unklar (Martinez et al. 2004; Zhuo et al. 2008). Gal-1 gilt in sezernierter Form als Wachstumsinhibitor und übt eine antiproliferative Wirkung in epithelialen Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs über die Interaktion mit Kohlenhydrateinheiten von Zelloberflächenrezeptoren aus. Der Fibronektinrezeptor $\alpha_5\beta_1$ wird als wichtigster Vermittler seiner zellulären Antwort gesehen und fungiert als Modul für die Effektorfunktion des Lektins (Fischer et al. 2005). In P16-Transfektanden wurde die bevorzugte Interaktion durch Co-Immunopräzipitation des Integrins mit Gal-1 belegt (Andre et al. 2007). In diesem Zusammenhang konnten Andre et al. (2007) darüber hinaus eine positive Korrelation zur Anoikisrate herstellen. Die funktionelle Interaktion der beiden Komponenten Lektin und Integrin bewirkte die Inhibierung der Zellteilungs-relevanten *MAPK/ERK*-Kinasekaskade und resultierte in einem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus (Fischer et al. 2005).

Der Verlust des terminalen Zuckers Neu5Ac durch reduzierte *GNE*-Expression in P16-positiven Pankreaskarzinom-Zellen könnte demnach in diesem Zusammenhang den molekularen Schalter darstellen, der Integrin-vermittelte Anoikis triggert. Möglicherweise erleichtert verminderte Sialylierung die Bindung interagierender Proteine, wie Fibronektin oder Gal-1, an Galaktose in subterminalen Molekülbereichen des $\alpha_5\beta_1$.

Entsprechend der transkriptionellen *GNE*-Defizienz und der daraus resultierenden Hyposialylierung in P16-transfizierten *Capan-1* Zellen wurde der funktionelle Einfluss des Schlüsselenzyms der Sialinsäurebiosynthese auf die Manifestierung der Anoikis-Suszeptibilität über RNA-Interferenz untersucht. Eine gezielte Minderung der Enzymexpression war über die Induktion des Target-spezifischen *Knock-Downs* durch eine spezifische Sequenz synthetischer siRNA in Wildtypzellen möglich. Aufgrund der hohen Stabilität des *GNE*-Proteins von über 72h (unveröffentlicht; persönliche Mitteilung durch Prof.

S. Hinderlich, University of Applied Biosciences, Beuth-Hochschule für Technik, Berlin) und des transienten Effekts der Methode musste die Behandlung nach 48h wiederholt werden.
Der spezifische *Knock-Down* der *GNE* führte zu einer effektiven Reduzierung der entsprechenden mRNA von ca. 80%. Dies war mit einem distinkten Einfluss auf die Proliferation der siRNA-transfizierten *Capan-1* Wildtypzellen verbunden. Die PI-Färbung und anschließende FACS-Analyse verdeutlichten eine fast vierfache Erhöhung apoptotischer Zellen durch gezielte posttranskriptionelle Hemmung. Dieser Effekt war spezifisch für die sub-G1 Phase und erreichte annähernd das für *GNE*-defiziente P16-Transfektanden beschriebene Anoikisniveau (4,9facher Anstieg im Vergleich zu Mock-Transfektanden; Plath et al. 2000). Auf Basis dieser Resultate konnte ein bedeutender Einfluss des Enzyms auf die Ausprägung von Anoikis belegt werden, der vermutlich über Veränderungen der Oberflächensialylierung vermittelt wird.

Allerdings kann über diesen Ansatz ein möglicherweise direkter Effekt des *GNE*-Proteins selbst nicht eindeutig ausgeschlossen werden. Zumindest veranschaulichte die Bindungsanalyse des siRNA-behandelten *Capan-1* Wildtyps mit dem Galaktose-spezifischen Lektin PNA via FACS nur eine schwache Wirkung der *RNAi* auf Sialinsäureebene. Im Vergleich zur Negativkontrolle (*AllStars* Negativkontroll-siRNA, Fa. Qiagen) wurde durch gezielte Supprimierung der *GNE* nur eine etwa zweifache Reduktion membranständiger Neuraminsäure induziert (Ergebnis nicht gezeigt). Im Hinblick auf die vergleichsweise starke PNA-Bindung in Enzym-defizienten, hyposialylierten P16-Transfektanden im Vergleich zum nativen *Capan*-Wildtyp (58facher Unterschied) lässt eine vorrangige Vermittlung der Anoikis-Suszeptibilität über Sialylierung der Zelloberfläche unwahrscheinlich erscheinen.
Ähnlich kontrovers ist die physiologische Rolle der *GNE* für die Manifestierung der neuromuskulären Erbkrankheit HIBM. Eine breite Verteilung von Mutationen über den gesamten Genbereich führen zu Defekten in der Epimerase- und Kinasedomäne, die sich in deutlicher enzymatischer Hypoaktivität ausprägen (Eisenberg et al. 2008). Wider Erwarten konnten in diesem Zusammenhang bislang jedoch keine allgemeinen Auswirkungen auf die Membransialylierung nachgewiesen werden, die den Phänotyp der progressiven Muskelschwäche bedingen könnten (Amsili et al. 2007; Eisenberg et al. 2008; Savelkoul et al. 2006). Diese Beobachtung dient als wichtiger Hinweis dafür, dass sich im Rahmen der erblich bedingten degenerativen Erkrankung die Defizite am *GNE*-Molekül nicht über die Bereitstellung von Neu5Ac äußern, sondern dass vielmehr das Enzym selbst eine direkte Effektorfunktion erfüllen könnte. Interessanterweise deuten neuere wissenschaftliche Erkenntnisse darauf hin, dass HIBM-assoziierter Gewebeabbau durch apoptotische Ereignisse gefördert werden könnte. So beschrieben Amsili et al. (2007) in diesem Zusammenhang eine erhöhte Expression pro-apoptotischer Caspasen 3 und 9 und einen

Anstieg der Apoptoserate in Primärkulturen von HIBM-Myoblasten. Dies steht in Übereinstimmung mit der funktionellen Relevanz der *GNE* für die Manifestierung von Anoikis, die in vorliegender Arbeit über gezielte mRNA-Reprimierung im *Capan-1* Wildtyp bestätigt werden konnte.

4.6 Microarray-basierte Charakterisierung der *GNE*

Verschiedene neuere Studien, deren Fokus weniger auf der biochemischen als der funktionellen Charakterisierung der *GNE* liegt, verweisen neben der bekannten zentralen Bedeutung bei der Sialinsäurebiosynthese auf eine mögliche zusätzliche Involvierung des Moleküls in elementare zelluläre Prozesse, wie Wachstum bzw. Differenzierung (Kontou et al. 2008 und 2009; Weidemann et al. 2009). Dieser Einfluss könnte transkriptioneller Natur sein. In diesem Kontext konnten Krause et al. (2005) auf Grundlage von immunhistochemischen Methoden sowohl in Skelettmuskel- als auch in *HeLa*-Zellen ein subzelluläres Vorkommen der *GNE* außer im Zytoplasma und Golgi-Apparat auch im Nukleus detektieren. Neben der Lokalisierung im Zellkern könnten strukturelle Eigenschaften des Enzyms die Bindung an DNA prinzipiell begünstigen. So weist die Aminosäuresequenz der *GNE* im C-terminalen Bereich der Kinasedomäne ein für zytoplasmatische Proteine eher untypisches Leuzin-Zipper-Motiv auf (Stäsche et al. 1997), das für viele eukaryotische, Nukleinsäure-bindende Proteine charakteristisch ist. Ein Screening nach interagierenden Proteinen im *Yeast Two-Hybrid* System erwies außerdem eine Assoziation mit dem promyelotischen Zinkfingerprotein *PLZF,* der als Transkriptionsfaktor entwicklungsrelevanter Hox-Gene gilt (Weidemann et al. 2006). Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse und im Hinblick auf das Vorkommen unterschiedlicher gewebespezifischer Spleissvarianten ohne eindeutigen Einfluss auf die Sialinsäurebiosynthese bezeichneten Wang et al. (2006) die *GNE* als sog. „Moonlighting"-Protein, das multiple zelluläre Funktionen erfüllen könnte.

Vermehrte Hinweise verschiedener Untersuchungen deuten auf eine fundamentale Rolle der *GNE* bei Proliferationsprozessen der Zelle hin, die von der Sialinsäureebene unabhängig ist. So führte die stabile Überexpression des Proteins in Ratten *PC12*-Zellen – einem gängigen *in vitro* Modell für neuronale Entwicklung - zum Auswachsen von Neuriten, ohne Hypersialylierung zu induzieren (Kontou et al. 2008).
Vermutlich ist die *GNE* direkt an der Transkription Differenzierungs- und Wachstums-relevanter Gene beteiligt. Über eine genomweite Analyse des Expressionsprofils muriner, Enzym-defizienter embryonaler Stammzellen gegen entsprechende Wildtypzellen (*GNE-/- vs. GNE* +/+) auf Maus-spezifischen Oligonukleotid-Arrays von Affymetrix (*GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array*) konnten Weidemann et al. (2009) eine dahingehende

mögliche Involvierung feststellen. Diese Studie stellt die bis dahin erste Microarray-basierte, funktionelle Untersuchung in diesem Zusammenhang dar. Daraus ging eine positive Korrelation zwischen der *GNE*-Expression und der mRNA-Menge von Wachstumsfaktoren, wie dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor *(FGF)* 7, sowie entsprechenden Rezeptoren *FGFR* 1 und 2, hervor. Die Zuordnung der bei dieser Analyse detektierten, differenziell regulierten Gene in metabolische und regulatorische Pfade (*Pathway*-Analyse) ergab, dass der Effekt auf die Proliferation der Zelle vornehmlich über die *MAP*-Kinase Signalkaskade vermittelt wird. Dieser Aspekt ist im Hinblick auf die bekannte, zentrale Funktion des Zellteilungs-relevanten *Ras/MAP/ERK*-Pfades für die Ausprägung von Anoikisresistenz in Tumorzellen besonders interessant (Chiarugi et al. 2008). Daher dient dieser Befund als wichtiger Beleg für die bei vorliegender Arbeit nachgewiesene Induktion von Anoikis durch selektive Minderung der *GNE* via *RNAi.*

Um den putativ transkriptionellen Einfluss der *GNE* im Rahmen von Anoikis zu konkretisieren, wurde das Expressionsprofil in Abhängigkeit vom Vorkommen des Enzyms in *Capan-1* Zellen untersucht. Ein weiteres Ziel der Analyse war die Erweiterung des funktionellen Spektrums des Proteins über die Sialinsäurebiosynthese hinaus, über das es bislang wenige detaillierte Hinweise gibt. Dazu wurde die Genexpression *GNE*-defizienter P16-Transfektanden im Vergleich zur Mock-Kontrolle mithilfe von Affymetrix *GeneChips* verglichen. Parallel dazu wurde das Transkriptionsprofil siRNA-behandelter *Capan-1* Zellen im Vergleich zu Negativkontroll-siRNA transfizierten Zellen analysiert.
Zur Detektion übertragbarer und damit biologisch relevanter Marker wurde ein umfassender Inter-Plattform Analyseansatz konzipiert. Dieser sah die Einbeziehung der kombinatorischen Untersuchung des Transkriptoms von *Capan-1/+P16/-GNE* (P16-Transfektanden) und *Capan-1/-P16/+GNE* (Mock-Kontrolltransfektanden) auf *U133*- und *ST-GeneChips* von Affymetrix (n=2) vor. Das Kernstück der Analyse lag allerdings im *RNAi*-Datensatz. Dazu wurden *Capan-1* Zellen in 4 unabhängigen Versuchen mit *GNE*-spezifischer und Kontroll-siRNA transfiziert und das daraus resultierende differenzielle Genexpressionsmuster der behandelten Zellen auf *U133*-Arrays abgeleitet.
In Analogie zur qualitativen Evaluierung der Microarray-Experimente für den Vergleich der Gruppen *Mock* vs. *P16* wurde vor der eigentlichen Datenanalyse die Reproduzierbarkeit geprüft. Die Ermittlung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson ergab für den *RNAi*-Datensatz auf *U133-GeneChips* (n=4) eine äußerst hohe Güte.
Basierend auf der transienten Wirkung von siRNA (2.2.2) wurden durch *GNE Knock-Down* allerdings wenige differenziell regulierte *Probe Sets* mit starkem transkriptionellen Unterschied (FC≥3,0) detektiert. Synthetische, doppelsträngige Oligonukleotide vermitteln im Allgemeinen einen proportional mit den Zellteilungen abnehmenden Effekt auf mRNA-

Degradierung. Die Reexpression von $P16^{INK4a}$ im alternativen System für Enzymdefizienz in *Capan-1* beruht dagegen auf vektorialem Transfer (eukaryotischer Expressionsvektor pRC_{CMV}, Fa. Invitrogen; 2.1.1.1). Das eingeführte Plasmid induziert eine stabile *GNE*-Repression, die in einer größeren Anzahl von Transkripten mit hohem *Fold Change* zwischen P16- und Mock-Transfektanden resultierte.
Um dennoch eine adäquate Anzahl an validen Markergenen determinieren zu können, wurden Selektionskriterien mit niedriger Stringenz angewendet. Bei der analytischen Zusammenführung beider Datensätze für differenzielle *GNE*-Transkription wurden aus dem Plattorm-übergreifenden Vergleich zwischen *Capan-1/+P16/-GNE* und Mock-Kontrollzellen nur *Probe Sets* mit einem *Fold Change* über 1,5 integriert. Aus der Analyse von *Capan-1* Zellen mit spezifischer, *RNAi*-vermittelter *GNE*-Minderung wurden dagegen 138 Transkripte einbezogen, die einen mindestens zweifachen Expressionsunterschied ($p \leq 0{,}05$) aufwiesen.
Auf dieser Grundlage wurden in der Schnittmenge der Gruppen „siRNA-*GNE* vs. Negativ-Kontrolle“ sowie „P16 vs. Mock“ 34 annotierte Gene gefunden. Aus dieser Auswahl wurden letztlich 9 Gene selektiert, die aufgrund ihres *Fold Changes* und ihrer Signifikanz (*p*-Wert) im *RNAi*-Datensatz als robuste, *GNE*-assoziierte Biomarker gelten könnten. Diese Kandidatengene wiesen auch zwischen P16- und Mock-Transfektanden eine vergleichbare Expressionsdifferenz und eine identische Transkriptionsrichtung auf. Die in diesem Zusammenhang identifizierten Marker waren *ASNS, CHAC1, COL13A1, JDP2, PLAT, PRTFDC1, PSAT1, TRIB3* und *VPS24*. In Korrelation zu verminderter *GNE*-Expression in P16-positiven und siRNA-behandelten *Capan-1* Zellen wiesen *COL13A1, PLAT, PRTFDC1* und *VPS24* eine reduzierte Transkription auf. Im Gegensatz dazu war das Expressionsniveau aller anderen selektierten Gene erhöht. Der Expressionstrend der ausgewählten Marker wurde mittels quantitativer *Real-Time* PCR validiert und konnte bestätigt werden.

Um einen Überblick über das jeweilige Funktionsspektrum der ausgewählten *GNE*-abhängigen Gene zu erhalten, wurde eine umfangreiche Datenbank- und Literatursuche durchgeführt. Dabei fiel zunächst auf, dass *CHAC1, JDP2, PLAT, TRIB3* und *VPS24* mit dem programmierten Zelltod assoziiert werden. Dies bestätigt den funktionellen Bezug der *GNE* zu Anoikis, der bei vorliegender Arbeit über spezifischen *Knock-Down* nachgewiesen wurde. Darüber hinaus werden *ASNS* sowie die Apoptose-relevanten Gene *CHAC1, JDP2* und *TRIB3* mit der sogenannten „Unfolded Protein Response“ (UPR) in Verbindung gebracht.
Die UPR fungiert als physiologisches Schutzprogramm in Anpassung an ER-Stress, der aus der Akkumulierung falsch gefalteter Proteine im ER-Lumen und einer damit einhergehenden Überlastung der Prozessierungskapazität des Kompartiments resultiert (Szegezdi et al.

2006). Die Faktoren, die zu Störungen der genau regulierten Homeostase von Proteinsynthese, -reifung und –transport führen, sind vielfältig. So tragen neben Mutationen relevanter Proteine, wie Chaperone, und Infektionen mit bestimmten Pathogenen, v.a. Veränderungen im Stoffwechsel, wie allgemeiner Nährstoff- bzw. Glukosemangel, zur UPR-Induktion bei (Rutkowski et al. 2004). Unter dem Begriff *Unfolded Protein Response* werden kollektiv drei Signaltransduktionskaskaden zusammengefasst, die in Folge von ER-Stress transkriptionelle und translationelle Kontrollmechanismen zur Minderung der Proteinlast und ihrer zytotoxischen Auswirkungen einleiten (Abb. 27; Feldman et al. 2005). Diese sehen vorrangig die Reduzierung der allgemeinen Proteinsynthese sowie die effektive Erhöhung der Proteinfaltungs- und Degradierungskapazität des ER vor und sichern somit primär das Überleben der Zelle (Szegezdi et al. 2006). Neuere wissenschaftliche Studien verweisen zusätzlich auf eine pro-apoptotisch ausgerichtete Antwort im Rahmen der UPR. Diese ist vorwiegend an die Dauer der Stresseinwirkung gekoppelt (Lin et al. 2007).

In erster Linie wird die komplexe zelluläre Antwort von den drei ER-ständigen Transmembranrezeptoren *PERK* (PKR-Like ER Kinase), *ATF6* (Activating Transcription Factor 6) und *IRE1* (Inositol Requiring Enzyme 1) vermittelt, die als Sensorproteine fungieren. Unter normalen Bedingungen sind diese inaktiv und luminal mit dem wichtigsten ER-Chaperon *GRP78* (Glucose-Regulated Protein 78kDa) assoziiert, das auch als *BiP* (Immunoglobuline Heavy Chain Binding Protein) bekannt ist. Durch die Anhäufung missgefalteter Proteine dissoziiert *GRP78* von den drei Rezeptoren und bindet an fehlprozessierte Proteine. Dieser Prozess impliziert die Aktivierung der ER-Sensoren, die downstream die Translation der Transkriptionsfaktoren *ATF4, ATF6* und *XBP1* (X-Box Binding Protein 1) induzieren (Abb. 27).

Eine hervorragende Rolle für die Förderung der apoptotischen Effektorantwort im Kontext von ER-Stress scheint der über *PERK* getriggerte UPR-Pfad einzunehmen (Lin et al. 2007). Insbesondere die *ATF4*-abhängige Transkription führt zum rapiden Anstieg der Expression des Gens *CHOP* (C/EBP Homology Protein), das auch als *DDIT3* bezeichnet wird. Das unter normalen Bedingungen kaum zu detektierende Proteinprodukt induziert bei zellulärem Stress über die Bindung an die Zyklin-abhängige Kinase 2 *(CDK2)* eine allgemeine Zellzyklusblockierung in der G1-Phase und Apoptose in unterschiedlichsten Zellltypen (Bento et al. 2009). Darüber hinaus definierte Mungrue et al. im Jahr 2009 das bis dahin nicht charakterisierte *CHAC1* (Cation Transport Regulator Homolog 1) als neue Zelltod-vermittelnde Komponente der UPR stromabwärts des *ATF4-CHOP*-Signalweges. Entsprechend dieser Funktion konnte in vorliegender Arbeit über die umfassende Microarray-Analyse in Anoikis-empfindlichen, *GNE*-defizienten siRNA- und p16-Transfektanden eine Überexpression von *CHAC1* detektiert werden.

TRIB3 (Tribbles Homolog 3) wurde 2005 als weiteres Stress-assoziiertes Gen identifiziert, das *ATF4/CHOP*-abhängig aktiviert wird (Ohoka et al 2005). In Übereinstimmung mit *CHAC1* wird dieses Target des *PERK*-Reaktionsarmes in Zellen mit verminderter *GNE*-Expression (*Capan-1/+P16, Capan-1/GNE-siRNA*) stark transkribiert. Neuere Untersuchungen beschreiben einen bedeutenden Einfluss von Tribbles für die Einleitung des programmierten Zelltods. Dieser beruht vorrangig in der direkten Inhibierung der Serin/Threoninkinase *Akt* und der *MAP*-Kinase, die zentrale Elemente Überlebens-relevanter Signaltransduktionswege darstellen (Ohoka et al. 2005; Örd et al. 2007). Möglicherweise dient *TRIB3* als genereller Sensor und Modulator der UPR-Reaktion. So konnten Ohoka et al. (2005) und Su et al. (2008) zeigen, dass das Protein bei transientem ER-Stress eine *ATF4/CHOP*-Blockierung vermittelt, während potente und dauerhafte Stress-Stimuli zu einem *TRIB3*-Überschuss und Apoptoseinduktion führen.

Ein zusätzliches transkriptionelles Zielgen des *ATF4-CHOP*-Signaltransduktionszweiges der *Unfolded Protein Response* stellt die Asparagin Synthetase (*ASNS*) dar (Gjymishka et al. 2009). Dieses Enzym hat eine zentrale Funktion bei der Biosynthese der Aminosäure Asparagin. Bedingt durch spezifische Promotorsequenzen (sog. *Nutrient-Sensing Response Elements*, NSRE), die als Nährstoff-abhängige Enhancer-Elemente wirken, ist die Regulierung der *ASNS* besonders vom physiologischen Status der Zelle bzw. Störungen der Homeostase abhängig (Chen et al. 2004). In Analogie zu *CHAC1* und *TRIB3* wird *ASNS* in *Capan*-Zellen mit reduzierter *GNE*-Expression (*Capan-1/+P16, Capan-1/GNE-siRNA*) vermehrt transkribiert. Diese Beobachtung weist auf die große Bedeutung der Aktivierung des *PERK*-abhängigen Signalweges für die Manifestierung des Anoikis-Phänotyps hin. Allerdings scheint dieser nicht ausschließlich im programmierten Zelltod zu münden. Cui et al. (2007) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass eine auf Glukosemangel zurückzuführende Überexpression von *ASNS* die Überlebensfähigkeit von *MiaPaca2* Pankreaskarzinom-Zellen fördert. Eine dahingehende Effektorantwort im primär apoptotisch ausgerichteten Signalarm verdeutlicht den widersprüchlichen Charakter des noch weitestgehend undefinierten komplexen Mechanismus der UPR. Unabhängig von der Art des Stressreizes werden im Allgemeinen simultan adaptive Reaktionen ausgelöst, die den Fortbestand der Zelle sichern, aber auch zum Zelltod führen können (Rutkowski et al. 2006). Allerdings könnten diese antagonistischen Antworten womöglich der Feinanpassung des jeweiligen Effektorsignals dienen.

Auch das Jun-Dimerisierungsprotein 2 *(JDP2)* wird in *GNE*-defizienten Zellen (P16- und siRNA-Transfektanden/*Capan-1*) verstärkt exprimiert. Unterschiedliche Studien belegen eine anti-apoptotische Eigenschaft des *JDP2* (Lerdrup et al. 2005; Weidenfeld-Baranboim et al. 2008). Dagegen fördert *JDP2* in Myoblasten durch Reprimierung des Zyklins D1 einen Zellzyklusarrest, der die Muskelzelldifferenzierung aktiviert (Ostrovsky et al. 2002).

Womöglich determiniert der Zelltyp die jeweilige Funktion des Proteins (Lerdrup et al. 2005). Weidenfeld-Baranboim et al. (2009) konnten darüber hinaus einen direkten Einfluss von *JDP2* auf den *PERK/ATF4/CHOP*-Zweig der *Unfolded Protein Response* feststellen. Die Überexpression des Jun-Dimerisierungsproteins 2 führte in unterschiedlichen *in vitro* Modellen zur reduzierten Expression des Transkriptionsfaktors *ATF3*, der als Target von *ATF4* gilt. Auf dieser Grundlage wird diskutiert, dass *JDP2* über die negative Regulierung von *ATF3* die adaptive zelluläre Reaktion der UPR modulieren und damit eine generelle Funktion bei der Determinierung der Reizschwelle für die Auslösung der Effektorantwort des *ATF4*-Armes erfüllen könnte (Weidenfeld-Baranboim et al. 2009).

Insgesamt deuten vorliegende Resultate darauf hin, dass der auf *GNE*-Repression basierende Apoptosephänotyp in *Capan-1* Pankreaskarzinom-Zellen auf der transkriptionellen Aktivierung distinkter Elemente des *ATF4-ATF3-CHOP*-Pfades der *Unfolded Protein Response* beruhen könnte. Allerdings kann in diesem Zusammenhang nicht abschließend geklärt werden, inwiefern der enzymatische Verlust die ER-Stress spezifische, apoptotische Antwort begünstigt. Über quantitative *Real-Time* PCR wurde daher gezielt die Expression weiterer Schlüsselgene dieses Prozesses überprüft, die in der Schnittmenge der Microarray-Daten beider *GNE*-Modellsysteme nicht detektiert wurden.
Der initiale Auslöser der UPR ist die Assoziation des ER-Chaperons *GRP78* bzw. *BiP* mit fehlgefalteten Proteinen und die damit einhergehende Dissoziation von transmembranen Sensorproteinen, die das Signal weiterleiten. Es ist bekannt, dass die differenzielle Expression des *BiP*-Proteins entscheidend den Charakter der eingeleiteten Reaktion bestimmt. So wird die transkriptionelle Supprimierung des Chaperons mit der Förderung des programmierten Zelltods in Verbindung gebracht (Reddy et al. 2003). Der Target-spezifische *Knock-Down* der *GNE* zeigte über Quantifizierung via *TaqMan*-PCR keinen Effekt auf die mRNA-Menge des *GRP78*. Vielmehr impliziert die siRNA-vermittelte *GNE*-Repression in *Capan-1* Zellen eine direkte Anregung der pro-apoptotischen UPR-Antwort und bewirkt eine distinkte Expressionssteigerung des Transkriptionsfaktors *CHOP/DDIT3*, der Zelltod-relevante Effektorantworten triggert.

Abgesehen von der Involvierung in transkriptionelle Prozesse könnte die *GNE* generell an der Aufrechterhaltung der zellulären Proteinhomeostase beteiligt sein. So wird die bislang wenig charakterisierte Kinase-Domäne des bifunktionalen Enzyms – genau wie das ER-Chaperon *GRP78* (Zhang et al. 2004) - der Hsp70 (Heat Shock Protein 70)-Überfamilie zugeordnet (Berger et al. 2002). Das Hauptmerkmal vieler Vertreter der Hitzeschockproteine liegt in der Förderung der korrekten Faltung von Polypeptidketten, aber auch in der gezielten Unterdrückung des programmierten Zelltods (Markopoulous et al. 2009). Möglicherweise

induziert daher eine Expressionsreduktion der *GNE* einen Mechanismus, der Apoptose-relevante Signalpfade induziert.

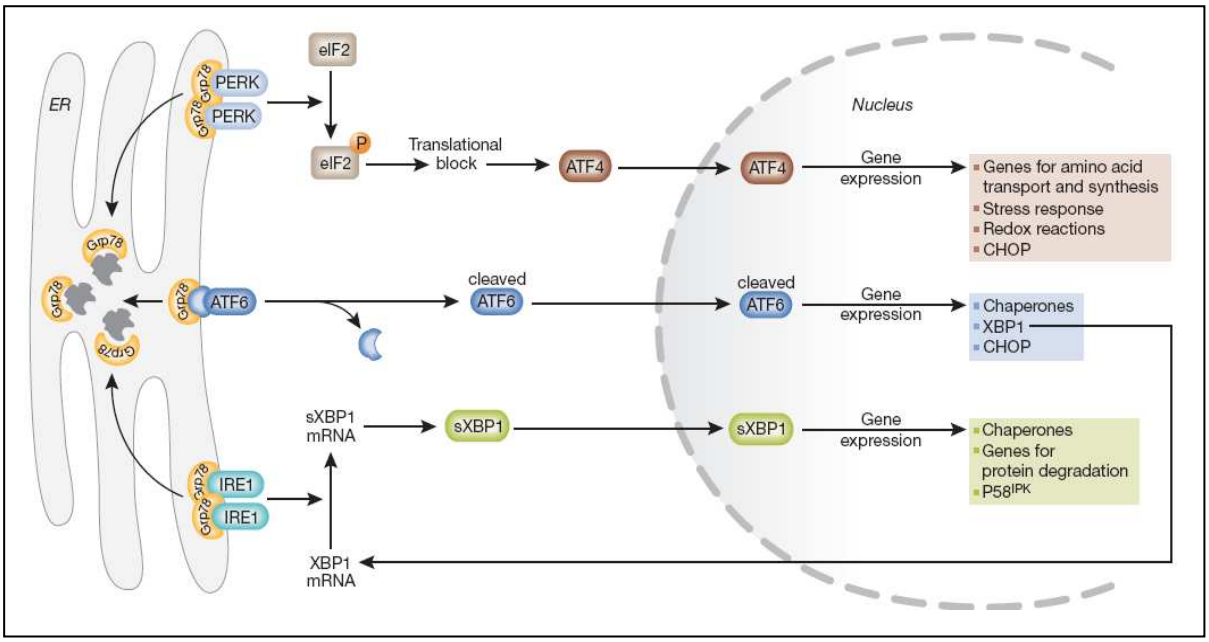


Abb. 27: Schematische Übersicht der *Unfolded Protein Response* (UPR) Als Reaktion auf die Ansammlung ungefalteter Proteine dissoziiert das Chaperon *GRP78* von den transmembranen ER-Stress Rezeptoren *PERK, ATF6* und *IRE1* und induziert damit deren Aktivierung. Stromabwärts werden durch den Einfluss unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren Effektorantworten ausgelöst, die die physiologische ER-Funktionalität wieder herstellen. Diese führen zur Blockierung weiterer Proteinsynthese und erhöhen die Faltungskapazität und die Degradierung von Proteinaggregaten. [modifiziert nach Szegezdi et al. 2006]

Neben ER-Stress relevanten Genen konnten im umfassenden Vergleich der Expressionsprofile *GNE*-defizienter gegen *Capan-1* Zellen mit hoher Enzymexpression weitere Kandidatengene gefunden werden. Diese weisen einen unterschiedlichen funktionellen Bezug zu Apoptose bzw. zum Anoikis-Phänotyp auf.

Die Serinprotease *PLAT* (Plasminogen Activator, Tissue) ist ein anerkannter Biomarker des Pankreas-Adenokarzinoms, die einen bedeutenden Einfluss für den krebsspezifischen Gewebeum- und abbau hat sowie Proliferation, Migration, Invasion und Metastasierung maligner Zellen fördert (Laurell et al. 2006). Im murinen Modell konnte das Zellteilungs-relevante Potenzial von *PLAT* mit einer spezifischen Aktivierung der *ERK1/2*-Signalkaskade in Zusammenhang gebracht werden (Ortiz-Zapater et al. 2007). Daher ist anzunehmen, dass die verminderte Enzymtranskription, die in Zellen mit reduziertem *GNE*-Vorkommen (*Capan-1/GNE-siRNA, Capan-1/+P16*) über Microarray-Analyse detektiert wurde, zum programmierten Zelltod beitragen könnte. Einen entsprechenden Hinweis für diese Korrelation fanden Wang et al. (2006). So war ein spezifischer, über shRNA-vemittelter stabiler *Knock-Down* der *GNE* in humanen Nierenzellen *Hek293* mit reduzierter Phosphorylierung der MAP-Signalkinase *ERK1/2* verbunden.

Auf ähnliche Weise bedingt eine dezimierte mRNA-Menge des Gens *VPS24* (Vacuolar Protein Sorting 24 Homolog, *S. cerevisiae*), wie in Anoikis-suszeptiblen *Capan-1/-GNE* Zellen (siRNA- und P16-Transfektanden), eine Hemmung der Proliferation. Die biologische Funktion von *VPS24* liegt im Allgemeinen in der Mitwirkung beim endosomalen Transport von Membranproteinen zu Lysosomen (Raiborg et al. 2008). Allerdings führte eine siRNA-bedingte Repression nicht nur zur Inhibierung der endosomal-lysosomalen Fusion, sondern bewirkte die Inaktivierung der *MEK/ERK*-Signaltransduktion (Bache et al. 2006).
PRTFDC1 (Phosphoribosyl Transferase Domain Containing 1) ist bislang kaum funktionell charakterisiert. *In vitro* wurde durch Expressionsminderung über *RNAi* eine Beteiligung an der Regulierung des G0/G1-Übergangs detektiert. Im Gegensatz zu *GNE*-defizienten *Capan-1* Zellen, die eine reduzierte *PRTFDC1*-Transkription aufweisen, wird kein Zellzyklusarrest eingeleitet. Stattdessen wird der Eintritt der proliferierenden Zellen in die S-Phase gefördert (Suzuki et al. 2007). Dies legt die Vermutung einer möglicherweise Zelllinien-abhängigen Funktionalität nahe. Ähnliches könnte für die Phosphoserin-Aminotransferase 1 (*PSAT1*) zutreffen, die im Pankreas, Gehirn und in der Leber ein hohes Transkriptionsniveau aufweist, im Kolon und der Prostata dagegen vermindert transkribiert wird. Eine Überexpression von *PSAT1* in der kolorektalen Tumorzelllinie *SW480* determiniert Proliferation (Vie et al. 2008), während siRNA- bzw. P16-transfizierte *Capan-1* Pankreaskarzinom-Zellen durch Anoikis gekennzeichnet sind.
Das Kollagen 13 (*COL13A1*) wird anders als die übrigen Kollagentypen nicht sekretiert, sondern transmembran inkorporiert und stellt eine wichtige Komponente von Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen dar (Kvist et al. 2001; Tuomisto et al. 2008). Entsprechend könnte die in *GNE*-defizienten Zellen ermittelte Expressionsreprimierung eine grundlegende Funktion bei der Ausprägung des Anoikis-Phänotyps erfüllen, der sich durch Adhäsionsverlust zur ECM auszeichnet.

Zusammenfassend konnte die Microarray-basierte Charakterisierung die Hinweise zur Rolle der *GNE* bei fundamentalen zellulären Prozessen, wie Wachstum und Entwicklung, erhärten (Kohla et al. 2002; Kontou et al. 2009; Weidemann et al. 2009). Diese essenzielle Funktionalität impliziert, dass ein transkriptioneller Verlust - wie für P16- und siRNA-transfizierte *Capan-1* Zellen eindeutig gezeigt werden konnte – zur Einleitung von Apoptose führt.

4.7 Evaluierung des Expressionsprofils *GNE*-assoziierter Gene im humanen Pankreas-Adenokarzinom

Eine Validierung und Überprüfung der Übertragbarkeit der *in vitro* identifizierten, *GNE*-abhängigen Kandidatengene war mithilfe der krebsspezifischen Microarray-Datenbank *ONCOMINE* möglich. Dabei wurde deutlich, dass die Transkriptionsrichtung, die über Affymetrix *GeneChip*-Analyse zwischen *GNE*-defizienten Zellen (siRNA- und P16-transfizierte *Capan-1* Zellen) und Zellen mit hoher Enzymexpression determiniert wurde, kongruent zwischen Normal- und Tumorgewebe der Bauchspeicheldrüse ist. Beispielsweise ist die mRNA-Menge von *PLAT,* einem anerkannten Tumormarker des Pankreas-Adenokarzinoms (Laurell et al. 2006), im gesunden Organ wie auch in siRNA- und P16-transfizierten *Capan-1* Zellen vermindert. Ein übertragbares Regulationsmuster zwischen nichtmalignem und malignem Pankreas sowie *Capan-1/-GNE* vs. *Capan-1/GNE* weisen auch *COL13A1* und *VPS24* auf. Analog dazu werden die Gene *ASNS, CHAC1, PSAT1* und *TRIB3*, die in Zellen mit transkriptionellem *GNE*-Verlust vermehrt exprimiert werden, auch im Pankreas-Normalgewebe verstärkt exprimiert. Die Ergebnisse veranschaulichen zum einen den direkten Effekt der *GNE* auf die Genexpression im Pankreas. Zum anderen lässt dieses Expressionsmuster erkennen, dass die transkriptionelle Supprimierung des Enzyms mit einer Verminderung des malignen Phänotyps und des tumorigenen Potenzials transformierter Zellen in Verbindung stehen könnte.

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass die transkriptionelle *GNE*-Defizienz von essenzieller Bedeutung für die Induktion von Anoikis bzw. Apoptose in *Capan-1* Pankreaskarzinom-Zellen ist. Das zugrunde liegende Prinzip könnte auf der reduzierten Biosynthese von Sialinsäure und einer damit verbundenen Hyposialylierung membranständiger Glykoproteine, wie Integrine, basieren. Die hier belegte gezielte Aktivierung pro-apoptotischer Gene stellt eine weitere relevante Option dar, wie differenzielles *GNE*-Vorkommen zur Determinierung des Zellschicksals beitragen könnte. Da die Behandlungsmethoden von Krebserkrankungen auf einem zytotoxischen Wirkprinzip beruhen, könnten die molekularen Erkenntnisse über den Einfluss der *GNE* auf die Ausbildung von Anoikisresistenz neue Ansatzpunkte zur Entwicklung spezifischer Therapieoptionen des hochaggressiven Pankreas-Adenokarzinoms liefern.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Relevanz des Sialinsäuremetabolismus für die Manifestierung von Anoikis in Tumorzellen evaluiert. Voruntersuchungen an der Pankreaskarzinom-Zelllinie *Capan-1* ergaben, dass eine Tumor-spezifische Resistenz gegenüber dieser Spezialform von Apoptose durch die stabile Reexpression des Zellzyklusinhibitors $p16^{INK4a}$ revertierbar ist. Dieser Effekt war mit einer umfassenden posttranslationalen Modifizierung der Kohlenhydratzusammensetzung der Zellmembran verbunden.

Über unterschiedliche Microarray-Technologien konnten die Veränderungen im Gesamt-Transkriptom $p16^{INK4a}$-transfizierter *Capan-1* Zellen in dieser Arbeit erstmals mit einer prominenten Minderexpression des bifunktionalen Schlüsselenzyms der Sialinsäurebiosynthese UDP-*N*-Acetylglukosamin 2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamin-Kinase *(GNE)* in Zusammenhang gebracht werden. Dieser Befund wurde anhand quantitativer *Real-Time* PCR bestätigt und korrelierte mit deutlicher Hyposialylierung membranständiger Glykokonjugate. Die transkriptionelle Repression war nicht auf epigenetisches *Silencing* durch DNA-Methylierung zurückzuführen.
Durch selektiven *Knock-Down* der *GNE* in *Capan-1* Zellen konnte die wesentliche Bedeutung reduzierter Enzymexpression für die Ausbildung des Anoikis-Phänotyps bestätigt werden. Eine gezielte Supprimierung via *RNAi* durch transiente Transfektion einer spezifischen siRNA-Sequenz resultierte in einer signifikant erhöhten Apoptoserate. Das Transkriptionsprofil, das aus der *GeneChip*-Analyse *GNE*-defizienter *Capan-1* Zellen (siRNA-, $p16^{INK4a}$-Transfektanden) gegen entsprechende Kontrollzellen abgeleitet wurde, konnte dies weiter erhärten. Die identifizierten, molekularen Marker ließen einen eindeutigen Bezug reduzierten *GNE*-Vorkommens auf die Induktion Zelltod-relevanter Prozesse erkennen und verdeutlichten eine spezifische Involvierung in die pro-apoptotisch ausgerichtete Effektorantwort im Rahmen der *Unfolded Protein Response* (UPR) bei ER-Stress. Mittels *TaqMan*-PCR konnte das Microarray-basierte Regulationsmuster der ausgewählten Gene belegt werden. Überdies verwies ein *in silico* Abgleich der *GNE*-assoziierten Gensignatur darauf, dass ein erhöhtes Transkriptionsniveau der *GNE* ein allgemeines Merkmal von Krebszellen, v.a. des Pankreas-Adenokarzinoms, darstellt und eine Reduzierung zu einer verminderten Tumorigenität beitragen könnte.
Insgesamt leisten die vorliegenden Ergebnisse einen wesentlichen Beitrag zur erweiterten Charakterisierung des Funktionsspektrums der *GNE* und liefern darüber hinaus möglicherweise eine Grundlage für die Erschließung einer effektiveren Behandlungsstrategie des Pankreas-Adenokarzinoms.

6. Summary

This thesis analyzes the functional impact of sialic acid metabolism on acquisition of anoikis in tumor cells. Previous studies had revealed that stable transfection of tumor suppressor $p16^{INK4a}$ reverses resistance to this special form of apoptosis in pancreatic carcinoma cells *Capan-1*. Moreover, this effect was accompanied by extensive post-translational modifications in terms of carbohydrate composition of the cell membrane.

In this study, the global gene expression pattern of $p16^{INK4a}$-transfected *Capan-1* cells was examined using different microarray technologies from Affymetrix. The data demonstrated for the first time a prominent as well as significant transcriptional reduction of UDP-*N*-acetylglucosamine-2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase (*GNE*) – the bifunctional key enzyme of sialic acid biosynthesis – in these transfectants. This finding was confirmed by quantitative real-time PCR. According to the relevance of *GNE* for synthesis of most terminal monosaccharides, the impairment of enzyme activity correlated with distinct hyposialylation of $p16^{INK4a}$ transfectants. However, the transcriptional repression was not due to epigenetic silencing by DNA methylation.
In line with that, target-specific knock-down of *GNE* with a siRNA-approach resulted in an enhanced anoikis rate, suggesting a fundamental role of the protein in determination of cell fate. The genome-wide transcriptional profile of *GNE*-deficient *Capan-1* cells (siRNA- and $p16^{INK4a}$-transfectants) in comparison to corresponding control cells supported this result. Apart from a correlation between decreased *GNE*-expression and apoptotic processes, the identified molecular markers pointed to a clear functional relation of *GNE* to the pro-apoptotic response of the so-called Unfolded Protein Response (UPR) induced by ER stress. The microarray-derived regulation pattern of the selected candidate genes was validated by quantitative real-time PCR. Furthermore, *in silico* comparison of the detected gene signature to published cancer-specific microarray data indicated a physiological influence of *GNE* on the malignant phenotype, especially that of pancreatic adenocarcinoma, implicating a potential reduction of tumorigenicity by transcriptional diminution.

These observations provide a substantial contribution to the functional characterization of the enzyme *GNE*. Additionally, the obtained molecular insights into the basic regulation mechanims of anoikis may promote the development of more effective therapeutic approaches for pancreatic cancer.

7. Literaturverzeichnis

Abdul-Salan, F., Moulana, M. G., Mansour, M. H. (2000). Age-related structural modulation of T lymphocyte-associated CD45 isoforms. *Mech Ageing Dev* **114**:21-35.

Alahari, S. K., Reddig, P. J., Juliano, R. L. (2002). Biological aspects of signal transduction by cell adhesion receptors. *Int Rev Cytol* **220:**145-84.

Allen, M. B., Walker, D. G. (1980). Kinetic characterization of N-acetylglucosamine kinase from rat liver and kidney. *Biochem J* **185**: 577-82.

Amsili, S., Levitzki, R., Krause, S., Lochmuller, H., Ben-Bassat, H., Mitrani-Rosenbaum, S. (2007). Characterization of hereditary inclusion body myopathy myoblasts: possible primary impairment of apoptotic events. *Cell Death Differ* **14**:1916-24.

Anastasia, L., Papini, N., Colazzo, F., Palazzolo, G., Tringali, C., Dileo, L., Piccoli, M., Conforti, E., Sitzia, C., Monti, E., Sampaolesi, M., Tettamanti, G., Venerando, B. (2008). NEU3 sialidase modulates GM3 levels in skeletal myoblasts C2C12 thus favouring their differentiation and predicting them from apoptosis. *J Biol Chem* **283**:36265-71.

Andre, S., Sanchez-Ruderisch, H., Nakagawa, H., Buchholz, M., Kopitz, J., Forberich, P., Kemmner, W., Böck, C., Deguchi, K., Detjen, K. M., Wiedenmann, B., von Knebel Doeberitz, M., Gress, T. M., Nishimura, S., Rosewicz, S., Gabius, H. J. (2007). Tumor suppressor p16INK4a—modulator of glycomic profile and galectin-1 expression to increase susceptibility to carbohydrate-dependent induction of anoikis in pancreatic carcinoma cells. *FEBS J* **274**:3233-56.

Angata, T., Hayakawa, T., Yamanaka, M., Varki, A., Nakamura, M. (2006). Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates. *FASEB J* **20**:1964-73.

Angata, T., Margulies, E. H., Green, E. D., Varki, A. (2004). Large-scale sequencing of the CD33-related Siglec gene cluster in five mammalian species reveals rapid evolution by multiple mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:13251-6.

Angata, T., Tabuchi, Y., Nakamura, K., Nakamura, M. (2007). Siglec-15: an immune system Siglec conserved throughout vertebrate evolution. *Glycobiology* **17**:838-46.

Askanas, V., Alvarez, R. B., Engel, W. K. (1993). Beta-Amyloid precursor epitopes in muscle fibers of inclusion body myositis. *Ann Neurol* **34**:551-60.

Atkins, A. R., Gallin, W. J., Owens, G. C., Edelman, G. M., Cunningham, B. A. (2004). Neural Cell Adhesion Molecule (N-CAM) homophilic binding mediated by the two N-terminal Ig domains is influenced by intramolecular domain-domain interactions. *J Biol Chem* **279**:49633-43.

Bache, K. G., Malerod, L., Stagsvold, T., Raiborg, C., Lechardeur, D., Wälchli, S., Lukacs, G. L., Brech, A., Stenmark, H. (2006). The ESCRT-III Subunit hVps24 is required for degradation, but not silencing of the EGFR. *Mol Biol Cell* **17**:2513-23.

Baehrecke, E. H., Dang, N., Babaria, K., Shneiderman, B. (2004). Visualization and analysis of microarray and gene ontology data with treemaps. *BMC Bioinformatics* **5**:84.

Balinsky, D., Platz, C. E., Lewis, J. W. (1983). Isozyme patterns of normal, benign, and malignant human breast tissues. *Cancer Res* **43**:5895-5901.

Barrios, J., Wieder, R. (2009). Dual FGF-2 and integrin alpha5beta1 signaling mediate GRAF-induced RhoA inactivation in a model of breast cancer dormancy. *Cancer Microenviron* **2**:33-47.

Bellis, S. L. (2004). Variant glycosylation: an underappreciated regulatory mechanism for β1 integrins. *Biochim Biophys Acta* **1663**:52-60.

Benie, A. J., Blume, A., Schmidt, R. R., Reutter, R., Hinderlich, S., Peters, T. (2004). Characterization of ligand binding to the bifunctional key enzyme in the sialic acid biosynthesis by NMR. *J Biol Chem* **279**:55722-7.

Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Statist Soc B* **57**:289-300.

Bento, C., Andersson, M. K., Aman, P. (2009). DDIT3/CHOP and the sarcoma fusion oncoprotein FUS-DDIT3/TLS-CHOP bind cyclin-dependent kinase 2. *BMC Cell Biol* **10**:89.

Berezovskaya, O., Schimmer, A. D., Glinskii, A. B., Pinilla, C., Hoffman, R. M., Reed, J. C., Glinsky, G. V. (2005). Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells. *Cancer Res* **65**:2378-86.

Berger, M., Chen, H., Reutter, W., Hinderlich, S. (2002). Structure and function of N-acetylglucosamine kinase. *Eur J Biochem* **269**:4212-8.

Bhaskar, K. R., Garik, P., Turner, B. S., Bradley, J. D., Bansil, R., Stanley, H. E., Lamont, J. T. (1992). Viscous fingering of HC1 through gastric mucin. *Nature* **360**:458-61.

Birkle, S., Zeng, G., Gao, L., Yu, R. K., Aubry, J. (2003). Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie* **85**:455-63.

Bister, V., Skoog, T., Virolainen, S., Kiviluoto, T., Puolakkainen, P., Saarialho-Kere, U. (2007). Increased expression of matrix metalloproteinases-21 and TIMP-4 in pancreatic adenocarcinoma. *Mod Pathol* **20**:11280-40.

Blix, G. (1936). Über die Kohlenhydratgruppen des Submaxillarismucins. *Hoppe-Syler´s Z Physiol Chem* **240**:43-54.

Blix, G., Lindberg, E., Odin, L., Werner, I. (1956). Studies on sialic acids. *Acta Soc Med Ups* **61**:1-25.

Blix, G., Svennerholm, L., Werner, I. (1952). The isolation of chondrosamine from gangliosides and from submaxillary mucin. *Acta Chem Acand* **6**:358-62.

Blixt, O., Collins, B. E., van den Nieuwenhof, I. M., Crocker, P. R., Paulson, J. C. (2003). Sialoside specificity of the siglec family assessed using novel multivalent probes: identification of potent inhibitors of myelin-associated glycoprotein. *J Biol Chem* **278**:31007-19.

Blume, A., Ghaderi, D., Liebich, V., Hinderlich, S., Donner, P., Reutter, W., Lucka, L. (2004). *UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase* functionally expressed in and purified from *Escherichia coli,* yeast and insect cells. *Protein Expr Purif* **35**: 387-96.

Blume, A., Weidemann, W., Stelzl, U., Wanker, E. E., Lucka, L., Donner, P., Reutter, W., Horstkorte, R., Hinderlich, S. (2004). Domain-specific characteristics of the bifunctional key enzyme of sialic acid biosynthesis, UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase. *Biochem J* **384**:599-607.

Bock, D., Rosskamp, G., Schroeter-Maas, S., Wolff, G., Zahlten, R. N. (2003). Innovative strategy in inflammatory diseases. *Revotar Biopharmaceuticals, Berlin, Germany.*

Bork, K., Gagiannis, D., Orthmann, A., Weidemann, W., Kontou, M., Reutter, W., Horstkorte, R. (2007). Experimental approaches to interfere with the polysialylation of the neural cell adhesion molecule in vitro and in vivo. *J Neurochem* **103**:65-71.

Boudreau, N., Sympson, C. J., Werb, Z., Bissell, M. J. (1995). Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* **267**:891-93.

Bouillet, P., Strasser, P. (2002). BH3-only proteins – evolutionary conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating cell death. *J Cell Sci* **115**:1567-74.

Bouvet, M., Bold, R. J., Lee, J., Evans, D. B., Abbruzzese, J. L., Chiao, P. J., McConkey, D. J., Chandra, J., Chada, S., Fang, B., Roth, J. A. (1998). Adenovirus-mediated wild-type p53 tumor suppressor gene therapy induces apoptosis and suppresses growth of human pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol* **5**:681-8.

Bremer, E. G., Schlessinger, J., Hakomori, S. (1986). Ganglioside-mediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 on tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **261**:2434-40.

Broccolini, A., Gidaro, T., De Cristofaro, R., Morosetti, R., Gliubizzi, C., Ricci, E., Tonali, P. A., Mirabella, M. (2008). Hyposialylation of neprilysin possibly affects its expression and enzymatic activity in hereditary inclusion-body myopathy muscle. *J Neurochem* **105**:971-81.

Buchholz, M., Braun, M., Heidenblut, A., Kestler, H. A., Klöppel, G., Schmiegel, W., Hahn, S. A., Lüttges, J., Gress, T. M. (2005). Transcriptome analysis of microdissected pancreatic intraepithelial neoplastic lesions. *Oncogene* **24**:6626-36.

Cao, L., Han, L., Zhang, Z., Li, J., Qu, Z., Du, J., Liang, X., Liu, Y., Liu, H., Shi, Y., Liu, S., Gao, L., Sun, W. (2008). Involvement of anoikis resistance in the metastasis of hepatoma cells. *Exp Cell Res* **15**:1148-56.

Carlin, A. F., Uchiyama, S., Chang, Y.-C., Lewis, A. L., Nizet, V., Varki, A. (2009). Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil siglec-9 and dampen the innate immune response. *Blood* **113**:3333-6.

Carlson, M. A., Prall, A. K., Gums, J. J. (2007). RNA interference in human foreskin fibroblasts within the three dimensional collagen matrix. *Mol Cell Biochem* **306**:123-32.

Chan, Q. K. Y., Ngan, H. Y. S., Ip, P. C. P., Liu, V. W. S., Xue, W. C., Cheung, A. N. Y. (2008). Tumor suppressor effect of follistatin-like 1 in ovarian and endometrial carcinogenesis – a differential expression and functional analysis. *Carcinogenesis* **30**:114-21.

Chen, H., Pan, Y. X., Dudenhausen, E. E., Kilberg, M. S. (2004). Amino acid deprivation induces the transcription rate of the human asparagine synthetase gene through a timed program of expression and promoter binding of nutrient-responsive basic region/leucine zipper transcription factors as well as localized histone acetylation. *J Biol Chem* **279**:50829-39.

Chen, X., Jiang, J., Yang, J., Chen, C., Sun, M., Wei, Y., Guang, X., Gu, J. (2006). Down-regulation of the expression of β1,4-galactosyltransferase V promotes integrin β1 maturation. *Biochem Biophys Res Commun* **343**:910-6.

Chiarugi, P., Giannoni, E. (2008). Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem Pharmacol* **76**:1352-64.

Christie, D. R., Shaikh, F. M., Lucas, J. A. (2008). ST6Gal-I expression in ovarian cancer cells promotes an invasive phenotype by altering integrin glycosylation and function. *J Ovarian Res* **1**:3.

Close, B. E., Wilkinson, J. M., Bohrer, T. J., Goodwin, C. P., Broom, L. J., Colley, K. J. (2001). The polysialyltransferase ST8SiaII/STX: posttranslational processing and role of autopolysialylation in the polysialylation of neural cell adhesion molecule. *Glycobiol* **11**:997-10008.

Comb, D. G., Roseman, S. (1958). Glucosamine metabolism. IV. Glucosamine-6-phosphate deaminase. *J Biol Chem* **232**:807-27.

Coucouvanis, E., Martin, G. (1995). Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell* **83**:279-87.

Crocker, P. R. (2002). Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling. *Curr Opin Struct Biol* **12**:609-15.

Crocker, P. R. (2005). Siglecs in innate immunity. *Curr Opin Pharmacol* **5**:431-7.

Crocker, P. R., Gordon, S. (1989). Mouse macrophage hemagglutinin (sheep erythrocyte receptor) with specificity for sialylated glycoconjugates characterized by monoclonal antibody. *J Exp Med* **169**:1333-46.

Cui, H., Darmanin, S., Natsuisaka, M., Kondo, T., Asaka, M., Shindoh, M., Higashino, F., Hamuro, J., Okada, F., Kobayashi, M., Nakagawa, K., Koide, H., Kobayashi, M. (2007). Enhanced expression of Asparagine Synthetase under glucose-deprived conditions protects pancreatic cancer cells from apoptosis induced by glucose deprivation and cisplatin. *Cancer Res* **67**:3345-55.

Dall´Olio, F., Chirocolo, M. (2001). Sialyltransferases in cancer. *Glycoconj J* **18**:841-50.

Dalziel, M., Dall´Olio, F., Mungul, A., Piller, V., Piller, F. (2004). Ras oncogene induces beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase (ST6GalI) via a RalGEF-mediated signal to its housekeeping promoter. *Eur J Biochem* **271**:3623-34.

Dansranjavin, T., Möbius, C., Tannapfel, A., Bartels, M., Wittekind, C., Hauss, J., Witzigmann, H. (2006). E-cadherin and DAP kinase in pancreatic adenocarcinoma and corresponding lymph node metastases. *Oncol Rep* **15**:1125-31.

Davis, G., Baboolal, N., Nayak, S., McRae, A., (2009). Sialic acid, homocysteine and CRP: potential markers for dementia. *Neurosci Lett* **465**:382-4.

Derouet, M., Wu, X., May, L., Hoon Yo, B., Sasazuki, T., Shirasawa, S., Rak, I., Rosen, K. V. (2007). Acquisition of anoikis resistance promotes the ermergence of oncogenic K-ras mutations in colorectal cancer cells and stimulates their tumorigenicity in vitro. *Neoplasia* **9**:536-45.

Douma, S., Van Laar, T., Zevenhoven, J., Meuwissen, R., Van Gerderen, E., Peeper, D. S. (2004). Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* **430**:1034-9.

Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**:11-22.

Duffy, M. J. (2001). Biochemical markers in breast cancer: which ones are clinically useful? *Clin Biochem* **34**:347-52.

Eckhardt, M., Mühlenhoff, M., Bethe, A., Gerardy-Schahn, R. (1996). Expression cloning of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 7572-6.

Edelman, G. M., Crossin, K. L. (1991). Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. *Annu Rev Biochem* **60**:155-90.

Effertz, K., Hinderlich, S., Reutter, W. (1999). Selective loss of either the epimerase or kinase activity of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase due to site-directed mutagenesis based on sequence alignments. *J Biol Chem* **274**:28771-8.

Eisenberg, I., Avidan, N., Potikha, T., Hochner, H., Chen, M., Olender, T., Barash, M., Shermesh, M., Sadeh, M., Grabov-Nardini, G., Shmilevich, I., Friedmann, A., Karpati, G., Bradley, W. G., Baumbach, L., Lancet, D., Asher, E. B., Beckmann, J. S., Argov, Z., Mitrani-Rosenbaum, S. (2001). The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy. *Nat Genet* **29**:83-7.

Eisenberg, I., Novershtern, N., Itzhaki, Z., Becker-Cohen, M., Sadeh, M., Willems, P. H. G. M., Friedman, N., Koopman, W. J. H., Mitrani-Rosenbaum, S. (2008). Mitochondrial processes are impaired in hereditary inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet* **17**:3663-74.

Eizirik, D. L., Cardozo, A. K., Cnop, M. (2008). The role for endoplasmatic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev* **29**:42-61.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**:494-98.

Elbashir, S. M., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**:188-200.

Emsig, S., Schmalz, D., Shakibaei, M., Buchner, K. (1995). The nuclear pore complex protein p62 is one of several sialic acid-containing proteins of the nuclear envelope. *J Biol Chem* **270**:13787-93.

Esposito, I., Kleeff, J., Abiatari, I., Shi, X., Giese, N., Bergmann, F., Roth, W., Friess, H., Schirmacher, P. (2007). Overexpression of cellular inhibitor of apoptosis protein 2 is an early event in the progression of pancreatic cancer. *J Clin Pathol* **60**:885-95.

Feldman, D. E., Chauhan, V., Koong, A. C. (2005). The unfolded protein response: a novel component of the hypoxic stress response in tumors. *Mol Cancer Res* **3**:597-605.

Fischer, C., Sanchez-Ruderisch, H., Welzel, M., Wiedenmann, B., Sakai, T., Andre, S., Gabius, H. J., Khachigian, L., Detjen, K. M., Rosewicz, S. (2005). Galectin-1 interacts with the (alpha)5 (beta)1 fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27. *J Biol Chem* **280**:37266-77.

Foeckens, J. A., Buessecker, F., Peters, H. A., Krainick, U., van Putten, W. L., Look, M. P., Klijn, J., Kramer, M. D. (1995). Plasminogen activator inhibitor-2: prognostic relevance in 1012 patients with primary breast cancer. *Cancer Res* **55**:1423-7.

Fogh, J., Wright, W. C., Loveless, J. D. (1977). Absence of Hela cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* **58**:209-14.

Foley, D. A., Schwarzentruber, K. G., Colley, K. J. (2009). Indentification of sequences in the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV that are required fort he protein-specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule NCAM. *J Biol Chem* **284**:15505-16.

Fredman, P., Hedberg, K., Brezicka, T. (2003). Gangliosides as therapeutic targets for cancer. *BioDrugs* **17**:155-67.

Frisch, S. M., Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* **124**: 619-26.

Frisch, S. M., Ruoslahti, E. (1997). Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* **9**:701-6.

Frisch, S. M., Vuori, K., Kelaita, D., Sicks, S. (1996). A role for Jun-N-terminal kinase in anoikis; suppression by Bcl-2 and CrmA. *J Cell Biol* **135**:1377-82.

Fukazawa, H., Mizuno, S., Uehara, Y. (1995). Assay for quantification of anchorage-independent growth of transformed cells. *Anal Biochem* **228**:83-90.

Fuster, M. M., Esko, J. D. (2005). The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* **5**:526-42.

Gabri, M. R., Otero, L. L., Gomez, D. E., Alonso, D. F. (2009). Exogenous incorporation of neuGc-rich mucin augments N-glycolyl sialic acid and promotes malignant phenotype in mouse tumor cell lines. *J Exp Clin Res* **28**:146.

Gade, P., Roy, S. K., Li, H., Nallar, S. C., Kalvakolanu, D. V. (2008). Critical role for transcription factor C/EBP-β in regulating the expression of Death-Associated Protein Kinase 1. *Mol Cell Biol* **28**:2528-48.

Gagiannis, D., Orthmann, A., Danssmann, I., Schwarzkopf, M., Weidemann, W., Horstkorte, R. (2007). Reduced sialylation status in UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE)-deficient mice. *Glycoconj J* **24**:125-30.

Galeano, B., Klootwijk, R., Manoli, I., Sun, M., Ciccone, C., Darvish, D., Starost, M. F., Zerfas, P. M., Hoffmann, V. J., Hoogstraten-Miller, S., Krasnevich, D. M., Gahl, W. A., Huizing, M. (2007). Mutation in the key enzyme of sialic acid biosynthesis causes severe glomerular proteinura and is rescued by N-acetylmannosamine. *J Clin Invest* **117**:1585-94.

Geng, J. G., Heawvener, G. A., McEver, R. P. (1992). Lectin domain peptides from selectins interact with both cell surface ligands and Ca2+ ions. *J Biol Chem* **267**:19846-53.

Gessner, P., Riedl, S., Quentmaier, A., Kemmner, W. (1993). Enhanced activity of CMP-NeuAc:Gal beta 1-4GlcNAc:alpha 2,6-sialyltransferases in metastasizing human colorectal tumour tissue and serum of tumour patients. *Cancer Lett* **5**:143-9.

Ghaderi, D., Strauss, H. M., Reinke, S., Cirak, S., Reutter, W., Lucka, L., Hinderlich, S. (2007). Evidence for dynamic interplay of different oligomeric states of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase by biophysical methods. *J Mol Biol* **369**:746-58.

Ghosh, S., Bandulet, C., Nitschke, L. (2006). Regulation of B cell development and B cell signalling by CD22 and its ligands alpha 2,6-linked sialic acids. *Int Immunol* **18**:603-11.

Giannoni, E., Buricchi, F., Grimaldi, G., Parri, M., Cialdai, F., Taddei, M. L., Raugei, G., Ramponi, G., Chiarugi, P. (2008). Redox regulation of anoikis: reactive oxygen species as essential mediators of cell survival. *Cell Death Differ* **15**:867-78.

Giannoni, E., Fiaschi, T., Ramponi, G., Chiarugi, P. (2009). Redox regulation of anoikis resistance of metastatic prostate cancer cells: key role for Src and EGFR-mediated pro-survival signals. *Oncogene* **28**:2074-86.

Gilmore, A. P. (2005). Anoikis. *Cell Death Differ* **12 Suppl. 2**:1473-7.

Giordanengo, V., Ollier, L., Lanteri, M., Lesimple, J., March, D., Thyss, S., Lefebvre, J.-C. (2004). Epigenetic reprogramming of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) in HIV-1-infected CEM T cells. *FASEB J* **18**:1961-3.

Gjymishka, A., Su, N., Kilberg, M. S. (2009). Transcriptional induction of the human asparagine synthetase gene during the unfolded protein response does not require the ATF6 and IRE1/XBP1 arms of the pathway. *Biochem J* **417**:695-703.

Goldstein, N. B., Johannes, W. U., Gadeliya, A. V., Green, M. R., Fujita, M., Norris, D. A., Shellman, Y. G. (2009). Active N-Ras and B-Raf inhibit anoikis by downregulating Bim expression in melanocytic cells. *J Invest Dermatol* **129**:432-7.

Goodwin, A., Jenkins, G. (2009). Role of integrin-mediated TGFβ-activation in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Biochem Soc Trans* **37**:849-54.

Gosh, S., Roseman, S. (1961). Enzymatic phosphorylation of N-acetyl-D-mannosamine. *Proc Natl Acad Sci USA* **47**:955-8.

Grailer, J. J., Kocera, M., Steeber, D. A. (2009). L-selectin: role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation. *J Dermatol Sci* **56**:141-7.

Grau, A. M., Zhang, L., Wang, W., Ruan, S., Evans, D. B., Abbruzzese, J. L., Zhang, W., Chiao, P. J. (1997). Induction of p21waf1 expression and growth inhibition by transforming growth factor beta involve the tumor suppressor gene DPC4 in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Cancer Res* **57**:3929-34.

Grossmann, J. (2002). Molecular mechanisms of detachement-induced apoptosis – Anoikis. *Apoptosis* **7**:247-60.

Grützmann, R., Pilarsky, C., Ammerpohl, O., Lüttges, J., Böhme, A., Sipos, B., Foerder, M., Alldinger, I., Jahnke, B., Schackert, H. K., Kalthoff, H., Kremer, B., Klöppel, G., Saeger, H. D. (2004). Gene expression profiling of microdissected pancreatic ductal carcinomas using high-density DNA microarrays. *Neoplasia* **6**:611-22.

Gu, J., Isaji, T., Sato, Y., Kariya, Y., Fukada, T. (2009). Importance of N-glycosylation on alpha5beta1 integrin for its biological function. *Biol Pharm Bull* **32**:780-5.

Hall, P., Coates, P., Ansari, B., Hopwood, D. (1994). Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* **107**:3569-77.

Hanai, N., Dohi, T., Nores, G. A., Hakomori, S. A. (1988). A novel ganglioside, de-N-acetyl-GM3 (II3NeuNH2LacCer), acting as a strong promoter for epidermal growth factor receptor kinase and as a stimulator for cell growth. *J Biol Chem* **263**:6296-6301.

Hara, S., Takemori, Y., Yamaguchi, M., Nakamura, M., Ohkura, Y. (1987). Fluorometric high-performance liquid chromatography of N-acetyl and N-glycolylneuraminic acids and its application to their microdetermination in human and animal sera, glycoproteins, and glycolipids. *Anal Biochem* **164**:138-45.

Hardin, J., Mitani, A., Hicks, L., VanKoten, B. (2007). A robust measure of correlation between two genes on a microarray. *BMC Bioinformatics* **8**:220.

Heber, S., Sick, B. (2006). Quality assessment of Affymetrix GeneChip data. *OMICS* **10**:358-68.

Higachi, H. (1990). N-glycolylneuraminic acid-containing glycoconjugate as a tumor associated antigen. *Trends Glycosci Glycotechn* **2**:7-15.

Hinderlich, S., Berger, M., Keppler, O. T., Pawlita, M., Reutter, W. (2001). Biosynthesis of N-acetylneuraminic acid in cells lacking UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *Biol Chem* **382**:291—7.

Hinderlich, S., Stäsche, H., Zeitler, R., Reutter, W. (1997). A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acteylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. *J Biol Chem* **272**:24313-8.

Horstkorte, R., Nöhring, S., Danker, K., Effertz, K., Reutter, W., Lucka, L. (2000). Protein kinase C phosphorylates and regulates UDP-*N*-acetylglucosamine-2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase. *FEBS Lett* **470**:315-8.

Horstkorte, R., Nöhring, S., Wiechens, N., Schwarzkopf, M., Danker, K., Reutter, W., Lucka, L. (1999). Tissue expression and amino acid sequence of murine UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *Eur J Biochem* **260**:923-7.

Hsu, C. C., Lin, T. W., Chang, W. W., Wu, C. Y., Lo, W. H., Wang, P. H., Tsai, Y. C. (2005). Soyasponin I modified invasive behaviour of cancer by changing cell surface sialic acids. *Gynecol Oncol* **96**:415-22.

Huang, X., Gao, L., Wang, S., Lee, C. K., Ordentlich, P., Liu, B. (2009). HDAC inhibitor SNDX-275 induces apoptosis in erbB2-overexpressing breast cancer cells via down-regulation of erbB3 expression. *Cancer Res* **69**:8403-11.

Hudgin, R. L., Pricer, W. E., Ashwell, G., Stockert, R. J., Morell, A. G. (1974). The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoproteins. *J Biol Chem* **249**:5536-43.

Huizing, M., Krasnewich, D. M. (2009). Hereditary inclusion body myopathy: a decade of progress. *Biochim Biophys Acta* **17292**:881-7.

Huveneers. S., Truong, H., Danen, E. H. J. (2007). Integrins: signaling, disease, and therapy. *Int J Radiat Biol* **83**:743-51.

Iacobuzio-Donahue, C. A., Maitra, A., Olsen, M., Lowe, A. W., van Heek, N. T., Rosty, C., Walter, K., Santo, N., Parker, A., Ashfaq, R., Jaffee, E., Ryu, B., Jones, J., Eshleman, J. R., Yeo, C. J., Cameron, J. L., Kern, S. E., Hruban, R. H., Brown, P. O., Goggins, M. (2003). Exploration of global gene expression patterns in pancreatic adenocarcinoma using cDNA microarrays. *Am J Pathol* **162**:1151-62.

Itai, S., Arii, S., Tobe, R., Kitahara, A., Kim, Y. C., Yamabe, H., Ohtsuki, H., Kirihari, Y., Shigeta, K., Kannagai, R. (1988). Significance of 2-3 and 2-6 sialylation of Lewis a antigen in pancreas cancer. *Cancer* **61**:775-87.

Jackson, A. L., Linsley, P. S. (2004). Noise amidst the silence: off target effects of siRNA? *Trends Genet* **20**:521-4.

Jacobs, T., Erdmann, H., Fleischer, B. (2009). Molecular interaction of siglecs (sialic acid-binding Ig-like lectins) with sialylated ligands on Trypanosoma cruzi. *Eur J Cell Biol* **89**:113-6.

Jeong, K. T., Choi, O., Lim, H. R., Son, Y. D., Kim, H. J., Kim, J. H. (2008). Enhanced sialylation of recombinant erythropoetin in CHO cells by human glycosyltransferases expression. *J Microbiol Biotechn* **18**:1945-52.

Jin, H., Varner, J. (2004). Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Brit J Cancer* **90**:561-5.

Jin, Y., Blue, E. K., Dixon, S., Hou, L., Wysolmerski, R. B., Gallagher, P. J. (2001). Identification of a new death-associated protein kinase that promotes cell survival. *J Biol Chem* **276**:39667-78.

Jin, Y., Gallagher, P. J. (2003). Antisense depletion of death-associated protein kinase promotes apoptosis. *J Biol Chem* **278**:51587-93.

Jutila, M. A., Bargatze, R. F., Kurk, S., Warnock, R. A., Ehsani, N., Watson, S. R., Walcheck, B. (1994). Cell-surface P-and E-selectin support shear-dependent rolling of bovine gamma/delta T cells. *J Immun* **153**:3917-28.

Kameda, K., Shimada, H., Ishikawa, T., Takimoto, A., Momiyama, N., Hasegawa, S., Misuta, K., Nakano, A., Nagashima, Y., Ichikawa, Y. (1999). Expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in pancreatic cancer neural invasive lesion. *Cancer Lett* **137**:201-7.

Kawamoto, M. (1994). Breast cancer diagnosis by lactate dehydrogenase isoenzymes in nipple discharge. *Cancer* **73**:1836-41.

Kean, E. L. (1991). Sialic acid activation. *Glycobiology* **1**:441-7.

Kean, E. L., Roseman, S. (1966). The sialic acids: X. Purification and properties of cytidine 5´-monophosphosialic acid synthetase. *J Biol Chem* **241**: 5643-50.

Kelm, S., Schauer, R. (1997). Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int Rev Cytol* **175**:137-240.

Keppler, O. T., Hinderlich, S., Langner, J., Schwartz-Albiez, R., Reutter, W., Pawlita, M. (1999). UDP-GlcNAc 2-epimerase: a regulator of cell surface sialylation. *Science* **284**: 1372-6.

Kim, Y. J., Borsig, L., Han, H. L., Varki, N. M., Varki, A. (1999). Distinct selectin ligands on colon carcinoma mucins can mediate pathological interactions among platelets, leukocytes and endothelium. *Am J Pathol* **155**:461-72.

Klootwijk, R. D., Savelkoul, J. M., Ciccone, C., Manoli, I., Caplen, N. J., Krasnewich, D. M., Gahl, W. A., Huizing, M. (2008). Allele-specific silencing of the dominant disease allele in sialuria by RNA interference. *FASEB J* **22**:3846-52.

Kobayashi, H., Boelte, l. K. C., Lin, P. C. (2007). Endothelial cell adhesion molecules and cancer progression. *Curr Med Chem* **14**:377-86.

Kohla, G., Stockfleth, E., Schauer, R. (2002). Gangliosides with O-acetylated sialic acids in tumors of neuroectodermal origin. *Neurochem Res* **27**:583-92.

Koike, T., Kimura, N., Miyazaki, K., Yabuta, T., Kumamoto, K., Takenoshita, S., Chen, J., Kobayashi, M., Hosokawa, M., Taniguchi, A., Kojima, T., Ishida, N., Kawakita, M., Yamamoto, H., Takematsu, H., Suzuki, A., Kozutsimi, Y. (2004). Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: a missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:8132-7.

Kong, Q. W., Cheng, J. S., Zhao, G., Wang, L., Guo, H. J. (2004). Sequence of Escherichia coli O138 O-antigen cluster and gne identification by bioinformatics. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **44**:756-60.

Kontou, M., Bauer, C., Reutter, W., Horstkorte, R. (2008). Sialic acid metabolism is involved in the regulation of gene expression during neuronal differentiation of PC12 cells. *Glycoconj J* **25**:237-44.

Kontou, M., Weidemann, W., Bork, K., Horstkorte, R. (2009). Beyond glycosylation: sialic acid precursors act as signalling molecules and are involved in cellular control of differentiation of PC12 cells. *Biol Chem* **390**:575-9.

Kornfeld, S., Kornfeld, R., Neufeld, E. F., O´Brien, P. J. (1964). The feedback control of sugar nucleotide biosynthesis in liver. *Proc Natl Sci USA* **52**:371-9.

Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Simopoulos, C., Polychronidis, A., Sivridis, E. (2005). Lactate dehydrogenase 5 (LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis* **22**:25-30.

Kozlova, N. I., Morozevich, G. E., Chubukina, A. N., Berman, A. E. (2001). Integrin αVβ3 promotes anchorage-dependent apoptosis in human intestinal carcinoma cells. *Oncogene* **20**:4710-7.

Krause, S., Hinderlich, S., Amsili, S., Horstkorte, R., Wiendl, H., Argov, Z., Mitrani-Rosenbaum, S., Lochmüller, H. (2005). Localization of UDP-GlcNAc 2 epimerase/ManNAc kinase (GNE) in the Golgi complex and the nucleus of mammalian cells. *Exp Cell Res* **304**: 365-79.

Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., Gage, F. H. (1996). Neurogenesis in the dentate gynes of adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* **16**:2027-33.

Kurochkina, N., Yardeni, T., Huizing, M. (2009). Molecular modeling of the bifunctional enzyme UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase and predictions of structural effects of mutations associated with HIBM and sialuria. *Glycobiology* **20**:322-37.

Kuwada, S. K., Kuang, J., Li, X. (2005). Integrin alpha5/beta1 expression mediates HER-2 down-regulation in colon cancer cells. *J Biol Chem* **280**:19027-35.

Kvist, A. P., Latvanlehto, A., Sund, M., Eklund, L., Väisänen, T., Hägg, P., Sormunen, R., Komulainen, J., Fässler, R., Pihlajaniemi, T. (2001). Lack of cytosolic and transmembrane domains of type XIII collagen results in progressive myopathy. *Am J Pathol* **159**:1581-92.

Lajaunias, F., Nitschke, L., Moll, T., Martinez-Soria, E., Semac, I., Chicheportiche, Y., Parkhouse, R. M. E., Izui, S. (2002). Differentially regulated expression and function of CD22 in activated B-1 and B-2 lymphocytes. *J Immunol* **168**:6078-83.

Laubli, H., Stevenson, J. L., Varki, A., Varki, N. M., Borsig, L. (2006). L-selectin faciliation of metastasis involves temporal induction of Fut7-dependent ligands at sites of tumor cell arrest. *Cancer Res* **66**:1536-42.

Laurell, H., Bouisson, M., Berthelemy, P., Rochaix, P., Dejean, S., Besse, P., Susini, C., Pradayrol, L., Vaysse, N., Buscail, L. (2006). Identification of biomarkers of human pancreatic adenocarcinomas by expression profiling and validation with gene expression analysis in endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration samples. *World J Gastroenterol* **12**:3344-51.

Lawlor, E. R., Scheel, C., Irving, J., Sorensen, P. H. (2002) Anchorage-independent multi-cellular spheroids as an in vitro model of growth signaling in Ewing tumors. *Oncogene* **21**:307-18.

Le Gall, M., Chambard, J. C., Breittmayer, J. P., Grall, D., Pouyssegur, J., van Obberghen-Schilling, E. (2000). The p42/p44 MAP kinase pathway prevents apoptosis induced by anchorage and serum removal. *Mol Biol Cell* **11**:1103-12.

Lehmann, F., Gäthje, H., Kelm, S., Dietz, F. (2004). Evolution of sialic acid-binding proteins: molecular cloning and expression of fish Siglec-4. *Glycobiology* **14**:959-68.

Leiblich, A., Cross, S. S., Catto, J. W. F., Phillips, J. T., Leung, H. Y., Hamdy, F. C., Rehman, I. (2006). Lactate dehydrogenase-B is silenced by promoter hypermethylation in human prostate cancer. *Oncogene* **25**:2953-60.

Lerdrup, M., Holmberg, C., Dietrich, N., Shaulian, E., Herdegen, T., Jäättelä, M., Kallunki, T. (2005). Depletion of the AP-1 repressor JDP2 induces cell death similar to apoptosis. *Biochem Biophys Act* **1745**:29-37.

Leroy, J. G., Seppala, R., Huizing, M., Dacremont, G., De Simpel, H., Van Coster, R. N., Orvisky, E., Krasnevich, D. M., Gahl, W. A. (2001). Dominant inheritance of sialuria, an inborn error of feedback inhibition. *Am J Hum Genet* **68**:1419-27.

Lewis, A. L., Desa, N., Hansen, E. E., Knirel, J. I., Gordon, J. I., Gagneux, P., Nizet, V., Varki, A. (2009). Innovations on host and microbial sialic acid biosynthesis revealed by phylogenomic prediction of nonulosonic acid structure. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:13552-7.

Li, J., Lee, A. S. (2006). Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr Mol Med* **6**:45-54.

Liau, S. S., Jazag, A., Ito, K., Whang, E. E. (2007). Overexpression of HMGA1 promotes anoikis restistance and constitutive Akt activation in pancreatic adenocarcinoma cells. *Br J Cancer* **96**:993-1000.

Lin, J. H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H. R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K. M., LaVail, M. M., Walter, P. (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* **318**:944-9.

Lin, S., Kemmner, W., Grigull, S., Schlag, P. M. (2002). Cell surface alpha 2,6 sialylation affects adhesion of breast carcinoma cells. *Exp Cell Res* **276**:101-10.

Lise, M., Belluco, C., Perera, S. P., Patel, R., Thomas, P., Ganguly, A. (2000). Clinical correlations of α2,6-sialyltransferase expression in colorectal cancer patients. *Hybridoma* **19**:281-6.

Liu, Z., Li, H., Derouet, M., Berezkin, A., Sasazuki, T., Shirasawa, S., Rosen, K. (2006). Oncogenic ras inhibits anoikis of intestinal epithelial cells by preventing the release of a mitochondrial pro-apoptotic protein Omi/HtrA2 into the cytoplasma. *J Biol Chem* **281**:14738-47.

Logsdon, C. D., Simeone, D. M., Binkley, C., Arumugam, T., Greenson, J. K., Giordano, T. J., Misek, D. E., Kuick, R., Hanash, S. (2003). Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. *Cancer Res* **63**:2649-57.

Lorenzi, P. L., Reinhold, W. C., Rudelius, M., Gunsior, M., Shankavaram, U., Bussey, K. J., Scherf, U., Eichler, G. S., Martin, S. E., Chin, K., Gray, J. W., Kohn, E. C., Horak, L. D., Von Hoff, D. D., Raffeld, M., Goldsmith, P. K., Caplen, N. J., Weinstein, J. N. (2006). Asparagine synthetase as a causal, predictive biomarker for L-asparagine activity in ovarian cancer cells. *Mol Cancer Ther* **5**:2613-23.

Lucka, L., Krause, M., Danker, K., Reutter, W., Horstkorte, R. (1999). Primary structure and expression analysis of human UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase, the bifunctional enzyme in neuraminic acid biosynthesis. *FEBS Letters* **454**:341-44.

Ma, Y., Hendershot, L. M. (2004). The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat Review Cancer* **4**:966-77.

Magesh, S., Suzuki, T., Miyagi, T., Ishida, H., Kiso, M. (2006). Homology modeling of human sialidase enzymes NEU1, NEU3, NEU4 based on the crystal structure of NEU2: hints for the design of selective NEU3 inhibitors. *J Mol Model* **25**:196-207.

Malagolini, N., Chirocolo, M., Marini, M., Dall´Olio, F. (2009). Exposure of alpha 2,6-sialylated lactosaminic chains marks apoptotic and necrotic death in different cell types. *Glycobiology* **19**:172-81.

Malicdan, M. C. V., Noguchi, S., Nonaka, I., Hayashi, Y. K. (2007). A Gne knockout mouse expressing human GNE D176V mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet* **16**:2669-82.

Maliekal, P., Vertommen, D., Delpierre, G., Van Schaftingen, E. (2006). Identification of the sequence encoding N-acetylneuraminate-9-phosphate phosphatase. *Glycobiology* **16**:165-72.

Malisan, F., Franchi, L., Tomassini, B., Ventura, N., Condo, I., Rippo, M. R., Rufini, A., Liberati, L., Nachtigall, C., Kniep, B., Testi, R. (2002) Acetylation suppresses the proapoptotic activity of GD3 ganglioside. *J Exp Med* **196**:1535-41.

Manzi, A. E., Diaz, S., Varki, A. (1990). High-pressure liquid chromatography of sialic acids on pellicular resin anion-exchange column with pulsed amperometric detection: a comparison with six other systems. *Anal Biochem* **188**:20-32.

Marastoni, S., Ligresti, G., Lorenzon, E., Colombatti, A., Mongiat, M. (2008). Extracellular matrix: a matter of life and death. *Connect Tissue Res* **49**:203-6.

Markopoulos, A. K., Deligianni, E., Antoniades, D. Z. (2009). Heat shock protein 70 membrane expression in oral cancer: a possible new target in antineoplastic therapy? *Chemotherapy* **55**:211-4.

Martinez, V. G., Pellizzari, E. H., Diaz, E. S., Cigorraga, S. B., Lustig, L., Denduchis, B., Wolfenstein-Todel, C., Iglesias, M. M. (2004). Galectin-1, a cell adhesion modulator, increases apoptosis of rat Leydig cells in vitro. *Glycobiology* **14**:127-37.

Maru, I., Ohnishi, J., Ohta, Y., Tsukada, Y. (2002). Why is sialic acid attracting interest now? Complete enzymatic synthesis of sialic acid with N-acylglucosamine 2-epimerase. *J Biosci Bioeng* **93**:258-65.

Mashimo, J., Maniwa, R., Sugino, H., Nose, K. (1997). Decrease in the expression of a novel TGF beta1-inducible and ras-recision gene, TSC-36, in human cancer cells. *Cancer Lett* **113**:213-9.

McFall, A., Ulkü, A., Lambert, Q. T., Kusa, A., Rogers-Graham, K., Der, C. J. (2001). Oncogenic Ras blocks anoikis by activation of a novel effector pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* **21**:5488-99.

Meredith, J. E., Fazeli, B., Schwartz, M. A. (1993). The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* **4**:953-61.

Mungrue, I. N., Pagnon, J., Kohannim, O., Gargalovic, P. S., Lusis, A. J. (2009). CHAC1/MGC4504 is a novel proapoptotic component of the unfolded protein response, downstream of the ATF4-ATF3-CHOP cascade. *J Immunol* **182**:466-76.

Münster, A.-K., Eckhardt, M., Potvin, B., Mühlenhoff, M., Stanley, P., Gerardy-Schahn, R. (1998). Mammalian Cytidine 5´-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase: a nuclear protein with evolutionary conserved structural motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:9140-5.

Münster, A.K., Weinhold, B., Gotza, B., Mühlenhoff, M., Frosch, M., Gerardy-Schahn, R. (2002). Nuclear localization signal of murine CMP-Neu5Ac synthetase includes residues required for both nuclear targeting and enzymatic activity. *J Biol Chem* **277**:19688-96.

Nakata, D., Troy, F. A. (2005). Degree of polymerization (DP) of polysialic acid (polySia) on neural cell adhesion molecules (N-CAMS): development and application of new strategy to accurately determine the DP of polySia chains on N-CAMS. *Biol Chem* **280**:38305-16.

Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propodium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Meth* **139**:271-79.

Nishino, I., Malicdan, M. C., Murayama, K. Nonaka, I., Hayashi, Y. U., Noguchi, S. (2005). Molecular pathomechanism of distal myopathy with rimmed vacuoles. *Acta Myol* **24**:80-3.

Noguchi, S., Keira, Y., Murayama, K., Ogawa, M., Fujita, M., Kawahara, G., Oya, Y., Imazawa, M., Goto, Y., Hayashi, Y. K., Nonaka, I., Nishino, I. (2004). Reduction of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase activity and sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles*. J Biol Chem* **279**:11402-7.

Oetke, C., Hinderlich, S., Reutter, W., Pawlita, M. (2003). Epigenetically mediated loss of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase expression in hyposialylated cell lines. *Biochem Biophys Res Comm* **308**:892-98.

Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K., Hayashi, H. C. (2005). TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J* **24**:1243-55.

Oliva, J. P., Valdes, Z., Casaco, A., Pimentel, G., Gonzales, J., Alvarez, I., Osorio, M., Velazco, M., Figueroa, M., Ortiz, R., Escobar, X., Orozco, M., Cruz, J., Franco, S., Diaz, M., Roque, L., Carr, A., Vazquez, A. M., Mateos, C., Rubio, M. C., Perez, R., Fernandez, L. E. (2005). Clinical evidences of GM3 (NeuGc) ganglioside expression in human breast cancer using the 14F7 monoclonal antibody labelled with (99m)Tc. *Breast Cancer Res Treat* **96**:115-21.

Örd, D., Meerits, K., Örd, T. (2007). TRB3 protects cells against the growth inhibitory and cytotoxic effect of ATF4. *Exp Cell Res* **313**:3556-67.

Ortiz-Zapater, E., Peiro, S., Roda, O., Corominas, J. M., Aguilar, S., Ampurdanes, C., Real, F. X., Navarro, P. (2007). Tissue plasminogen activator induces pancreatic cancer cell proliferation by a non-catalytic mechanism that requires extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation through epidermal growth factor receptor and annexin A2. *Am J Pathol* **170**:1573-84.

Ostrovsky, O., Bengal, E., Aronheim, A. (2002). Induction of terminal differentiation by the c-Jun dimerization protein JDP2 in C2 myoblasts and rhabdomyosarcoma cells. *J Biol Chem* **277**:40043-54.

Paratcha, G., Ledda, F., Ibanez, C. F. (2003). The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signalling receptor for GDNF family ligands. *Cell* **113**:867-79.

Parsons, M. D., Patel, P., Brat, D. J., Colbert, L., Vertino, P. M. (2009). Silencing of TMS1/ASC promotes resistance to anoikis in breast epithelial cells. *Cancer Res* **69**:1706-11.

Penner, J., Mantey, L. R., Elgavish, S., Ghaderi, D., Cirak, S., Berger, M., Krause, S., Lucka, L., Voit, T., Mitrani-Rosenbaum, S., Hinderlich, S. (2006). Influence of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase mutant proteins on hereditary inclusion body myopathy. *Biochemistry* **45**:2968-77.

Peracaula, R., Tabares, G., Lopez-Ferrer, A., Brossmer, R., de Bolos, C., de Llorens, R. (2005). Role of sialyltransferases involved in the biosynthesis of Lewis antigens in human pancreatic tumour cells. *Glycoconj J* **22**:135-44.

Petrozzelli, L., Takami, M., Humes, H. D. (1999). Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med* **106**:467-76.

Pirot, P., Ortis, F., Cnop, M., Ma, Y., Hendershot, L. M., Eizirik, D. L., Cardozo, A. K. (2007). Transcriptional regulation of the Endoplasmatic Reticulum stress gene CHOP in pancreatic insulin-producing cells. *Diabetes* **56**:1069-77.

Plath, T., Detjen, K., Welzel, M., von Marschall, Z., Murphy, D., Schirner, M., Wiedenmann, B., Rosewicz, S. (2000). A novel function for the tumor suppressor p16 (INK4a): induction of anoikis via upregulation of the alpha (5) beta (1) fibronectin receptor. *J Cell Biol* **150**:1467-78.

Polakowska, R., Piacentini, M., Bartlett, R., Goldsmith, L., Haake, A. (1994). Apoptosis in human skin development: morphogenesis, periderm and stem cells. *Dev Dyn* **3**:176-88.

Poon, T. C., Chiu, C. H., Lai, P. B., Mok, T. S., Zee, B., Chan, A. T., Sung, J. J., Johnson, P. J. (2005). Correlation and prognostic significance of beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase and serum monosialylated alpha-feto-protein in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* **11**:6701-6.

Praetorius, J., Spring, K. R. (2002). Specific lectins map the distribution of fibronectin and beta 1-integrin on living MDCK cells. *Exp Cell Res* **276**:52-62.

Pretzlaff, R. K., Xue, V. W., Rowin, M. E. (2000). Sialidase treatment exposes the beta1-integrin active ligand binding site on HL60 cells and increases binding to fibronectin. *Cell Adhes Commun* **7**:491-500.

Przybyto, M., Stepien, E., Pfitzner, R., Litynska, A., Sadowski, J. (2007). Age effect on human aortic valvular glycoproteins. *Arch Med Res* **38**:495-502.

Pursiheimo, J. P., Rantanen, K., Heikkinen, P. T., Johansen, T., Jaakkola, P. M. (2009). Hypoxia-activated autophagy accelerates degradation of SQSTM1/p62. *Oncogene* **28**:334-44.

Pyrko, P., Schönthal, A. H., Hofman, F. M., Chen, T. C., Lee, A. S. (2007). The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Res* **67**:9809-16.

Raiborg, C., Malerod, L., Pedersen, N. M., Stenmark, H. (2008). Differential functions of Hrs and ESCRT proteins in endocytic membrane trafficking. *Exp Cell Res* **314**:801-13.

Reddig, P. J., Juliano, R. L. (2005). Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev* **24**:425-39.

Reddy, B. V., Kalraiya, R. D. (2006). Sialilated beta1,6 branched N-oligosaccharides modulate adhesion, chemotaxis and motility of melanoma cells: effect on invasion and spontaneous metastasis properties. *Biochim Biophys Acta* **1760**:1393-402.

Reddy, R. K., Mao, C., Baumeister, P., Austin, R. C., Kaufman, R. J., Lee, A. S. (2003). Endoplasmatic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem* **278**:20915-24.

Reginato, M. J., Mills, K. R., Paulus, J. K., Lynch, D. K., Sgroi, D. C., Debnath, J., Muthuswamy, S. K., Brugge, J. S. (2003). Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol* **5**:733-40.

Reinke, S. O., Hinderlich, S. (2007). Prediction of three different isoforms of the human UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase. *FEBS Lett* **581**:3327-31.

Reinke, S., Lehmer, G., Hinderlich, S., Reutter, W. (2009). Regulation and pathophysiological implications of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase (GNE) as the key enzyme of sialic acid biosynthesis. *Biol Chem* **390**:591-9.

Reutter, W., Stäsche, R., Stehling, P., Baum, O. (1997). The biology of sialic acids: insight into their structure, metabolism and function in particular during viral infection. *In: Glycosciences, Status and Perspectives, H.-J. Gabius und S. Gabius, eds.*: 245-59.

Rhodes, D. R., Yu, J., Shanker, K., Deshpande, N., Varambally, R., Ghosh, D., Barrette, T., Pandey, A., Chinnaiyan, A. M. (2004). ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia* **6**:1-6.

Ricca, T. I., Liang, G., Suenaga, A. P., Han, S. W., Jones, P. A., Jasiulionis, M. G. (2009). Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 expression associated with gene demethylation confers anoikis resistance in early phases of melanocyte malignant transformation. *Transl Oncol* **2**:329-40.

Robinson, M. D., Speed, T. P. (2007). A comparison of Affymetrix gene expression arrays. *BMC Bioinformatics* **8**:449.

Roseman, S. (1970). The synthesis of carbohydrates by multiglycosyltransferase systems and their potential function in inter-cellular adhesion. *Chem Phys Lipids* **5**:270-97.

Roseman, S., Jourdian, G. W., Watson, D., Rood, R. (1961). Enzymatic synthesis of sialic acid 9-phosphates. *Proc Natl Acad Sci USA* **47**: 958-61.

Roth, J., Kempf, A., Reuter, G., Schauer, R., Gehring, W. J. (1992). Occurrence of sialic acids in Drosophila melanogaster. *Science* **256**:673-5.

Rouschop, K. M., Wouters, B. G. (2009). Regulation of autophagy through multiple independent hypoxic signaling pathways. *Curr Mol Med* **9**:417-24.

Rutishauser, U. (2008). Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* **9**:26-35.

Rutkowski, D. T., Arnold, S. M., Miller, C. N., Wu, J., Li, J., Gunnison, K. M., Mori, K., Sadighi Akha, A. A., Raden, D., Kaufman, R. J. (2006). Adaption to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PloS Biol* **4**:e374.

Rutkowski, D. T., Kaufman, R. J. (2004). A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* **14**:20-8.

Saito, F., Tomimitsu, H., Arai, K., Nakai, S., Kanda, T., Shimizu, T., Mizusawa, H., Matsumura, K. (2004). A Japanese patient with distal myopathy with rimmed vacuoles: missense mutations in the epimerase domain of the UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) gene accompanied by hyposialylation of skeletal muscle glycoproteins. *Neuromuscul Disord* **14**:158-61.

Salama, I., Hinderlich, S., Shlomai, Z., Eisenberg, I., Krause, S., Yarema, K., Argov, Z., Lochmuller, H., Reutter, W., Dabby, R., Sadeh, M., Ben-Bassat, H., Mitrani-Rosenbaum, S. (2005). No overall hyposialylation in hereditary inclusion body myopathy myoblasts carrying the homozygous M712T GNE mutation. *Biochem Biophys Res Commun* **328**:221-6.

Saldova, R., Wormald, M. R., Dwek, R. A., Rudd, P. M. (2008). Glycosylation changes on serum glycoproteins in ovarian cancer may contribute to disease pathogenesis. *Dis Markers* **25**:219-32.

Sambuccetti, L. C., Fischer, D. D., Zabludoff, S., Kwon, P. O., Chamberlin, H., Trogani, N., Xu, H., Cohen, D. (1999). Histone deacetylase inhibition selectively alters the activity and expression of cell cycle proteins leading to specific chromatin acetylation and antiproliferative effects. *J Biol Chem* **274**:34940-7.

Sanders, W. J., Gordon, E. J., Dwir, O., Beck, P. J., Alon, R., Kiessling, L. L. (1999). Inhibition of L-selectin mediated leukocyte rolling by synthetic glycoprotein mimics. *J Biol Chem* **274**:5271-8.

Savelkoul, P. J. M., Manoli, I., Sparks, S. E., Ciccone, C., Gahl, W. A., Krasnevich, D. M., Huizing, M. (2006). Normal sialylation of serum N-linked and O-GalNAc-linked glycans in hereditary inclusion-body myopathy. *Mol Genet Metab* **4**:389-90.

Schachner, M., Bartsch, U. (2000). Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG (siglec-4a) in formation and maintenance of myelin. *Glia* **29**:154-65.

Schauer, R. (1982). Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem* **40**:131-234.

Schauer, R. (1985): Sialic acids and their role as biological masks. *Trends Biochem Sci* **10**:357-60.

Schauer, R. (2000). Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconj J* **17**:485-99.

Schauer, R. (2009). Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol* **19**:507-14.

Schreiber, S. C., Giehl, K., Kastilan, C., Hasel, C., Mühlenhoff, M., Adler, G., Wedlich, D., Menke, A. (2008). Polysialylated NCAM represses E-cadherin-mediated cell-cell adhesion in pancreatic tumor cells. *Gastroenterology* **134**:1555-66.

Schroder, M., Kaufmann, R. J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* **74**:739-89.

Schutte, M., Hruban, R. H., Geradts, J., Maynard, R., Hilgers, W., Rabindran, S. K., Moskaluk, C. A., Hahn, S. A., Schwarte-Waldhoff, I., Schmiegel, W., Baylin, S. B., Kern, S. E., Herman, J. G. (1997). Abrogation of the Rb/p16 tumor suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* **57**:3126-30.

Schwarzkopf, M., Knobeloch, K. P., Rohde, E., Hinderlich, S., Wiechens, N., Lucka, L., Horak, I., Reutter, W., Horstkorte, R. (2002). Sialylation is essential for early development in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:5267-70.

Seales, E. C., Jurado, G. A., Brunson, B. A., Wakefield, J. K., Frost, A., R., Bellis, S. L. (2005). Hypersialylation of beta 1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility. *Cancer Res* **65**:4645-52.

Seales, E. C., Jurado, G. A., Singhai, A., Bellis, S. L. (2003). Ras oncogene directs expression of a differentially sialylated, functionally altered β1 integrin. *Oncogene* **22**:7137-45.

Segara, D., Biankin, A. V., Kench, J. G., Langusch, C. C., Dawson, A. C., Skalicky, D. A., Gotley, D. C., Coleman, M. J., Sutherland, R. L., Henshall, S. M. (2005). Expression of HOXB2, a retinoic acid signaling target in pancreatic cancer and pancreatic intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res* **11**:3587-96.

Seki, T., Arai, Y. (1993). Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci Res* **17**:265-90.

Semel, A. C., Seales, E. C., Singhai, A., Eklund, E. A., Colley, K. J., Bellis, S. L. (2002). Hyposialylation of integrins stimulates the activity of myeloid fibronectin receptors. *J Biol Chem* **277**:32830-6.

Seppala, R., Lehto, V. P., Gahl, W. A. (1999). Mutations in the human UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase gene define the disease sialuria and the allosteric site of the enzyme. *Am J Hum Genet* **64**:1563-9.

Shaik, F. M., Seales, E. C., Clem, W. C., Hennessy, K. M., Zhuo, Y., Bellis, S. L. (2008). Tumor cell migration and invasion are upregulated by expression of variant integrin glycoforms. *Exp Cell Res* **14**:2941-50.

Shang, Y. Y., Zhong, M., Zhang, L. P., Guo, Z. X., Wang, Z. H., Zhang, Y., Deng, J. T., Zhang, W. (2009). Tribble 3, a novel oxidized low-density lipoprotein-inducible gene, is induced via the activating transcription factor 4-C/CEBP homologous protein pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **37**:51-5.

Shapiro, G. I., Edwards, C. D., Ewen, M. E., Rollins, B. J. (1998). p6INK4A participates in a G1 arrest checkpoint in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **18**:378-87.

Shi, L., Jones, W. D., Jensen, R. V., Harris, S. C., Perkins, R. G., Goodsaid, F. M., Guo, L., Croner, L. J., Boysen, C., Fang, H., Qian, F., Amur, S., Bao, W., Barbacioru, C. C., Bertholet, V., Cao, X. M., Chu, T. M., Collins, P. J., Fan, X. H., Frueh, F. W., Fuscoe, J. C., Guo, X., Han, J., Herman, D., Hong, H., Kawasaki, E. S., Li, Q. Z., Luo, Y., Ma, Y., Mei, N., Peterson, R. L., Puri, R. K., Shippy, R., Su, Z., Sun, Y. A., Sun, H., Thorn, B., Turpaz, Y., Wang, C., Wang, S. J., Warrington, J. A., Willey, J. C., Wu, J., Xie, Q., Zhang, L., Zhang, L., Zhong, S., Wolfinger, R. D., Tong, W. (2008). The balance and reproducibility, sensitivity, and specificity of lists of differentially expressed genes in microarray studies. *BMC Bioinformatics* **9 Suppl. 9**:S10.

Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Sato, J., Miyagi, T. (2009). Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) promotes formation of colonic aberrant crypt foci in Azoxymethane-treated transgenic mice. *Cancer Sci* **100**:588-94.

Singh, R., Campbell, B. J., Yu, L. G., Fernig, D. G., Milton, J. D., Goodlad, R. A., Fitzgerald, A. J., Rhodes, J. M. (2001). Cell surface-expressed Thomsen-Friedenreich antigen in colon cancer is predominantly carried on high molecular weight splice variants of CD44. *Glycobiology* **11**:587-92.

Sommar, K. M., Ellis, D. B. (1972). Uridine diphosphate N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase from rat liver: catalytic and regulatory properties. *Biochim Biophys Acta* **268**:581-9.

Sprenger, N., Julita, M., Donnicola, D., Jahn, A. (2009). Sialic acid feeding aged rats rejuvenates stimulated salivation and colonic enteric neuron chemotypes. *Glycobiology* **19**:1492-502.

Stäsche, R., Hinderlich, S., Weise, C., Effertz, K., Lucka, L., Moormann, P., Reutter, W. (1997). A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Molecular cloning and functional expression of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *J Biol Chem* **272**:24319-24.

Su, A., Welsh, J. B., Sapinoso, L. M., Kern, S. G., Dimitrov, P., Lapp, H., Schultz, P. G., Powell, S. M., Moskaluk, C. A., Frierson, H. F., Hampton, G. M. (2001). Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures. *Cancer Res* **61**:7388-93.

Su, N., Kilberg, M. S. (2008). C/EBP Homology Protein (CHOP) interacts with activating transcription factor 4 (ATF4) and negatively regulates the stress-dependent induction of the asparagine synthetase gene. *J Biol Chem* **283**:35106-17.

Sumitomo, K., Kurisaki, A., Yamakawa, N., Tsuchida, K., Shimizu, E., Sone, S., Sugino, H. (2000). Expression of a TGF-beta1 inducible gene, TSC-36, causes growth inhibition in human lung cancer cell lines. *Cancer Lett* **155**:37-46.

Suwa, D., Konno, H., Tanaka, T., Urano, T. (2008). Intraperitoneal infusion of recombinant plasminogen activator inhibitor type 2 induced apoptosis in implanted human colon cancer and inhibited its growth and liver metastasis. *Anticancer Res* **28**:693-8.

Suzuki, E., Imoto, I., Pimkhaokham, A., Nakagawa, T., Kamata, N., Kozaki, K. I., Amagasa, T., Inazawa, J. (2007). PRTFDC1, a possible tumor-suppressor gene, is frequently silenced in oral squamous cell carcinomas by aberrant promotor hypermethylation. *Oncogene* **26**:7921-32.

Suzuki, O., Nozawa, Y., Abe, M. (2006). The regulatory roles of cell surface sialylation and N-glycans in human B cell lymphoma cell adhesion to galectin-1. *Int J Oncol* **28**:155-60.

Swanson, B. J., McDermott, K. M., Singh, P. K., Eggers, J. P., Crocker, P. R., Hollingsworth, M. A. (2007). MUC1 is a counter-receptor for Myelin-associated Glycoprotein (Siglec-4a) and their interaction contributes to adhesion in pancreatic cancer perineural invasion. *Cancer Res* **67**:10222-9.

Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmatic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* **7**:880-5.

Takashima, S., Seino, J., Nakano, T., Fujiyama, K., Tsujimoto, M., Ishida, N., Hashimoto, Y. (2009). Analysis of CMP-sialic acid transporter-like proteins in plants. *Phytochemistry* **70**:1973-81.

Thangaraju, M., Carswell, K. N., Prasad, P. D., Ganapathy, V. (2009). Colon cancer cells maintain low levels of pyruvate to avoid cell death caused by inhibition of HDAC1/HDAC3. *Biochem J* **417**:379-89.

Tong, Y., Tempel, W., Neyalkova, L., MacKenzie, F., Park, H. W. (2009). Crystal structure of the N-acetylmannosamine kinase domain of GNE. *PLOS One* **4**: e7165.

Traving, C., Schauer, R. (1998). Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell Mol Life Sci* **54**:1330-49.

Tsuchida, T., Kijima, H., Oshika, Y., Tokunaga, T., Abe, Y., Yamazaki, H., Tamaoki, N., Ueyama, Y., Scanlon, K. J., Nakamura, M. (1998). Hammerhead ribozyme specifically inhibits mutant K-ras mRNA of human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **253**:368-73.

Tuomisto, A., Sund, M., Tahkeda, J., Latvanlehto, A., Savolainen, E. R., Autio-Harmainen, H., Liakka, A., Sormunen, R., Vuoristo J., West, A., Lahesmaa, R., Morse, H. C., Pihlajaniemi, T. (2008). Mutant collagen XIII alters intestinal expression of immune response genes and predisposes transgenic mice to develop B-cell lymphomas. *Cancer Res* **68**:10324-32.

Uemura, T., Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Miyazaki, S., Satomi, S., Kato, K., Sakuraba, H., Miyagi, T. (2009): Contribution of sialidase Neu1 to suppression of metastasis of human colon cancer cells through desialylation of integrin β4. *Oncogene* **28**:1218-29.

Vachon, P. H. (2008). W1967 colon cancer cells and anoikis resistance: EGFR-dependent sustained activation of th Src-MEK/ERK pathway can override dependence on FAK, PI3-K/AKT-1 for survival. *Gastroent* **134**:744.

Valentijn, A. J., Zouq, N., Gilmore, A. P. (2004). Anoikis. *Biochem Soc Trans* **32**:421-5.

Vann, W. F., Tavarez, J. J., Crawley, J., Vimr, E., Silver, R. P. (1997). Purification and characterization of the Escherichia coli K1 neuB gene product N-acetylneuraminic acid synthetase. *Glycobiology* **7**:697-701.

Van Rinsum, J., Van Dijk, W., Hooghwinkel, G. J., Ferwerda, W. (1983). Subcellular localization and tissue distribution of sialic acid precursor-forming enzymes. *Biochem J* **210**:21-8.

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

Varki, A. (2008). Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med* **14**:351-60.

Varki, A. (2009). Multiple changes in sialic acid biology during human evolution. *Glycoconj J* **26**:231-45.

Varki, A., Angata, T. (2006). Siglecs – the major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology* **16**:1-27.

Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W., Etzler, M. E. (2008). Essentials of Glycobiology. *Cold Spring Harbor Press*, 2nd edition.

Varner, J. A., Emerson, D. A., Juliano, R. L. (1995). Integrin α5β1 expression negatively regulates cell growth: reversal by attachement fo fibronectin. *Mol Biol Cell* **6**:725-40.

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

Vie, N., Copois, V., Bascoul-Mollevi, C., Dennis, V., Bec, N., Robert, B., Fraslon, C., Conseiller, E., Molina, F., Larroque, C., Martineau, P., Del Rio, M., Gongora, C. (2008). Overexpression of phosphoserine aminotransferase PSAT1 stimulates cell growth and increases chemoresistance of colon cancer cells. *Mol Cancer* **7**:14.

Vimr, E. R., Kalivoda, K. A., Deszo, E. L., Steenbergen, S. M. (2004). Diversity of microbial sialic acid biosynthesis. Microbiol. *Mol Biol Rev* **68**:132-53.

Walsh, N., Clynes, M., Crown, J., O´Donovan, N. (2009). Alterations in integrin expression modulates invasion of pancreatic cancer cells. *J Exp Cancer Res* **28**:140.

Wang, L. H. (2004). Molecular signalling regulating anchorage-independent growth of cancer cells. *Mt Sinai J Med* **71**:361-7.

Wang, P. H. (2005). Altered glycosylation in cancer: sialic acids and sialyltransferases. *J Cancer Mol* **1**:73-81.

Wang, Z., Sun, Z., Li, A. V., Yarema, K. J. (2006). Roles for UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc 6-Kinase outside of Sialic Acid Biosynthesis. *J Biol Chem* **281**:27016-28.

Warnat, P., Eils, R., Brors, B. (2005). Cross-platform analysis of cancer microarray data improves gene expression based classification of phenotypes. *BMC Bioinformatics* **6**:265.

Warren, L., Fuhrer, J. P., Buck, C. A. (1972). Surface glycoproteins of normal and transformed cells: a difference determined by sialic acid and a growth-dependent sialyl transferase. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**:1838-42.

Watson, D. R., Jourdian, G. W., Roseman, S. (1966). The sialic acids. VIII. Sialic acid 9-phosphate synthetase. *J Biol Chem* **241**:5627-36.

Watts, G. D. J., Thorne, M., Kovach, M. J., Pestronk, A., Kimonis, V. A. (2003). Clinical and genetic heterogeneity in chromosome 9p associated hereditary inclusion body myopathy: exclusion of GNE and three other candidate genes. *Neuromuscul Disord* **13**:559-67.

Weidemann, W., Klukas, C., Klein, A., Simm, A., Schreiber, F., Horstkorte, R. (2009). Lessons from GNE-deficient embryonic stem cells: sialic acid biosynthesis is involved in proliferation and gene expression. *Glycobiology* **20**:107-17.

Weidenfeld-Baranboim, K., Bitton-Worms, K., Aronheim, A. (2008). TRE-dependent transcripiton activation by JDP2-CHOP10 association. *Nucleic Acid Res* **36**:3608-19.

Weidenfeld-Baranboim, K., Hasin, T., Darlyuk, I., Heinrich, R., Elhanani, O., Plan, J., Yokoyama, K. K., Aronheim, A. (2009). The ubiquitously expressed bZip inhibitor, JDP2, suppresses the transcription of its homologue immediate early gene counterpart ATF3. *Nucleic Acid Res* **37**:2194-203.

Welch, B. L. (1937): The significance of the difference between two means when the population variances are unequal. *Biometrika* **29**: 350-61.

Wooster, R. (2008): Transcript profiling of cancer cell line panel. *GlaxoSmithKline* (not published).

Wu, Z., Irizarry, R. A., Gentleman, R., Martinez Murillo, F., Spencer, F. (2004). A model based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. *Journal of the American Statistical Association* **99**:909-917.

Yawata, A., Adachi, M., Okuda, H., Naishiro, Y., Takamura, T., Hareyama, M., Takayama, S., Reed, J. C., Imai, K. (1998). Prolonged cell survival enhances peritoneal dissemination of gastric cancer cells. *Oncogene* **16**:2681-6.

Yogeeswaran, G., Salk, P. L. (1981). Metastatic potential is positively correlated with cell surface sialylation of cultured murine tumor cell lines. *Science* **212**: 1514-6.

Yu, Z., Maoui, M., Wu, L., Banville, D., Shen, S. H. (2001). mSiglec-E, a novel mouse CD33-related siglec (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) that recruits Src homology 2 (SH2)-domain-containing protein tyrosin phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Biochem J* **353**:483-92.

Zhang, K., Kaufman, R. J. (2004). Signaling in the unfolded protein response from the Endoplasmatic Reticulum. *J Biol Chem* **279**:25935-8.

Zhao, L., Ackerman, S. L. (2006). Endoplasmatic reticulum stress in health and disease. *Curr Opin Cell Biol* **18**:444-52.

Zhu, Z., Sanchez-Sweatman, O., Huang, X., Wiltrout, R., Khokha, R., Zhao, Q., Gorelik, E. (2001). Anoikis and metastatic potential of cloudman S91 melanoma cells. *Cancer Res* **61**:1707-16.

Zhuo, Y., Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Miyazaki, S., Satomi, S., Kato, K., Sakuraba, H., Miyagi, T. (2008): Sialylation of β1 integrins blocks cell adhesion to Galectin-3 and protects cells against Galectin-3 induced apoptosis. *J Biol Chem* **283**:22177-85.

8. Anhang

8.1 Veröffentlichungen

8.1.1 Publikationen

Forberich, P. (2005). Zellvermittelte Immunreaktion gegen mykobakterielle Antigene im Tiermodell Meerschweinchen. Diplomarbeit, Robert-Koch-Institut, Berlin.

André, S., Sanchez-Ruderisch, H., Nakagawa, H., Buchholz, M., Kopitz, J., Forberich, P., Kemmner, W., Böck, C., Deguchi, K., Detjen, K. M., Wiedenmann, B., von Knebel Doeberitz, M., Gress, T. M., Nishimura, S., Rosewicz, S., Gabius, H. J. (2007). Tumor suppressor p16INK4a – a modulator of glycomic profile and galectin-1 expression to increase susceptibility to carbohydrate-dependent induction of anoikis in pancreatic adenocarcinoma cells. *FEBS J.* **274**:3233-56.

8.1.2 Posterbeiträge

Forberich, P., Kemmner, W. (2008). The *GlycoProfiler*, a microarray designed for expression profiling of the glycosylation machinery of human cells. 10. DECHEMA Statusseminar Chiptechnologien, Frankfurt/M.

Forberich, P., Sanchez-Ruderisch, H., Hinderlich, S., Kemmner, W., Detjen, K. M. (2009). Sialylation regulates anoikis in pancreatic carcinoma cells. 15. Internationaler Krebskongress der AEK (Abteilung Experimenteller Krebsforschung)

8.2 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Wolfgang Kemmner für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und das zur Verfügung gestellte Thema bedanken. Sein reges Interesse und seine Unterstützung haben wesentlich zum Fortgang dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel für die freundliche Bereitschaft, die Begutachtung dieser Arbeit zu übernehmen und eine externe Dissertation zu unterstützen.

Ganz herzlich möchte ich mich vor allem bei den Mitarbeitern der AG Kemmner für das überaus kollegiale und entspannte Arbeitsklima bedanken. Allen voran bei Frau Sabine Grigull, die durch ihre unermüdliche Unterstützung einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit beitrug. Aber mein Dank geht auch an Gudrun Koch, Bianca Kochnowsky und Claudia Röefzaad, die mir wo und wie immer es ging technisch zur Seite standen.

Auch bei Steffi Schelenz will ich mich an dieser Stelle für ihre Hilfe in ihrem ersten Ausbildungsjahr bedanken. Mein Dank geht darüber hinaus an Katrin Göldner für ihre große Geduld und ihre unablässige Hilfe seit unserer gemeinsamen Diplomarbeitszeit.

Bedanken möchte ich mich bei den Kollegen aus dem „Doktorandenraum“ – Frau Dr. Céline Schäfer und Susann Förster – für die vielen wertvollen fachlichen und persönlichen Ratschläge und ihr stets offenes Ohr.

Zu guter Letzt gilt mein größter Dank meiner Familie. Vor allem meinen Eltern und meiner Schwester Susi, die immer an mich geglaubt haben und ohne die ich sicherlich nicht so weit gekommen wäre. Danken möchte ich auch meinem Mann Clemens, der immer rückhaltlos für mich da war. Ein stilles Andenken auch den Menschen, die diesen Moment nicht mehr mit mir teilen können.

Blasen-CA (n=9) **1**
Gehirn-und ZNS-CA (n=15) **2**
Brust-CA

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und mich keiner fremden Hilfe bedient habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß veröffentlichtem oder unveröffentlichtem Schrifttum entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch an keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

_____ _____

Ort/Datum **Unterschrift**