

**Studien zur Regulation der Expression der humanen  
Gene für die  $\alpha$ 2,8-Polysialyltransferasen  
ST8SiaII und ST8SiaIV**

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.  
genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Christoph Becker

geboren am 2. November 1967 in Lüneburg

1999

Referent: PD Dr. Walter Müller  
Korreferentin: PD Dr. Rita Gerardy-Schahn  
Tag der Promotion: 9. Februar 1999

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2 EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Polysialinsäure (PSA)</b>	<b>2</b>
<b>2.2 Das Neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM)</b>	<b>3</b>
<b>2.3 Die Regulation von Zellinteraktionen durch polysialyliertes NCAM</b>	<b>7</b>
2.3.1 PSA als entwicklungsabhängig regulierte posttranslationelle Modifikation des Neuralem Zelladhäsionsmoleküls	9
2.3.2 Persistierende PSA-Expression im adulten ZNS	10
2.3.3 Die Rolle der PSA bei Lern- und Gedächtnisfunktionen	11
2.3.4 Polysialyliertes NCAM als tumorassoziiertes Antigen	13
<b>2.4 Die Biosynthese der Polysialinsäure</b>	<b>14</b>
2.4.1 Die $\alpha$ 2,8-Polysialyltransferasen PST und STX	15
2.4.2 Die Regulation der Polysialyltransferasen PST und STX	17
<b>2.5 Reagenzien zum spezifischen PSA-Nachweis</b>	<b>18</b>
<b>2.6 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>19</b>
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Charakterisierung des Transkriptionsstarts der humanen PST</b>	<b>20</b>
3.1.1 5'-RACE-Analyse	20
3.1.2 Primer Extension	23
<b>3.2 Isolierung und Charakterisierung potentieller Promotorfragmente der humanen PSTs</b>	<b>25</b>
3.2.1 Screening einer humangenomischen P1-Phagenbank	25
3.2.2 Amplifikation von potentieller Promotorsequenz der huPST durch Genome Walking	28
3.2.3 Sequenzdarstellung der genomischen 5'-flankierenden Regionen von humaner PST und humaner STX	30
3.2.4 Sequenzalignments zwischen den 5'-Bereichen der murinen und humanen PST sowie der murinen und humanen STX	31
3.2.5 Potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in den 5'-Bereichen der humanen Polysialyltransferasen	36

<b>3.3 Reporterassays zur Charakterisierung der Minimalpromotoren von PST und STX</b>	<b>46</b>
<b>3.4 Die Expression der eukaryonten PSTs</b>	<b>49</b>
3.4.1 Die Expression der PSTs im Verlauf der fetalen und postnatalen Gehirnentwicklung	50
3.4.1.1 Northern Blots von Gesamtgehirn	50
3.4.2 Zelllinien	52
3.4.2.1 Analysen zur Bestimmung des PSA-Expressionsgrades auf humanen Tumorzelllinien	52
3.4.2.1.1 Durchflußzytometrie zur Bestimmung des PSA-Gehalts	53
3.4.2.1.2 Western Blot-Analysen zur Bestimmung des PSA-Gehalts	53
3.4.2.2 Northern Blots von humanen Tumorzelllinien	54
3.4.2.3 RT-PCRs von Zelllinien	56
3.4.2.4 Zusammenfassende Auswertung der Expressionsanalysen in humanen Tumorzelllinien	57
3.4.3 Solide Tumoren und Normalgewebe	58
3.4.3.1 Vorbemerkung zum Neuroblastom	58
3.4.3.2 APAAP-Färbungen von Tumor- und Normalgeweben	59
3.4.3.3 Northern Blots von Tumor- und Normalgeweben	64
3.4.3.4 RT-PCRs von Tumoren und Normalgeweben	66
3.4.3.5 Tabellarische Auswertung zu den Expressionsanalysen in Tumoren und Normalgeweben	67
3.4.3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Expression der PSTs in soliden Tumoren	68
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>70</b>
<b>4.1 Bestimmung der Transkriptionsstarts der humanen PSTs</b>	<b>70</b>
4.1.1 Transkriptionsstart der humanen PST	70
4.1.2 Transkriptionsstart der humanen STX	71
<b>4.2 Die Regulation von PST und STX</b>	<b>72</b>
4.2.1 Potentielle Bindungsstellen in den 5'-Bereichen von PST und STX und Charakterisierung ihrer Minimalpromotoren	73
<b>4.3 PSTs-mRNA-Expression in Eukaryonten</b>	<b>78</b>
4.3.1 Die Expression der PSTs im Verlauf der fetalen und postnatalen Gehirnentwicklung	78
<b>4.4 Die Expression der PSTs in Zelllinien und Tumoren</b>	<b>81</b>
4.4.1 Abweichende Expressionsraten der PSTs in Zelllinien	81
4.4.2 Die Expression der PSTs in soliden Tumoren	83
4.4.2.1 Die Bedeutung der PSTs für die Serumkonzentration von polysialyliertem NCAM in der Neuroblastomerkrankung	84
4.4.2.2 Quantitative Differenzen in den Expressionsraten der mRNAs von PST und STX in Neuroblastomen, nicht-neuroblastom Tumoren und Normalgeweben	86
4.4.2.2.1 Die Expression der PSTs in Neuroblastomen	87

# Inhaltsverzeichnis

---

4.4.2.2.2 Die Expression der PSTs in Normalgeweben	88
4.4.2.2.2.1 Nieren	88
4.4.2.2.2.2 Lunge	89
4.4.2.2.3 Die Expression der PSTs in nicht-neuroblastom Tumoren	90
4.4.2.2.3.1 Rhabdomyosarkom	90
4.4.2.2.3.2 Hepatoblastom	90
4.4.2.3 Die N- <i>myc</i> -Amplifikation	90
4.4.2.4 Die APAAP-Methodik zur Bestimmung des PSA-Expression	91
4.4.2.5 Komplexe Hybridisierungsmuster der PSTs in den Northern Blot-Analysen	92
4.4.2.6 Ausblick	93
<b>5 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>94</b>
<b>5.1 Material</b>	<b>94</b>
5.1.1 Versuchstiere	94
5.1.2 Gewebeproben und Gefrierschnitte	94
5.1.3 Zelllinien	94
5.1.4 Bakterienstämme	95
5.1.5 Plasmide und Vektoren	95
5.1.6 Oligonukleotide	96
5.1.7 Antikörper	97
5.1.8 Chemikalien	97
5.1.9 Enzyme	98
5.1.10 Molekulargewichtsstandards	98
5.1.11 Kits	98
5.1.12 Sonstige Materialien	99
5.1.13 Standardpuffer und Medien	99
5.1.14 Software für IT	102
<b>5.2 Methoden</b>	<b>103</b>
5.2.1 Zellbiologische Methoden	103
5.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien	103
5.2.1.2 Auftauen von Zellen	103
5.2.1.3 Einfrieren von Zellen	103
5.2.1.4 Transiente Transfektion	103
5.2.1.4.1 Lipofectamine	103
5.2.1.4.2 Effectene	104
5.2.1.5 Durchflußzytometrie	104
5.2.1.6 Immunhistochemie / APAAP-Methode	104
5.2.1.6.1 APAAP-Färbung	104
5.2.1.6.2 Auswertung und Darstellung	105

## Inhaltsverzeichnis

---

5.2.2 Biochemische Methoden	105
5.2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	105
5.2.2.2 Western Blot	106
5.2.2.2.1 "Semi-dry"-Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose	106
5.2.2.2.2 Spezifische Färbung mit Antikörpern	106
5.2.3 Molekularbiologische Methoden	106
5.2.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion	106
5.2.3.2 Ethanol- und Isopropanolpräzipitation von Nukleinsäuren	106
5.2.3.3 Agarosegelelektrophorese	107
5.2.3.3.1 DNA	107
5.2.3.3.2 RNA	107
5.2.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	107
5.2.3.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	108
5.2.3.6 Restriktionsspaltung von DNA	108
5.2.3.7 Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA	108
5.2.3.8 Ligation	108
5.2.3.9 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	109
5.2.3.9.1 CaCl <sub>2</sub> -Methode	109
5.2.3.9.2 Elektroporation	109
5.2.3.9.3 Herstellung kompetenter Bakterien	109
5.2.3.9.3.1 Kompetente Bakterien für die CaCl <sub>2</sub> -Methode	109
5.2.3.9.3.2 Kompetente Bakterien für die Elektroporation	109
5.2.3.10 Isolierung von Plasmid-DNA	110
5.2.3.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	110
5.2.3.12 Genome Walking	111
5.2.3.13 5'-RACE-System	111
5.2.3.14 Primer Extension	112
5.2.3.15 RNA-Präparationen	113
5.2.3.15.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryonten Zelllinien	113
5.2.3.15.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebeproben	113
5.2.3.15.3 Isolierung von Poly(A) <sup>+</sup> -RNA	113
5.2.3.16 RT-PCR	114
5.2.3.17 Hybridisierung	115
5.2.3.17.1 Northern Blot	115
5.2.3.17.2 Southern Blot	116
5.2.3.17.3 Methylenblaufärbung von Markern	116
5.2.3.17.4 Rehybridisierung von "gesrtrippten" Nylonmembranen	116
5.2.3.18 Digoxigenin-System	117
5.2.3.18.1 Markierung von Hybridisierungssonden	117

## Inhaltsverzeichnis

---

5.2.3.18.1.1 Tailing von Oligonukleotiden mit terminaler Transferase	117
5.2.3.18.1.2 Generierung digoxigenin-markierter PCR-Amplifikate	118
5.2.3.18.1.3 Digoxigenin-Markierung von RNA-Sonden (Riboprobes)	118
5.2.3.18.1.4 RNA-Sonden für die <i>in situ</i> -Hybridisierung	119
5.2.3.18.1.5 Markierungseffizienz	119
5.2.3.18.2 Chemilumineszenzdetektion	119
5.2.3.19 Reporterassay	119
5.2.3.20 Sequenzierung	120
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>121</b>
<b>7 ANHANG</b>	<b>135</b>
<b>7.1 Lebenslauf</b>	<b>135</b>
<b>7.2 Publikationen</b>	<b>136</b>
7.2.1 Artikel	136
7.2.2 Abstracts	136

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungen

Abb. 1: Struktur der drei Hauptbausteine polymerer Sialinsäuren	2
Abb. 2: Schematischer Aufbau verschiedener NCAM-Isoformen	4
Abb. 3: Struktur der PSA-tragenden Kohlenhydratseitenketten des NCAM	7
Abb. 4: Die Regulation von Zell-Zell-Kontakten durch Polysialinsäure	8
Abb. 5: Schematischer Aufbau einer eukaryonten Glykosyltransferase	15
Abb. 6: PCR-Amplifikation des 5'-Bereichs der humanen PST mit der 5'-RACE-Methode	21
Abb. 7: Sequenzdarstellung des längsten 5'-RACE-Produkts	22
Abb. 8: Partielle Sequenzdarstellung der zehn längsten 5'-RACE-Klone	23
Abb. 9: Primer Extension mit dem CB98 und mRNA aus fetalem Gesamtgehirn	24
Abb. 10: Southern Blot und Dot Blot von Fragmenten des STX/P1-Klons N053	26
Abb. 11: Southern Blots des PST/P1-Klons B0395	27
Abb. 12: Schematische Darstellung der drei durch "Genome Walking" gewonnenen Fragmente aus dem 5'-Bereich der huPST	29
Abb. 13: Genomischer 5'-Bereich der humanen STX	30
Abb. 14: Genomischer 5'-Bereich der humanen PST	31

## Inhaltsverzeichnis

---

Abb. 15: Alignment zwischen humaner und muriner PST	32
Abb. 16: Alignment zwischen humaner und muriner STX	35
Abb. 17: Vergleich potentieller Transkriptionsfaktorbindungsstellen zwischen der murinen und der humanen PST	37
Abb. 18: Vergleich potentieller Transkriptionsfaktorbindungsstellen zwischen der murinen und der humanen STX	37
Abb. 19: Reporterogenaktivität der Minimalpromotoren von PST und STX in verschiedenen humanen Zelllinien	47
Abb. 20: Northern Blots zur Bestimmung der Expressionslevel von PST, STX und NCAM im Verlauf der postnatalen Entwicklung des Rattenhirns	50
Abb. 21: Northern Blot für PST und STX in humanem fetalem Gesamtgehirn	51
Abb. 22: FACS-Analysen zur Bestimmung des PSA-Gehalts der Zelllinien SH-SY5Y und Hela-229	53
Abb. 23: Western Blot-Analysen zur Bestimmung des PSA-Gehalts der Zelllinien IMR-32, TE671, H69 und KG-1a <sup>+</sup>	54
Abb. 24: Northern Blots von PST und STX in verschiedenen humanen Tumorzelllinien	55
Abb. 25: RT-PCR-Analysen von verschiedenen humanen Tumorzelllinien	56
Abb. 26: APAAP-Färbung des Neuroblastoms Nr. 3 mit dem PSA-spezifischen mAk 735	60
Abb. 27: APAAP-Färbung des Neuroblastoms Nr. 3, Negativkontrolle	60
Abb. 28: APAAP-Färbung der Lunge Nr. 16 mit dem PSA-spezifischen mAk 735	61
Abb. 29: APAAP-Färbung der Lunge Nr. 16, Negativkontrolle	61
Abb. 30: APAAP-Färbung der Nebenniere Nr. 7 mit dem PSA-spezifischen mAk 735	62
Abb. 31: APAAP-Färbung der Nebenniere Nr. 7, Negativkontrolle	62
Abb. 32: APAAP-Färbung der Niere Nr. 20 mit dem PSA-spezifischen mAk 735	63
Abb. 33: APAAP-Färbung der Niere Nr. 20, Negativkontrolle	63
Abb. 34: APAAP-Färbung des RMS Nr. 11 mit dem PSA-spezifischen mAk 735	64
Abb. 35: Northern Blot-Analysen von Tumor- und Normalgeweben für die humane PST	65
Abb. 36: Northern Blot-Analysen von Tumor- und Normalgeweben für die humane STX	66
Abb. 37: Verlauf der Serumkonzentrationen von polysialyliertem NCAM in der Neuroblastom-Therapie	85
Abb. 38: Darstellung des GenomeWalker Adapters	111
Abb. 39: Darstellung des Marathon cDNA Adapters	112
Abb. 40: Schematische Darstellung der Zielsequenzen von Primern für die RT-PCR	114

### **Tabellen**

Tab. 1: Tabellarische Zusammenfassung der Untersuchungen zur PSA-Expression und zu den mRNA- Expressionsmustern von PST und STX in humanen Tumorzelllinien	57
Tab. 2: Daten der Neuroblastomstudie	67

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Asn	Asparagin
ATP (A)	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA
Ci	Curie
CIP	"Calf Intestinal Phosphatase"
CMP	Cytidinmonophosphat
CTP (C)	Cytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EndoN <sub>E</sub>	Endoneuraminidase N <sub>E</sub>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Fab	Antigen-bindendes Fragment
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kälberserum
g	Mittlere Erdbeschleunigung; 9.81 m/s <sup>2</sup>
GCN	Guanidiniumisothiocyanat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-stimulierender Faktor
GTP (G)	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
hu	Human
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Kdn	2-Keto-3-Deoxy-Nonulosonsäure

## Abkürzungsverzeichnis

---

kU	Kilo-Units
LB	Luria / Bertani (Medium)
M	Molar
mAk	Monoklonaler Antikörper
min	Minute(n)
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
mRNA	Messenger-RNA
MSD	Muskelspezifische Domäne
mu	Murin
NBT	Nitrotetrazoliumblausulfat
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
Neu5Ac	5- <i>N</i> -Acetyl-Neuraminsäure
Neu5Gc	5- <i>N</i> -Glycolylneuraminsäure
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NP-40	Nonident P-40
NZB	New Zealand B (Mausstamm)
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonen-Konzentration
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PSA	Polysialinsäure
PST	Polysialyltransferase-1 (ST8SiaIV)
PSTs	Polysialyltransferasen PST und STX
RNA	Ribonukleinsäure
rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
s.	Siehe
SCLC	Small Cell Lung Cancer (Kleinzelliges Bronchialkarziom)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
STX	Sialyltransferase X (ST8SiaII)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP (T)	Thymidintriphosphat
U	Unit
üN	Über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
Xgal	5-Brom-4-chlor-3-Indoyl-β-D-Galactosid

## ABSTRACTS

### Deutsch

Schlagworte: Polysialinsäure (PSA), Polysialyltransferasen (PSTs), Neuroblastom

Polysialyliertes NCAM moduliert entwicklungsabhängig und gewebsspezifisch die durch homophile NCAM-Interaktionen vermittelte Zelladhäsion im Verlauf ontogenetischer Differenzierungsvorgänge. Darüber hinaus korreliert das Erscheinen des Tumormarkers PSA positiv mit dem erhöhten metastatischen Potential einiger maligner Tumore. Die Polysialyltransferasen PST und STX werden als die Schlüsselaktivitäten in der PSA-Synthese angesehen. Eine differentielle Regulation der beiden Enzyme auf Transkriptionsebene scheint für die dynamische NCAM-Polysialylierung verantwortlich zu sein.

Mit dem Ziel, strukturelle Elemente der Gene der PSTs zu ermitteln, die für die gewebsspezifische und entwicklungsabhängige Expression verantwortlich sind, wurden die 5'-flankierenden Bereiche der humanen Gene isoliert und charakterisiert. Die 5'-Bereiche von PST und STX zeigen einen homologen Aufbau und zahlreiche Merkmale von CpG-Inseln. Beide Gene besitzen weder TATA- noch CAAT-Box. Dagegen finden sich in beiden 5'-Bereichen GC-Boxen, die in vergleichbarer Entfernung 5'-wärts eines singulären Transkriptionsstarts positioniert sind. Der Transkriptionsstartpunkt der humanen PST wurde auf ein Guanin in Position -323 festgelegt. Für die Analyse der Minimalpromotoren wurde ein Reportergenassay aufgebaut und als Minimalpromotor für eine zelltypspezifische Expression der PST ein Fragment von 439 bp mit Bindungsstellen für die Faktoren SP1, GATA-1, NF-Y und CREB identifiziert. Der Minimalpromotor der STX hat eine Länge von 351 bp und beinhaltet Bindungsstellen für die Faktoren SP1 und MZF1.

Im zweiten Schwerpunkt der Arbeit wurden innerhalb einer Kooperation die Expressionsmuster von PST und STX im Verlauf der postnatalen Entwicklung des Rattenhirns untersucht. Durch Northern Blot-Analysen und *in situ*-Hybridisierungsexperimente konnten dabei deutliche Differenzen im zeitlichen Verlauf und der gewebsspezifischen Expression der PSTs im rostralen Migrationsweg und dem Hippocampus festgestellt werden. Beide Gehirnregionen sind im adulten Stadium PSA-immunreaktiv und übernehmen wichtige Funktionen bei Lern- und Gedächtnisleistungen.

Die PSA wurde in mehreren Studien der letzten Jahre als ein im Serum von Tumorpatienten auftretender diagnostischer und prognostischer Marker vorgestellt. Ausgehend von der Hypothese, daß die Reexpression der PSA das maligne Wachstum von Tumoren fördert, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Beteiligung der beiden PSTs bei der Reexpression der PSA im Tumor festzustellen. Die vorgestellten Ergebnisse zur Verteilung von PST- und STX-mRNA in verschiedenen humanen Tumorzelllinien und soliden humanen Tumoren, vornehmlich dem Neuroblastom, wurden mit Hilfe von Northern Blot-Analysen und RT-PCR bestimmt. Mit wenigen Ausnahmen wurden beide Enzyme parallel exprimiert. In den erwähnten Ausnahmen wurde in PSA-positiven Tumoren ausschließlich die mRNA der PST gefunden. Zukünftige Studien sollen zeigen, ob über die Inhibition der Expression der Polysialyltransferasen Veränderungen im Wachstum maligner Tumoren erreicht werden können.

### Englisch

Keywords: Polysialic acid (PSA), Polysialyltransferases (PSTs), Neuroblastoma

Polysialic acid on the neural cell adhesion molecule (NCAM) is developmentally regulated and has been implicated in the plasticity of cell-cell interactions. PSA is diminished during development but reexpressed in some tumours, where it appears to be linked to a high metastatic potential. The recently cloned polysialyltransferases PST and STX are able to catalyse the synthesis of polysialic acid and the two enzymes are independently regulated on the transcriptional level.

To elucidate the molecular mechanism by which the expression of PSTs is tissue-specifically and developmentally regulated the 5'-flanking regions of the human genes for PST and STX were isolated and characterised. The proximal promoter regions of the PSTs show a highly similar structural organisation and characteristics of CpG islands. Both genes lack apparent TATA or CAAT boxes but have putative binding sites for the transcription factor Sp1. Primer extension and 5'-RACE analysis revealed that transcription of the human PST gene starts from 323 nucleotides upstream of the translational initiation site. Deletion analyses demonstrated that a fragment of 439 bp containing binding motifs for transcription factors SP1, GATA-1, NF-Y and CREB is sufficient to direct expression of a reporter gene in PST expressing cell lines. The minimal promoter region of the STX gene comprises a fragment of 351 bp having binding sites for transcription factors SP1 and MZF1.

In a second focus this study compares the expression of PST and STX mRNA during postnatal rat brain development. Northern blot analysis and *in situ* hybridisation indicated substantial differences in the time-course and in the pattern of PST versus STX expression in the rostral migratory pathway and hippocampus. These two brain regions show persistent polysialic acid expression in the mature brain and are involved in functions concerning learning and memory.

Neuroblastoma and various other human tumours bear the oncodevelopmental antigen PSA. Recently, serum concentrations of polysialylated NCAM have been shown to be tumour associated in children with rhabdomyosarcoma and neuroblastoma, proving PSA-NCAM to be a tumour marker of diagnostic and prognostic relevance to these malignancies. In a third focus of this work a study was undertaken to evaluate the function of PSTs in PSA reexpressing tumours. The aim of this study was to investigate the pattern of polysialyltransferases expressed in solid neuroblastoma specimen and human tumour cell lines by RT-PCR and Northern Blot Analyses. With a few exceptions all analysed specimen showed simultaneous expression of the two enzymes. Some of the examined PSA-positive neuroblastoma revealed only the expression of the PST mRNA.

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Der homopolymere Zucker Polysialinsäure (PSA) stellt eine spezifische posttranslationale Glykanmodifikation des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) dar und ist ein universeller Regulator plastischer Zell-Zell-Interaktionen. Polysialyliertes NCAM moduliert entwicklungsabhängig und gewebsspezifisch die durch homophile NCAM-Interaktionen vermittelte Zelladhäsion im Verlauf ontogenetischer Differenzierungsvorgänge. Darüber hinaus ist die PSA ein Tumormarker. Ihr Erscheinen korreliert positiv mit dem erhöhten metastatischen Potential einiger maligner Tumore. Die Polysialyltransferasen PST und STX (PSTs) werden als die Schlüsselaktivitäten in der PSA-Synthese angesehen. Eine differentielle Regulation der beiden Enzyme auf Transkriptionsebene scheint für die dynamische NCAM-Polysialylierung verantwortlich zu sein.

Mit dem Ziel, strukturelle Elemente der Gene der PSTs zu ermitteln, die für die gewebsspezifische und entwicklungsabhängige Expression verantwortlich sind, wurden die 5'-flankierenden Bereiche der humanen Gene isoliert und charakterisiert. Die 5'-Bereiche von PST und STX zeigen einen homologen Aufbau und zahlreiche Merkmale von CpG-Inseln. Beide Gene besitzen weder TATA- noch CAAT-Box. Dagegen finden sich in beiden 5'-Bereichen GC-Boxen (eine im PST-Gen, zwei im STX-Gen), die in vergleichbarer Entfernung 5'-wärts eines singulären Transkriptionsstarts positioniert sind. Der Transkriptionsstartpunkt der humanen PST wurde durch zwei unabhängige Methoden, das 5'-Race und die Primer Extension, übereinstimmend auf ein Guanin in Position -323 festgelegt. Für die Analyse der Minimalpromotoren wurde ein Reportergenassay aufgebaut und als Minimalpromotor für eine zelltypspezifische Expression der PST ein Fragment von 439 bp mit Bindungsstellen für die Faktoren SP1, GATA-1, NF-Y und CREB identifiziert. Der Minimalpromotor der STX hat eine Länge von 351 bp und beinhaltet Bindungsstellen für die Faktoren SP1 und MZF1. Weiterhin gelang durch den Einsatz einer Analysesoftware die Identifikation zahlreicher potentieller Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren außerhalb der Minimalpromotoren.

Im zweiten Schwerpunkt der Arbeit wurden innerhalb einer Kooperation die Expressionsmuster von PST und STX im Verlauf der postnatalen Entwicklung des Rattenhirns untersucht. Durch Northern Blot-Analysen und *in situ*-Hybridisierungsexperimente konnten dabei deutliche Differenzen im zeitlichen Verlauf und der gewebsspezifischen Expression der PSTs im rostralen Migrationsweg und dem Hippocampus festgestellt werden. Beide Gehirnregionen sind im adulten Stadium PSA-immunreaktiv und übernehmen wichtige Funktionen bei Lern- und Gedächtnisleistungen.

Die PSA wurde in mehreren Studien der letzten Jahre als ein im Serum von Tumorpatienten auftretender diagnostischer und prognostischer Marker vorgestellt. Ausgehend von der Hypothese, daß die Reexpression der PSA das maligne Wachstum von Tumoren fördert, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Beteiligung der beiden PSTs bei der Reexpression der PSA im Tumor festzustellen. Die vorgestellten Ergebnisse zur Verteilung von PST- und STX-mRNA in verschiedenen humanen Tumorzelllinien und soliden humanen Tumoren, vornehmlich dem Neuroblastom, wurden mit Hilfe von Northern Blot-Analysen und RT-PCR bestimmt. Mit wenigen Ausnahmen wurden beide Enzyme parallel exprimiert. In den erwähnten Ausnahmen wurde in PSA-positiven Tumoren ausschließlich die mRNA der PST gefunden. Zukünftige Studien sollen zeigen, ob über die Inhibition der Expression der Polysialyltransferasen Veränderungen im Wachstum maligner Tumoren erreicht werden können.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Polysialinsäure (PSA)

Sialinsäuren sind weit verbreitete terminale Komponenten der Oligosaccharidanteile tierischer Glykoproteine und Glykolipide. In ihrer exponierten Position beeinflussen sie maßgeblich die strukturelle Beschaffenheit dieser Moleküle sowohl in Lösung als auch auf Zelloberflächen. Durch ihre physikochemischen Eigenschaften tragen Sialinsäuren nicht nur zur negativen Gesamtladung von Glykokonjugaten sondern auch der kompletten Zelloberfläche bei. Dieser interzelluläre antiadhäsive Effekt macht sialylierte Oberflächen-strukturen zu potenten Regulatoren in Zell-Zell-Kommunikationsprozessen und Zell-Matrix-Interaktionen [1].

Der Sammelbegriff Polysialinsäure (PSA) bezeichnet eine Gruppe von Polymeren des aus neun Kohlenstoffatomen bestehenden Zuckers Neuraminsäure (=Sialinsäure). Mindestens 40 natürlich vorkommenden Sialinsäurederivate sind bis jetzt identifiziert worden, aber nur einige wenige dieser Varianten werden als Bausteine polymerer Sialinsäureformen gefunden [2]. Diese strukturell außergewöhnliche Klasse von polymeren Kohlenhydraten kommt als kovalente Modifikation von Oberflächenmolekülen pro- und eukaryontischer Zellen vor und übernimmt ein breites Spektrum biologischer Funktionen.

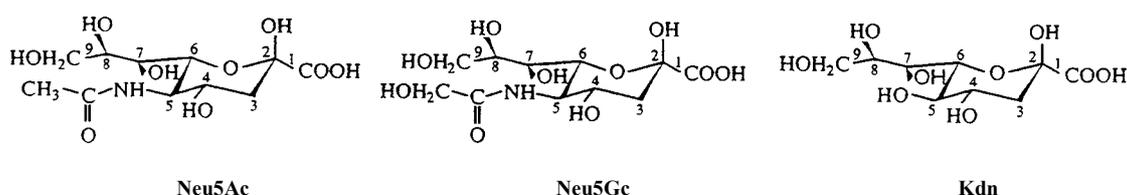


Abb. 1: Struktur der drei Hauptbausteine polymerer Sialinsäuren: 5-*N*-Acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac), 5-*N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) und 5-Deamino-3,5-Dideoxy-Neuraminsäure (Kdn).

Abb. 1 zeigt die drei Hauptbausteine polymerer Sialinsäuren, 5-*N*-Acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac), 5-*N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) und 5-Deamino-3,5-Dideoxy-Neuraminsäure (2-Keto-3-Deoxy-Nonulosonsäure, Kdn). Die Monomere sind durch  $\alpha$ 2,8- oder  $\alpha$ 2,9-glykosidische Bindungen zu unverzweigten Polymeren von bis zu 200 Resten verknüpft [3],[4] und können durch Substitution einer oder mehrerer Hydroxylgruppen durch Acetyl-, Methyl-, Lactyl-, Phosphat- oder Sulfatgruppen modifiziert sein [5],[6],[7].

Polysialinsäure ist eine Gemeinsamkeit phylogenetisch weit entfernter Spezies [4], obwohl in

den einzelnen Phyla der chemische Charakter der PSA-Akzeptormoleküle variiert.

Bei verschiedenen neuroinvasiven Bakterien, wie z.B.: *Escherichia coli* K1, *Neisseria meningitidis* Serogruppe B und *Pasteurella haemolytica* Serogruppe A2, bildet ein Homopolymer aus  $\alpha$ 2,8-verknüpften Neu5Ac-Resten das Kapselpolysaccharid (Glykocalyx) [8],[9],[10],[11]. Träger der PSA in den Bakterienzellen ist ein Phospholipid [4],[12]. Für *E. coli* K1 wird eine Kettenlänge zwischen 160 und 230 Resten angegeben [13],[14]. Die Kapselpolysaccharide von *E. coli* K92 und *N. meningitidis* Serogruppe C sind ebenfalls aus Neu5Ac-Monomeren aufgebaut, allerdings handelt es sich hier um Polymere aus alternierend  $\alpha$ 2,8- und  $\alpha$ 2,9- bzw.  $\alpha$ 2,9-glykosidisch verknüpften Resten [15],[16].

In Eukaryonten wurde PSA erstmals in unbefruchteten Eiern der Regenbogenforelle (*Salmonidae*) nachgewiesen [17]. In einer die Fischeier umschließenden kohlenhydratreichen Schicht, der Vitellinmembran, ist die PSA über eine Kohlenhydratstruktur *O*-glykosidisch an kurze Peptide, die sogenannten Polysialoglykoproteine (PSGP) gebunden [18],[19],[20]. Die Vitellinschicht enthält, ebenso wie die Ovarialflüssigkeit der *Salmonidae*, Glykoproteine, die oligomere Formen  $\alpha$ 2,8-verknüpfter Kdn tragen [21],[22],[23],[24]. In den kortikalen Vesikel der Fischeier stellen die PSGPs den Hauptanteil der Glykoproteine dar, außer  $\alpha$ 2,8-verknüpften Homopolymeren aus Neu5Ac und Neu5Gc treten auch Hybridstrukturen dieser beiden Verbindungen auf [6], [25]. Im Vergleich zu den bakteriellen Kapselpolysacchariden erreichen die Kettenlängen der PSGPs mit 6 bis 24 Resten jedoch eher einen geringen Polymerisationsgrad [26],[18].

Für die genannten Polysialinsäureformen in den PSGPs der Fischeier werden Funktionen in der Oogenese, der speziesspezifischen Zellerkennung während der Fertilisation und der frühen Embryogenese angenommen [27],[28].

Im neuronalen Gewebe von Säugetieren ist die einzig bestätigte Akzeptorstruktur der Polysialinsäureketten das Neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM) [29],[3],[30].

## 2.2 Das Neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM)

NCAM ist Mitglied einer Familie von Adhäsionsmolekülen die aus einer variablen Anzahl von Immunglobulin C2-Typ-Loops und Fibronectin Typ III-Domänen zusammengesetzt sind (Ig-Superfamilie) [31],[32] und in einer  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Weise Zell-Zell-Kontakte fördern [33]. NCAM ist eines der häufigsten Zelloberflächenmoleküle der Vertebraten und wird in einer großen Zahl von unterschiedlichen Isoformen exprimiert. Diese entstehen durch alternatives Spleißen [31],[34],[35],[36],[37] eines aus mindestens 25 Exons bestehenden

## Einleitung

„single copy“ Gens. Auf Proteinebene lassen sich gelelektrophoretisch gemäß ihrer apparenten Molekulargewichte die drei Hauptisoformen NCAM-180 kDa, NCAM-140 kDa und NCAM-120 kDa unterscheiden [38],[39].

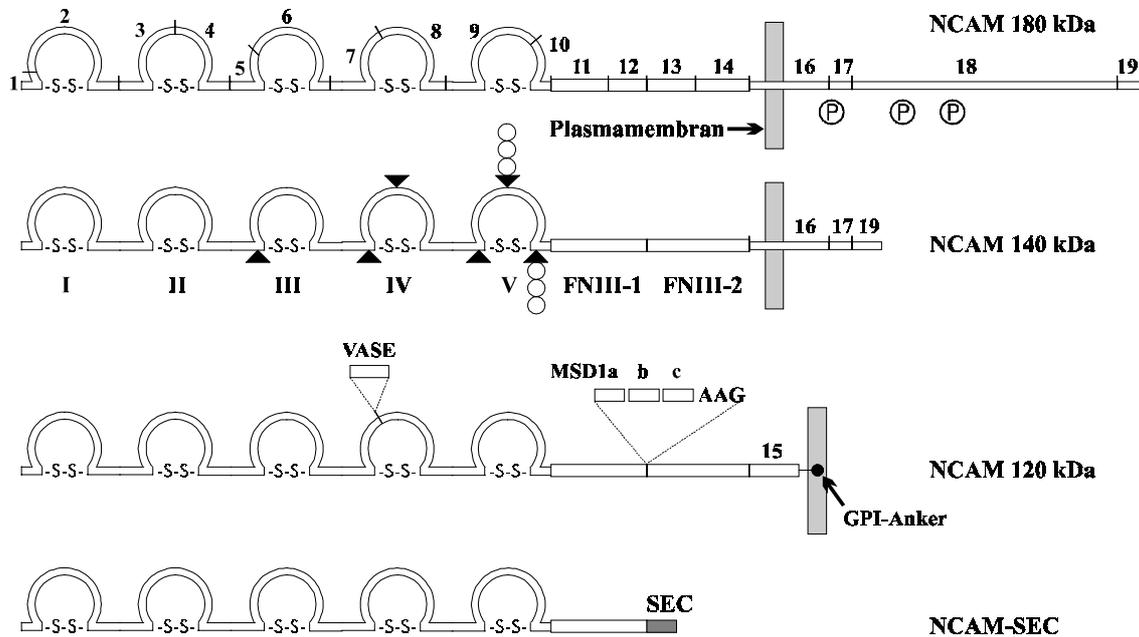


Abb. 2: Schematischer Aufbau verschiedener NCAM-Isoformen. Die Zahlen 1-19 geben an, welche Bereiche des NCAM-Moleküls von welchen Exons kodiert werden. Die fünf immunglobulinähnlichen Domänen des NCAM sind mit römischen Ziffern (I - V), die Fibronectin Typ III-Domänen mit **FNIII-1** und **FNIII-2** bezeichnet. ○○○: Polysialinsäure. ⊕: Phosphorylierungsstelle. -s-s-: Disulfidbrücke. ▼: N-Glykosylierungsstelle.

Die 140 kDa und die 180 kDa Isoformen sind Transmembranproteine und variieren in der Ausprägung ihrer intrazellulären Domänen, die 120 kDa Form ist über einen GPI-Anker an die Membran gebunden [40],[41]. Alle drei Isoformen besitzen, ausgehend vom membrandistalen Ende, fünf immunglobulinähnliche Domänen (Ig1-Ig5), gefolgt von zwei Fibronectin Typ III-Repeats. Hinter den genannten gelelektrophoretisch differenzierbaren NCAM-Formen verbirgt sich eine große Vielfalt verschiedener Moleküle, die durch differentielle Expression alternativer Exons generiert werden können (s. Abb. 2). Zwischen den Exons 12 und 13 können vier Exons (MSD1a,b und c, SEC) und ein zusätzliches Codon (AAG) eingeführt werden [37],[42]. Zwischen den Exons 7 und 8 kann das sogenannte VASE („variable alternatively spliced exon“) eingespleißt werden [43],[44]. Alle alternativen Exons können unabhängig voneinander eingefügt werden, so daß sich aus der genomischen Organisation des NCAM-Gens das theoretische Potential für die Expression von über 100 unterschiedlichen NCAM-Spleißvarianten ergibt, von denen ein großer Teil auch bereits

nachgewiesen werden konnte [45],[46],[47].

Die Expression der NCAM-Isoformen ist streng zeit- und gewebsspezifisch reguliert. So stellt die 180 kDa Isoform die dominante Variante auf postmitotischen Neuronen dar [48], während es auf Muskelzellen nur in sehr geringer Rate exprimiert wird [49],[50]. Dagegen wurden die alternativen Exons MSD1b und MSD1c bisher nur in Muskelzellen nachgewiesen [51],[52],[53]. Die Expression des SEC-Exons führt zur Synthese einer sezernierten NCAM-Variante, die sowohl im humanen Gehirn als auch im humanen Muskel gefunden wurde [54].

Die durch differentielle Spleißereignisse hervorgerufene enorme Variabilität des NCAM wird durch verschiedene posttranslationelle Modifikationen weiter erhöht. Neben der Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten in den cytoplasmatischen Domänen der 180 kDa und 140 kDa Isoformen [55],[39],[56] treten verschiedene Glykosylierungen auf. Während *N*-glykosidisch gebundene Kohlenhydrate auf allen Isoformen beobachtet wurden, sind *O*-glykosidisch gebundene Glykanstrukturen auf Isoformen beschränkt, die die MSD1-Domäne („muscle specific domain“) enthalten [57]. Im extrazellulären Anteil des NCAM-Moleküls liegen sechs potentielle *N*-Glykosylierungsstellen, die zwischen verschiedenen Spezies konserviert sind [40],[58],[37]. Von diesen Glykosylierungsstellen sind vermutlich vier bis fünf durch Coreglykane vom komplexen Typ besetzt, deren exakte Zusammensetzung zelltyp- und entwicklungsabhängig modifiziert sein kann [59]. Von besonderer Bedeutung sind dabei die Expression der Polysialinsäure und des L2/HNK-1-Epitops. Das L2/HNK-1-Epitop ist definiert durch die Bindung der monoklonalen Antikörper HNK-1 und L2, [60] die eine sulfatierte Kohlenhydratstruktur erkennen [61],[62]. Das L2/HNK-1-Epitop ist nicht auf das NCAM beschränkt, sondern wird von mehreren Adhäsionsmolekülen (u.a. MAG, P<sub>0</sub> und L1) und verschiedenen Glykolipiden exprimiert [63]. Durch Inhibitionsstudien mit den genannten Antikörpern konnte gezeigt werden, daß dieses Epitop an der Zelladhäsion und dem Neuritenauswachsen beteiligt ist [64],[65],[66]. Die Expression des L2/HNK-1-Epitops erfolgt im NCAM an einer der beiden *N*-Glykosylierungsstellen in Ig4 und wird weder in Muskelzellen noch auf der 120 kDa Isoform gefunden [67].

Bereits in den achtziger Jahren konnte in verschiedenen *in vitro*-Systemen gezeigt werden, daß die NCAM vermittelte Adhäsion auf eine homophile NCAM-NCAM-Interaktion zurückgeht: NCAM-tragende Liposomen binden aneinander, wobei die Verdopplung der NCAM-Beladung eine Verdreißigfachung der Aggregationsrate zur Folge hat [68]. Die Transfektion von Zellen mit NCAM-cDNA bewirkt eine deutliche Zunahme der Zellaggregation [69],[70]. Solubilisierete NCAM-Moleküle binden spezifisch aneinander [71].

Die funktionelle Bedeutung des NCAM ist jedoch nicht nur in der Vermittlung von Zelladhäsion durch homophile NCAM-NCAM-Wechselwirkungen zu sehen, NCAM muß aufgrund seiner großen strukturellen Variabilität vielmehr als ein multifunktionelles Molekül aufgefaßt werden. Jeder der fünf Ig-Domänen werden spezifische Funktionen zugeschrieben [72]. Ig1 ist an Zelladhäsionsphänomenen und dem Auswachsen von Neuriten beteiligt [73]. Ig2 steuert die Anheftung von Zellen an Heparin und Heparansulfat [74],[75] als Komponenten der extrazellulären Matrix. Ig3 vermittelt Zell-Zell-Kontakte über eine homophile NCAM-NCAM-Wechselwirkung [76],[77],[78]. Ig4 enthält das VASE, das bei Vorhandensein das Neuritenauswachsen inhibiert [79],[80],[81],[82],[83] und kann in einer heterophilen Bindung mit dem Zelladhäsionsmolekül L1 wechselwirken [84]. Resultat dieser NCAM-L1-Interaktion ist eine deutliche Verstärkung der L1-vermittelten Zelladhäsion durch einen als „assisted homophilic binding“ bezeichneten Vorgang [85],[86].

Ig5 repräsentiert die Bindungsstelle der Polysialinsäure, der interessantesten posttranslationalen Glykosylierungsmodifikation des NCAM. Die PSA des NCAM ist ausschließlich aus  $\alpha$ 2,8-verknüpfte 5-*N*-Acetyl-Neuraminsäure mit einer Kettenlänge von über 55 Neu5Ac-Monomeren aufgebaut [87]. Die fünfte immunglobulinähnliche Domäne enthält an den Positionen 404, 430 und 459 drei Asparaginreste als potentielle *N*-Glykosylierungsstellen. Es konnte gezeigt werden, daß die Polysialylierung mit den beiden membranproximalen Resten Asn430 und Asn459 assoziiert ist und die PSA hier an tri- und/oder tetraantennären Coreglykanen (s. Abb. 3) vom komplexen Typ hängt [88],[89],[90],[31],[91]. Die genaue Anzahl der PSA-tragenden Antennen innerhalb eines Oligosaccharides konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht detailliert aufgeklärt werden. Für die Addition von PSA an das Coreglykan sind aber nicht nur die Beschaffenheit der Kohlenhydratseitenkette, sondern auch die an Ig5 angrenzenden Proteindomänen Ig4 und FNIII-1 ausschlaggebend [91]. So wird ein chimäres Molekül, in welchem Ig4 und Ig5 des NCAM in das Ig-Superfamilienmitglied F3 inseriert sind, nach Transfektion in eine PSA-NCAM tragende Zelllinie nicht polysialyliert [92].

Im Verlauf der Embryogenese wird NCAM bereits früh von Zellen aller drei Keimblätter exprimiert [93] und zeigt dabei ein räumlich und zeitlich reguliertes Expressionsmuster. Deutliche Veränderungen der NCAM-Expression treten besonders bei verschiedenen ontogenetischen Induktionsvorgängen während der Morphogenese [94], wie der Epithelial-Mesenchym-Umwandlung [95],[96],[97],[98],[99] und der Wanderung der Neuralleistenzellen auf [100],[101]. NCAM beeinflusst Prozesse wie neuronales Wachstum und Differen-

zierung, indem es die Ausbildung stabiler synaptischer Kontakte fördert [48] und Einfluß auf das Neuritenauswachsen [102],[103],[104], die Neuritenbündelung [105],[106] und Neuron-Glia-Interaktionen [64] nimmt. NCAM-Wechselwirkungen spielen eine wichtige Rolle bei der Myogenese [107],[108], der intramuskulären Wanderung und Verzweigung von Neuronen und neuromuskulären Interaktionen an der motorischen Endplatte [109]. Darüber hinaus sind für das NCAM auch signaltransduzierende Qualitäten beschrieben worden [110],[111].

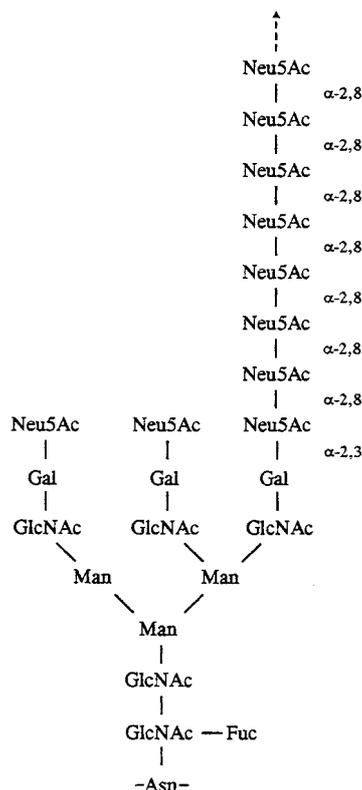


Abb. 3: Struktur der PSA-tragenden Kohlenhydratseitenketten des NCAM [112]

## 2.3 Die Regulation von Zellinteraktionen durch polysialyliertes NCAM

Das Neurale Zelladhäsionsmolekül zeichnet sich gegenüber anderen Adhäsionsmolekülen durch eine funktionelle Ambivalenz aus [113]. Eine für Vertebraten ungewöhnliche polymere Zuckerstruktur, die Poly- $\alpha$ 2,8-*N*-Acetyl-Neuraminsäure (Polysialinsäure, PSA) stellt eine hochspezifische posttranslationelle Modifikation des NCAM dar [114]. Die nicht konstitutiv vorhandene, sondern entwicklungsabhängig und gewebsspezifisch regulierte Expression von Polysialinsäureketten am NCAM moduliert die durch homophile NCAM-Interaktionen

## Einleitung

---

vermittelte Zelladhäsion [115],[71],[116] und korreliert positiv mit Stadien erhöhter zellulärer Motilität [68],[117]. Die PSA kann also als ein negativer Regulator der NCAM-vermittelten Zelladhäsivität angesehen werden [118]. Die Gegenwart der PSA am NCAM interferiert aber nicht nur mit der Fähigkeit des NCAM zur Ausbildung stabiler Zell-Zell-Kontakte, sondern beeinflusst ein breites Spektrum von Zelloberflächenmolekülen [119],[120] und bewirkt so eine generelle Erhöhung der zellulären Beweglichkeit, wie sie für den präzisen Verlauf ontogenetischer Differenzierungsvorgänge von zentraler Bedeutung ist [121]. Der Mechanismus der NCAM- und polysialinsäureabhängigen Steuerung zellulärer Interaktionen wird mit den physikochemischen Eigenschaften der PSA erklärt. Der polyanionische Charakter des PSA-Makromoleküls und die dadurch verursachte ausgeprägte Hydratisierung können Zellinteraktionen durch elektrostatische und sterische Effekte beeinträchtigen. Lichtstreuungsexperimente ergaben für polysialyliertes NCAM einen um das 3-fache erhöhten Raumanpruch im Vergleich zu einem nicht modifizierten NCAM-Protein (s. Abb. 4). Als Folge dieses erhöhten Ausschlußvolumens kommt es durch die Aufweitung des interzellulären Spaltes zu einer generellen Destabilisierung zellulärer Kontakte [122].

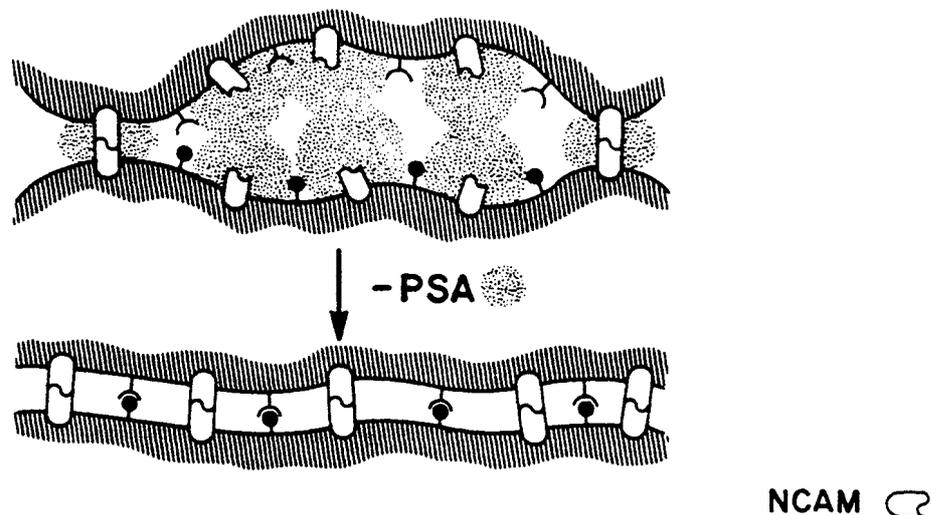


Abb. 4: Die Regulation von Zell-Zell-Kontakten durch Polysialinsäure

### **2.3.1 PSA als entwicklungsabhängig regulierte posttranslationelle Modifikation des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls**

Polysialyliertes NCAM ist ein universeller Regulator plastischer Zell-Zell-Interaktionen. Gemäß der Fähigkeit der PSA zur Steigerung der zellulären Motilität ist die Expression von polysialyliertem NCAM in stark proliferierendem embryonalen Gewebe sehr hoch. Im Verlauf der Embryogenese werden neuronales Wachstum und Differenzierung, Organo- und Histogenese, die Ausbildung der motorischen Endplatte sowie intramuskuläre Wanderung und Verzweigung von Neuronen während der Myogenese durch PSA beeinflusst. In frühen Stadien der Ontogenese wird zwar ausschließlich nicht polysialyliertes NCAM exprimiert [33], im späteren Verlauf der Morphogenese, wenn die Entwicklung durch Prozesse wie Zellmigration und Neuritenauswachsen geprägt ist, wird NCAM jedoch von Zellen aller drei Keimblätter in zunehmendem Maße polysialyliert [123],[124],[125],[126]. In frühen postnatalen Perioden bleibt die Expression von NCAM auf hohem Niveau bestehen, die PSA-Expression hingegen wird stark reduziert. Der Verlust von PSA korreliert mit dem Abschluß wichtiger morphogenetischer Prozesse [127], z.B. nimmt der PSA-Gehalt im Zuge der Histogenese im Nervensystem nach der Ausbildung stabiler synaptischer Kontakte deutlich ab [128] und kann in den meisten ausdifferenzierten Geweben nicht mehr nachgewiesen werden [129],[130],[131].

Am besten ist die Rolle der PSA in Prozessen wie dem Neuritenauswachsen [132], der axonalen Wegfindung, Verzweigung [133],[134] und Bündelung [114],[135],[136], sowie der Separation und Migration von Zellen (s.2.3.2),[137],[138] untersucht. Allgemein scheint PSA die Balance von molekularen Interaktionspartnern, die an der Faszikulation von Axonen beteiligt sind, zu beeinflussen. Abhängig vom untersuchten System sind sowohl destabilisierende als auch unterstützende Effekte der PSA auf die Axonbündelung gezeigt worden.

Die PSA-Expression fördert die Defaszikulation von motorischen und sensorischen Axonen in einer PSA-negativen Umgebung [139],[140]. In dieser als Plexus bezeichneten Region ist die Auflockerung der gebündelten Axone Voraussetzung dafür, daß einzelne Fasern ihre unterschiedlichen Zielmuskeln finden und innervieren können. Die Anzahl an intramuskulären Verzweigungen mit denen ein Axon mit dem Muskel in Kontakt tritt wird durch seinen PSA-Gehalt mitbestimmt [141]. Der Verzweigungsgrad der Axone nimmt mit steigendem PSA-Gehalt zu und ein Verlust der PSA durch EndoN<sub>E</sub>-Behandlung (s. 2.5) führt

nicht nur zu einer verstärkten Faszikulierung, sondern auch zur Fehlsortierung der einwandernden Axone [142].

Andererseits zeigen PSA-tragende optische Axone im visuellen System, in welchem auch die Umgebung ihres Wanderweges PSA-positiv ist, eine verstärkte Faszikulation [143]. Offensichtlich sind die Auswirkungen der PSA auf das Neuritenauswachsen nicht nur von der PSA-Expression auf den Axonen, sondern auch von dem Vorhandensein der PSA auf den Umgebungszellen abhängig.

Ein sehr gut dokumentiertes Beispiel für die Auswirkung der PSA auf die Zellmigration ist die gerichtete Wanderung von PSA-positiven olfaktorischen Neuronenvorläufern aus der subventrikulären Zone in den *Bulbus olfactorius* (s. 2.3.2). Es konnte demonstriert werden, daß die Neuroblasten ihre Wanderung nicht separat, sondern in Zellketten absolvieren [144],[145] und das die PSA in dieser Situation Interaktionen zwischen den migrierenden Zellen erlaubt [146]. Ähnliche Effekte sind auch bei der Migration anderer Neuronen und Neuronenvorläufer gefunden worden [147],[148],[149].

### 2.3.2 Persistierende PSA-Expression im adulten ZNS

Im adulten Organismus bleibt die Expression von polysialyliertem NCAM in einigen Strukturen des zentralen Nervensystems erhalten. Diese neuronalen Areale mit sogenannter permanenter Plastizität, in denen auch im adulten Stadium Neurogenese stattfindet, zeichnen sich durch die anhaltende Fähigkeit zum strukturellen Rearrangement und zur synaptischen Remodulierung aus [150],[114]. Eine PSA-abhängige permanente Plastizität im adulten Gehirn wird für den *Bulbus olfactorius* [151],[152], den *Gyrus dentatus* des Hippocampus [153] und das Hypothalamus-Neurohypophysen-System [154],[155],[156] beschrieben. Im Gegensatz zu den meisten anderen adulten Hirnregionen werden im *Gyrus dentatus* und in der subventrikulären Zone (SVZ) des anterioren Anteils des lateralen Ventrikels kontinuierlich neuronale Vorläuferzellen generiert. Im *Gyrus dentatus* entstehen neue Neuronen tief in der Körnerzellschicht, die mit  $\alpha$ -PSA-Antikörpern (s. 2.5) gefärbt werden kann. Auch bei Migrationsprozessen im adulten Gehirn konnte eine Beteiligung von polysialyliertem NCAM beobachtet werden [144]: Neuroblasten, die in der SVZ generiert werden, wandern entlang eines wohl definierten, PSA-reichen Pfades in den *Bulbus olfactorius* ein, wo sie zu Interneuronen differenzieren [145]. Auch im *Nucleus suprachiasmaticus* des Hypothalamus konnte die Expression von PSA detektiert werden [157]. Dieser Bereich spielt eine große Rolle bei der Synchronisation des zirkadianen Rhythmus. Als Taktgeber steuert der *N.*

*suprachiasmaticus* die biologische Uhr der Vertebraten, wobei abhängig von der Lichtmenge die Melatoninabgabe der Epiphyse reguliert wird. NCAM-defiziente Mäuse zeigen deutliche Störungen in ihrem Tag/Nacht-Rhythmus. Ein sehr ähnlicher Phänotyp konnte durch selektive Entfernung der PSA des *N. suprachiasmaticus* mittels Mikroinjektion des Enzyms Endoneuraminidase<sub>NE</sub> (Endo<sub>NE</sub>, s. 2.5) bei adulten Wildtyptieren imitiert werden [158].

Einige der hier genannten PSA-positiven adulten Hirnareale, insbesondere der Hippocampus, sind mit Lern- und Gedächtnisfunktionen assoziiert und in den letzten Jahren zeichnet sich auch bei diesen Prozessen eine Beteiligung von polysialyliertem NCAM ab.

### 2.3.3 Die Rolle der PSA bei Lern- und Gedächtnisfunktionen

Trotz der bis heute limitierten Kenntnis von den mit Lernen und Gedächtnis verbundenen Vorgängen im Gehirn ist deutlich, daß die Langzeitspeicherung von Informationen mit der Neu- und Umbildung synaptischer Kontakte und der Aktivierung von Zellen durch externe Stimuli einhergeht und somit viele Gemeinsamkeiten zu neuronaler Entwicklung und Differenzierung zeigt [159]. Die Expression von polysialyliertem NCAM ist an der aktivitätsinduzierten synaptischen Plastizität eindeutig beteiligt [160],[161],[162],[156]: Die Expressionsrate von polysialyliertem NCAM auf kortikalen Neuronen wird *in vitro* durch die Depolarisierung der Membran, also elektrische Aktivität, beeinflußt, wobei extrazelluläres Ca<sup>2+</sup> vorhanden sein muß [163]. Auf Gliazellen konnte eine Abhängigkeit der PSA-NCAM-Expression von verschiedenen anderen Aktivitäten, wie dem Kontakt zu sekretorischen Axonen [164], Hormonen [165] und Neurotransmittern [166] demonstriert werden. Weitere *in vitro*-Untersuchungen an Hippocampusgewebekulturen aus der CA1-Region belegen eine vollständige (aber reversible) Blockade der Langzeitpotenzierung (LTP), wenn vorhandene PSA durch die Behandlung mit Endo<sub>NE</sub> (s. 2.5) spezifisch von den Zellen entfernt wird [167],[168]. Diese Resultate stehen in Übereinstimmung mit Experimenten, in denen eine Inhibition der LTP in der CA1-Region durch die Applikation von Antikörpern gegen NCAM und L1 gezeigt werden konnte [169],[170].

Die Langzeitpotenzierung ist Ausdruck der synaptischen Plastizität und zeigt, wie sich Synapsen dynamisch an veränderte Bedingungen durch Modifikation ihrer Effektivität anpassen können [171]. Die LTP wird als ein potentieller zellulärer Mechanismus für die Speicherung von Informationen betrachtet und dient daher als Modell für die Analyse von Gedächtnis- und Lernvorgängen [172]. Die LTP zieht deutliche strukturelle Veränderungen im Aufbau der Synapse nach sich [173]. Erklärungsmodelle für die Rolle von polysialyliertem

NCAM in der LTP stützen sich entweder auf die These, daß diese synaptische Strukturveränderung durch einen mit der PSA-NCAM-Expression verbundenen antiadhäsiven Effekt erleichtert ist, oder daß intrazelluläre Signaltransduktions- bzw. „second messenger“-Systeme durch die PSA-NCAM-Expression beeinflusst werden [104].

In einer Reihe weiterer Arbeiten konnte eine die Beteiligung von polysialyliertem NCAM bei Lernvorgängen nachgewiesen werden [174],[175],[176],[177],[178],[179],[180],[181]. Die Bemühungen zur Klärung der detaillierten Funktion von PSA-NCAM in diesem Bereich mündeten schließlich in der Analyse von NCAM-knockout-Mäusen.

Unter Berücksichtigung der ausgedehnten Expression von PSA und NCAM während der Embryonal- und Gehirnentwicklung zeigt dieser Funktionsausfall einen überraschend milden Phänotyp in den Tieren. In Wachstum und Entwicklung zeigen die Null-Mutanten nach vollständiger [182] bzw. partieller [183] Inaktivierung des NCAM-Gens bis in adulte Stadien kaum Unterschiede zur Kontrollpopulation. Allerdings zeigt NCAM-freies Hippocampusgewebe eine deutlich reduzierte Fähigkeit zur Induktion der LTP [167] und die entsprechenden Tiere haben Defizite hinsichtlich ihrer Lern- und Gedächtnisleistungen [182], während in Wildtypmäusen die Zahl von PSA-positiven Neuronen in einigen Bereichen des Hippocampus durch Schulung des räumlichen Vorstellungsvermögens erhöht werden kann [184]. Präzisere histologische Analysen der NCAM-defizienten Tiere demonstrierten schließlich eine deutliche Größenreduktion des *Bulbus olfactorius* mit einer verringerten Anzahl von Körnerzellen [182],[185]. Der beobachtete Effekt ist auf eine Migrationsstörung der Vorläuferzellen zurückzuführen (s. 2.3.1 u. 2.3.2), [146]. Weiterhin wurden PSA-NCAM-Effekte im Moosfasersystem des Hippocampus beschrieben. Körnerzellen des sich entwickelnden und des adulten *Gyrus dentatus* senden ihre PSA-NCAM-positiven Axone (Moosfasern) entlang eines definierten Migrationstraktes zu den Dendriten der Pyramidenzellen in der CA3-Region. Die Abwesenheit von PSA-NCAM innerhalb dieser wichtigen intrahippocampalen Verbindung ruft Beeinträchtigungen bei der Axonfaszikulation und Wegfindung der Moosfasern in den NCAM-defizienten Tieren hervor [186]. Da die Inaktivierung des NCAM-Gens mit einem nahezu vollständigen Verlust der PSA-Expression verbunden sein sollte, wurde versucht, NCAM- und PSA-abhängige Effekte zu dissoziieren. Zu diesem Zweck wurden Wildtypmäuse *in vivo* mit der Endoneuraminidase N<sub>E</sub> (s. 2.5) behandelt, die spezifisch PSA degradiert. Dabei zeigte sich in allen bisher durchgeführten Experimenten, daß der NCAM-knockout-Phänotyp sowohl im *Bulbus olfactorius* [187], als auch in der CA3-Region des Hippocampus [188] durch die Entfernung der PSA kopiert

werden kann. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß in den Null-Mutanten weniger der Verlust des NCAM in seiner Funktion als Adhäsionsmolekül entscheidend ist, sondern vielmehr der Verlust des PSA-Trägermoleküls die Hauptrolle spielt.

### **2.3.4 Polysialyliertes NCAM als tumorassoziertes Antigen**

Die durch PSA vermittelte funktionelle Ambivalenz des NCAM spiegelt sich auch in der NCAM-Expression auf Tumoren wieder. Einerseits zeigen Tumoren, die PSA-freies NCAM exprimieren in Einklang mit der homophilen NCAM-Interaktion eine deutlich geringere Tendenz zur Ausbildung von Metastasen als NCAM-negative Zellen [189],[190]. Ferner konnte beobachtet werden, daß durch die onkogene Transformation von Zellen die NCAM-Expression drastisch reduziert werden kann [191],[192]. Andererseits ist die Tatsache von besonderem klinischen Interesse, daß polysialylierte NCAM-Formen in verschiedenen Tumoren wie dem Wilms-Tumor [193],[194],[195], dem Neuroblastom des Kleinkindalters [196],[197],[198],[199], dem Medulloblastom [200],[201],[202] und Rhabdomyosarkom [203], dem kleinzelligen Bronchialkarzinom (SCLC) [204],[205],[206],[207],[208],[209] und malignen Lymphomen [210],[211],[212] (re-)exprimiert werden. Für einige dieser hochmalignen Tumoren neuroendokrinen und lymphoiden Ursprungs zeigt sich eine enge positive Korrelation zwischen PSA-Gehalt und Malignität [210],[213]. Gemäß der antiadhäsiven Qualitäten der PSA und ihrer Fähigkeit bestehende Zellverbände aufzulockern wird angenommen, daß die Ablösung transformierter Zellen vom Primärtumor durch die Reexpression der PSA erleichtert ist und einen der ersten Schritte in der Metastasenbildung darstellt [214],[215]. Als weitere Ursache für das erhöhte metastatische Potential dieser Tumoren kommt die Maskierung spezifischer onkogener Zelloberflächenantigene durch die PSA in Betracht. Als autologe Struktur mit vernachlässigbarer Antigenität könnte die reexprimierte PSA transformierte Zellen dem Zugriff immunkompetenter Effektorzellen entziehen.

Die Detektion von PSA als Tumormarker wird zur Unterscheidung zwischen dem hochmalignen kleinzelligen Bronchialkarzinom (SCLC) und bronchialen Karzinoidtumoren, die ein deutlich vermindertes metastatisches Potential besitzen und auf denen bislang keine PSA-Reexpression nachgewiesen werden konnte [216], diagnostisch eingesetzt [206]. Bei einer Vielzahl der genannten Tumoren tritt darüber hinaus lösliches polysialyliertes NCAM im Serum auf [217],[204],[215],[218]. Obwohl der exakte Mechanismus der Freisetzung aus den Tumorzellen in die Zirkulation zum jetzigen Zeitpunkt noch unverstanden ist, wird ein

hoher PSA-Serumspiegel als ungünstiger diagnostischer und prognostischer Marker angesehen [219],[196],[203],[220]. Bei einem erfolgreichen Therapieverlauf kommt es zu einer drastischen Absenkung der PSA-Serumkonzentration in den Tumorpatienten, so daß die Überwachung des PSA-Serumlevels sich zukünftig zu einem verlässlichen prognostischen Parameter bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen entwickeln könnte.

## 2.4 Die Biosynthese der Polysialinsäure

Die Synthese *N*-glykosidischer Kohlenhydrate vollzieht sich entlang des Synthesewegs sekretorischer Proteine. Trotz ihres linearen homopolymeren Aufbaus und ihrer hochspezifischen Fixierung an das NCAM wird die PSA konventionell im Verlauf posttranslationaler Glykosylierungsprozesse im Golgi-Apparat an typischen *N*-glykosidisch gebundenen Coreglykanen vom komplexen Typ synthetisiert. Dieses Synthesemodell wird durch die Tatsache untermauert, daß eine Blockade des Membrantransportes zur Akkumulation der PSA im Golgi-Apparat führt [221]. Ein Enzym, das für die Polysialylierung des NCAM verantwortlich ist, wurde erstmals im Jahr 1985 beschrieben. In Golgiangereicherten Membranfraktionen aus fetalem Rattenhirn wurde eine Aktivität gefunden, die den Transfer von Neu5Ac-Monomeren aus der aktivierten Vorstufe CMP-Neu5Ac auf endogene Akzeptoren katalysiert [222]. Diese enzymatische Aktivität wurde Polysialyltransferase genannt und war in 20 Tage altem fetalem, jedoch nicht in adultem Gehirn nachweisbar, was auf eine entwicklungsabhängig regulierte Expression schließen ließ. Offen blieb die Anzahl der an der gefundenen Aktivität beteiligten Enzyme und die Art des Reaktionsmechanismus. In „pulse chase“-Experimenten wurde die Synthese von polysialyliertem NCAM innerhalb von zehn Minuten beobachtet [223]. Hierbei konnten auch durch die Reduktion der Synthesegeschwindigkeit nach Temperaturerniedrigung keine Intermediate mit kurzen PSA-Ketten nachgewiesen werden, weshalb ein „*en bloc*“-Transfer präformierter PSA-Moleküle als Mechanismus vorgeschlagen wurde. Dieser Transfer findet frühestens in einem Kompartiment des medialen Golgi-Apparates statt, da das Trimming von Mannoseresten durch die  $\alpha$ -Mannosidase I im cis-Golgi vor der Polysialylierung abgeschlossen ist.

### 2.4.1 Die $\alpha$ 2,8-Polysialyltransferasen PST und STX

Der entscheidende Durchbruch für die Aufklärung der Biosynthese polysialylierter NCAM-Formen war die Klonierung der cDNAs der beiden verschiedenen  $\alpha$ 2,8-Polysialyltransferasen PST (Polysialyltransferase-1, ST8SiaIV [224]) und STX (Sialyltransferase X, ST8SiaII [224]) aus einer Reihe von Spezies. Zahlreiche Transfektionsstudien in verschiedene Zelllinien ergaben, daß jedes der beiden Enzyme für sich prinzipiell zur Polysialylierung von NCAM, also zur Überführung von Zellen des Phänotyps NCAM<sup>+</sup>/PSA<sup>-</sup> zum Phänotyp NCAM<sup>+</sup>/PSA<sup>+</sup>, befähigt ist [225],[226],[227],[228],[229],[230],[231],[232]. Alle *Mammalier*-Enzyme weisen sehr hohe Homologien sowohl auf Nukleotid- (99.2 % Identität zwischen Hamster- und Maus-PST) als auch auf Aminosäureebene (56 % Identität zwischen Maus-PST und Maus-STX) auf. Es handelt sich um Typ-II-Transmembranproteine mit einem potentiellen Gogi-Retentionssignal. Der strukturelle Aufbau der 41.2 kDa-Proteine folgt dem klassischen Grundschema aller Glykosyltransferasen [233] (s. Abb. 5) und die Aminosäuresequenz weist drei charakteristische Sequenzmotive auf [234],[225],[235],[236],[237], die Sialylmotive L, S und VS, die bei allen bisher klonierten eukaryonten Sialyltransferasen Teil des aktiven Zentrums sind.

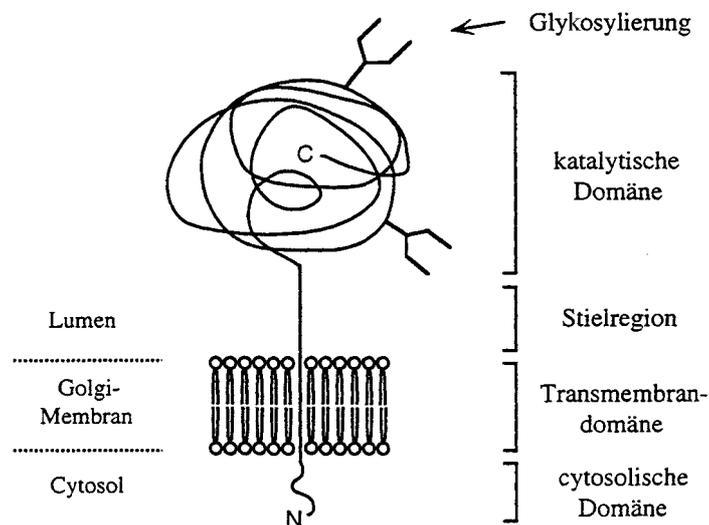


Abb. 5: Schematischer Aufbau einer eukaryonten Glykosyltransferase (nach [238]).

*In vitro*-Rekonstitutionsexperimente mit den rekombinanten Enzymen zur Aufklärung der Substratspezifität der Polysialyltransferasen (PSTs) ergaben, daß jedes dieser Enzyme für sich als singuläre Aktivität befähigt ist, PSA spezifisch auf komplexe Coreglykane des NCAM zu transferieren [239],[240]. Als Erkennungsstruktur muß eine monosialylierte Kohlenhydratstruktur am NCAM vorliegen (s. Abb. 3). NCAM mit Agalakto-Glykanen kann *in vitro* nach

sukzessiver Regalaktosylierung und Resialylierung mit den entsprechenden rekombinanten monospezifischen Glykosyltransferasen durch PST oder STX polysialyliert werden. Dabei wird NCAM mit endständig  $\alpha$ 2,3- oder  $\alpha$ 2,6-sialylierten Glykanen akzeptiert und umgesetzt [240]. Über den genauen katalytischen Mechanismus der Polysialyltransferasen ist noch wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, daß sich die aktiven Enzyme autokatalytisch polysialylieren und daß diese Fähigkeit Voraussetzung für die biologische Aktivität, sprich der Polysialylierung des NCAM, ist [241],[242]. Die Autopolysialylierung erfolgt an einer oder mehreren der potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen (PST=5, STX=6), die über die Primärsequenzen der PSTs verteilt sind. Ein *en bloc* Transfer autokatalytisch präformierter PSA-Ketten vom Enzym auf das NCAM (s. 2.4) konnte jedoch bisher experimentell nicht nachvollzogen werden, so daß die funktionelle Rolle dieser ungewöhnlichen Autokatalyse zunächst nur ansatzweise verstanden bleibt.

Die sehr nah verwandten Polysialyltransferasen PST und STX werden einerseits in unterschiedlichen Geweben differentiell exprimiert und sind auf verschiedene Weise entwicklungsabhängig reguliert. Auf der anderen Seite werden STX- und PST-mRNA auch simultan innerhalb eines Gewebes gefunden. Es stellt sich also die Frage, welches der beiden Enzyme zu welchem Zeitpunkt für die Polysialylierung des NCAM verantwortlich ist, oder ob dies möglicherweise in einem kooperativen Mechanismus geschieht. Versuche den beiden PSTs spezifische katalytische Merkmale zuzuordnen ergaben, daß sie unterschiedliche Affinitäten für die NCAM-Hauptisoformen (s. 2.2 und Abb. 2) besitzen [243]. Die STX scheint hauptsächlich die NCAM-180 kDa und NCAM-140 kDa Isoformen zu polysialylieren, während die NCAM-140 kDa und NCAM-120 kDa Isoformen die Hauptsubstrate der PST darstellen. Darüber hinaus hat sich gezeigt, daß die PST hinsichtlich der NCAM-Polysialylierung das aktivere Enzym ist, so sind der Polymerisationsgrad der PSA-Ketten und die absolute Ausbeute an PSA in einer stabil mit der PST-cDNA transfizierten Zelllinie höher als in einer adäquaten STX-Transfektante [243],[244]. Die Frage, ob zu einem definierten Zeitpunkt STX- oder PST-Aktivität mit der PSA-Expression eines Gewebes korrelieren, könnte also durch den unterschiedlichen Wirkungsgrad der beiden PSTs zusätzliche Komplexität erlangen.

### 2.4.2 Die Regulation der Polysialyltransferasen PST und STX

Die Polysialyltransferasen werden als der regulierende Faktor der PSA-Synthese angesehen und ihre Aktivität scheint primär auf mRNA-Ebene kontrolliert zu werden. Northern Blot-Analysen und *in situ*-Hybridisierungsexperimente beschreiben übereinstimmend eine enge Korrelation zwischen der PSA-Immunreaktivität und der mRNA-Expression von NCAM und den PSTs im Verlauf der Entwicklung des Nagergehirns [244],[231],[245],[246],[247]. Obwohl die gesammelten Daten nicht in allen Details übereinstimmen, kristallisiert sich heraus, daß in frühen embryonalen Stadien PST und STX parallel exprimiert werden. In späteren, postnatalen Stadien entwickeln sich ihre Expressionsmuster jedoch auseinander. Die STX ist sehr hoch in embryonalem Gewebe exprimiert, im adulten Zustand jedoch fast nicht mehr nachweisbar. Dagegen bleibt die Expression der PST in einigen Bereichen des adulten Gehirns erhalten. Offensichtlich sind die Regulationsmechanismen der beiden Gene auf Transkriptionsebene auf unterschiedliche Weise realisiert. Da beide Enzyme jedoch auch gleichzeitig in identischen Gehirnarealen exprimiert werden, stellt sich die Frage, wie zu diesem Zeitpunkt die Polysialylierung des NCAM reguliert wird.

Die bislang verfügbaren Daten zur genomischen Organisation der murinen Gene von PST und STX belegen einen homologen Aufbau bezüglich der Exon/Intron-Komposition, während die 5'-UTR-Bereiche nahezu keine Sequenzhomologien besitzen. Bislang konnten in diesen Sequenzabschnitten noch keine strukturellen Merkmale beschrieben werden, die die Regulation der unterschiedlichen zeitlichen und räumlichen Expression von PST und STX verantworten könnten. Wichtige Hinweise zum Verständnis der Regulationsphänomene von STX und PST werden zukünftig durch die Analyse von PST- und STX-knockout-Mäusen bzw. des entsprechenden Doppelknockouts erwartet. In ihrer Gesamtheit belegen die angeführten Daten, daß PST und STX die Schlüssel zum Verständnis der dynamischen Regulation der eukaryontischen PSA-Expression sind.

### 2.5 Reagenzien zum spezifischen PSA-Nachweis

Für den spezifischen Nachweis von PSA und die funktionelle Untersuchung PSA-abhängiger Prozesse werden insbesondere zwei Hilfsmittel eingesetzt:

#### 1. Der monoklonale **Antikörper 735** (mAk 735)

Der mAk 735 erkennt hochspezifisch  $\alpha$ 2,8-verknüpfte Neu5Ac-Oligomere ab einer Kettenlänge von acht Resten, wobei die maximale Bindung erst ab einem Polymerisationsgrad von zehn Monomeren erreicht wird [248],[249]. Da Kohlenhydratepitope üblicherweise aus 6-7 Resten bestehen, kann aus diesen ungewöhnlichen Bindungseigenschaften geschlossen werden, daß der mAk 735 ein Konformationsepitop der PSA erkennt [11],[248]. Aufgrund der helikalen Struktur der PSA [250],[251] wiederholt sich dieses Epitop innerhalb längerer Ketten regelmäßig und erlaubt somit die Bindung weiterer mAk 735-Moleküle, so daß auch sehr geringe Mengen an PSA durch diesen Verstärkungseffekt detektiert werden können.

Da PSA als körpereigene Struktur der *Mammalier* nur sehr schwach immunogen ist, gelang die Herstellung des mAk 735 (Isotyp IgG2a) erst durch die Immunisierung von NZB-Mäusen mit *Neisseria meningitidis* Serogruppe B (s. 2.1). Dieser Mausstamm besitzt ein hyperaktives B- und T-Zellsystem und neigt zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen.

Neben dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten mAk 735 sind eine Reihe weiterer poly- und monoklonaler Antikörper zum PSA-Nachweis beschrieben [252],[253],[254],[255].

#### 2. Die **Endoneuraminidase N<sub>E</sub>** (EndoN<sub>E</sub>)

Diese Enzyme aus *E. coli* K1-spezifischen Bakteriophagen spalten  $\alpha$ 2,8-verknüpfte PSA-Ketten mit einem Polymerisationsgrad von mindestens acht Resten [256],[257] und werden aufgrund ihrer hohen Substratspezifität zum PSA-Nachweis eingesetzt. Die lösliche Endoneuraminidase des Phagen PK1E (EndoN<sub>E</sub>) wurde aufgereinigt [258],[259] und kloniert [260],[261]. Aufgrund des Spaltmusters des Enzyms [256], das sein Minimalsubstrat in fünf proximal und drei distal zur Spaltstelle liegende Reste zerlegt, liefert eine vollständige Degradation von hochpolymeren PSA-Ketten ein Gemisch von Spaltprodukten mit drei bis sieben Resten. Da dieses Gemisch mit dem mAk 735 nicht mehr detektiert werden kann (s.o.), dient der kombinierte Einsatz von Enzym und Antikörper zum eindeutigen Nachweis der PSA auf Molekülen oder Zelloberflächen.

### 2.6 Zielsetzung der Arbeit

Über die Regulation der PSA-Expression in Tumoren und während der normalen neuronalen Ontogenese lagen zu Beginn dieser Arbeit nur sehr wenige Daten vor. Die erstmalige Klonierung einer eukaryonten Polysialyltransferase in Form der PST-cDNA in dieser Arbeitsgruppe und die daraus resultierende Einordnung der Sialyltransferase X (STX) als einer weiteren Polysialyltransferase lieferten die Grundlage, die Schlüsselenzyme der eukaryonten PSA-Synthese und damit die physiologischen und pathophysiologischen Funktionen der Polysialinsäure zu analysieren. In diesem Kontext läßt sich die Aufgabenstellung für diese Arbeit in die folgenden Themenschwerpunkte gliedern:

#### 1. Isolierung und Charakterisierung der humanen Polysialyltransferasen-Promotoren:

Zum Studium der Regulation der PSA-Synthese sollten die Promotoren der humanen  $\alpha$ 2,8-Polysialyltransferasen PST und STX isoliert werden. Für eine detaillierte Analyse der Transkriptionsregulation dieser Gene war zunächst die Klonierung und Sequenzierung der nicht-translatierten 5'-Bereiche (5'-UTRs) und die Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte sowie die Analyse möglichst großer 5'-wärts ("upstream") davorgeschalteter Sequenzabschnitte entscheidend. Die Gewinnung genomischer Klone, die einen möglichst großes Teilstück dieser 5'-Sequenzen abdecken, sollte zunächst durch das "Screening" einer humanen P1-Phagen-Bibliothek erreicht werden.

#### 2. Analysen zur Expression von PST und STX in humanen Tumoren und Tumorzelllinien:

Ausgehend von der Hypothese, daß die Reexpression der PSA das maligne Wachstum von Tumoren fördert, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, eine möglichst große Zahl humaner Tumorzelllinien bzw. solider Tumoren mit unterschiedlichem klinischen Verhalten auf Anwesenheit von NCAM und PSA sowie auf die Expressionsmuster der STX- und PST-mRNAs zu untersuchen. Die erhaltenen Ergebnisse sollten mit dem Differenzierungsgrad und dem Metastasierungsverhalten der Tumoren korreliert werden. Als Kontrollen sollten geeignete humane Normalgewebe eingesetzt werden.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Charakterisierung des Transkriptionsstarts der humanen PST

Der Ausgang für die Untersuchung eines Promotors ist die Feststellung des Startpunktes der Transkription. Vor der Kodierungssequenz eines Gens befindet sich ein Nukleotid an dem die Synthese der mRNA-Vorläufer punktgenau durch die Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie initiiert wird. Zwar kommen auch Gene mit multiplen Transkriptionsstarts vor, an jedem dieser Startpunkte erfolgt die Umschreibung des codierenden DNA-Stranges jedoch bei fast allen bekannten Genen ebenso wie bei einem singulären Transkriptionsstart präzise an einem festgelegten Nukleotid. Für die Bestimmung der Transkriptionsstarts der humanen PSTs wurden zwei unterschiedliche Verfahren eingesetzt, die in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben sind (s. 3.1.1 u. 3.1.2). Sowohl die 5'-RACE-Analyse als auch die Primer Extension-Methode setzen die Kenntnis eines Abschnitts der cDNA voraus, der für die Ableitung von Oligonukleotidsequenzen geeignet ist. Ebenso muß eine Präparation von PolyA<sup>+</sup>-RNA aus Zellen vorhanden sein, die das zu untersuchende Gen auf möglichst hohem Niveau exprimieren.

#### 3.1.1 5'-RACE-Analyse

Zur Vervollständigung des 5'-nicht-translatierten Bereichs der humanen PST-cDNA und zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts wurden der Marathon-Ready<sup>TM</sup> cDNA Amplification Kit und der Advantage<sup>®</sup> cDNA PCR Kit der Firma Clontech eingesetzt. Dieses System stellt eine gewebsspezifische cDNA-Bibliothek als Ausgangsmaterial für die PCR-Amplifikation mit einem genspezifischen Primer zur Verfügung (s. 5.2.3.13). Die cDNA-Bibliotheken zeichnen sich dadurch aus, daß nach reverser Transkription und Zweitstrang-synthese ein spezieller Adapter an beide Seiten der Doppelstrang-cDNA ligiert wird. Für die Amplifikation des 5'-Bereichs der humanen PST wurde eine cDNA-Bank ausgewählt, die auf hoch gereinigte PolyA<sup>+</sup>-RNA aus humanem fetalem Gesamtgehirn zurückging, da die Expression der PST-mRNA hier im Vergleich zu anderen Geweben besonders hoch ist. Es wurden mit den Oligonukleotiden CB54 und CB73 (s. 5.1.6) zwei unterschiedliche genspezifische Primer eingesetzt.

## Ergebnisse

Als Gegenprimer wurde der Marathon cDNA Adapter Primer 1 (s.5.1.6) in "touchdown"-PCR-Reaktionen [262],[263] mit folgenden Parametern verwendet:

- 94°C für 30 sek
- 5 Zyklen:
  - 94°C 5 sek
  - 72°C 4 min
- 5 Zyklen:
  - 94°C 5 sek
  - 70°C 4 min
- 25 Zyklen:
  - 94°C 5 sek
  - 68°C 4 min

Die durch die Amplifikation erhaltenen Fragmente wurden in 1.2%iger Agarose geleelektrophoretisch aufgetrennt (s. Abb. 6) und nach Aufreinigung aus dem Gel über den TA-Mechanismus in den pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor subkloniert und anschließend in *E. coli* DH5 $\alpha$  CaCl<sub>2</sub>-transformiert.

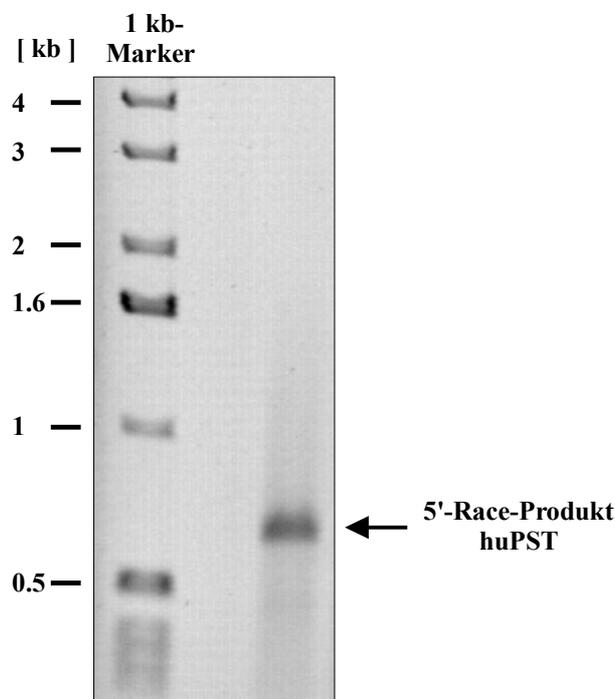


Abb. 6: PCR-Amplifikation des 5'-Bereichs der humanen PST mit der 5'-RACE-Methode und dem genspezifischer Primer CB73. Das Amplifikat hat eine Länge von ca. 700 bp, da der Primer CB73 innerhalb der codierenden Sequenz der PST liegt (nt +343 bis nt +316, wenn A des Startcodons= +1).

Da zu erwarten war, daß die in den T-Vektor klonierten Inserts unterschiedliche Längen aufweisen würden, war es für die Ermittlung des exakten Transkriptionsstarts sinnvoll,

## Ergebnisse

möglichst nur die längsten Fragmente zu sequenzieren. Aus diesem Grund wurden die nach der Transformation erhaltenen Bakterienklone über eine PCR-unterstützte Längenselektion vorgetestet. Dazu wurden die klonierten Fragmente mit Vektorprimern über eine Direkt-PCR aus Bakterien radioaktiv ( $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ -dATP) markiert. Die markierten Amplifikate wurden in 6%igen Polyacrylamidgelen (s. 5.2.3.20) aufgetrennt und anschließend autoradiographiert. Auf diesem Weg konnten für die beiden genspezifischen Primer CB54 und CB73 je 50 Klone voranalysiert werden.

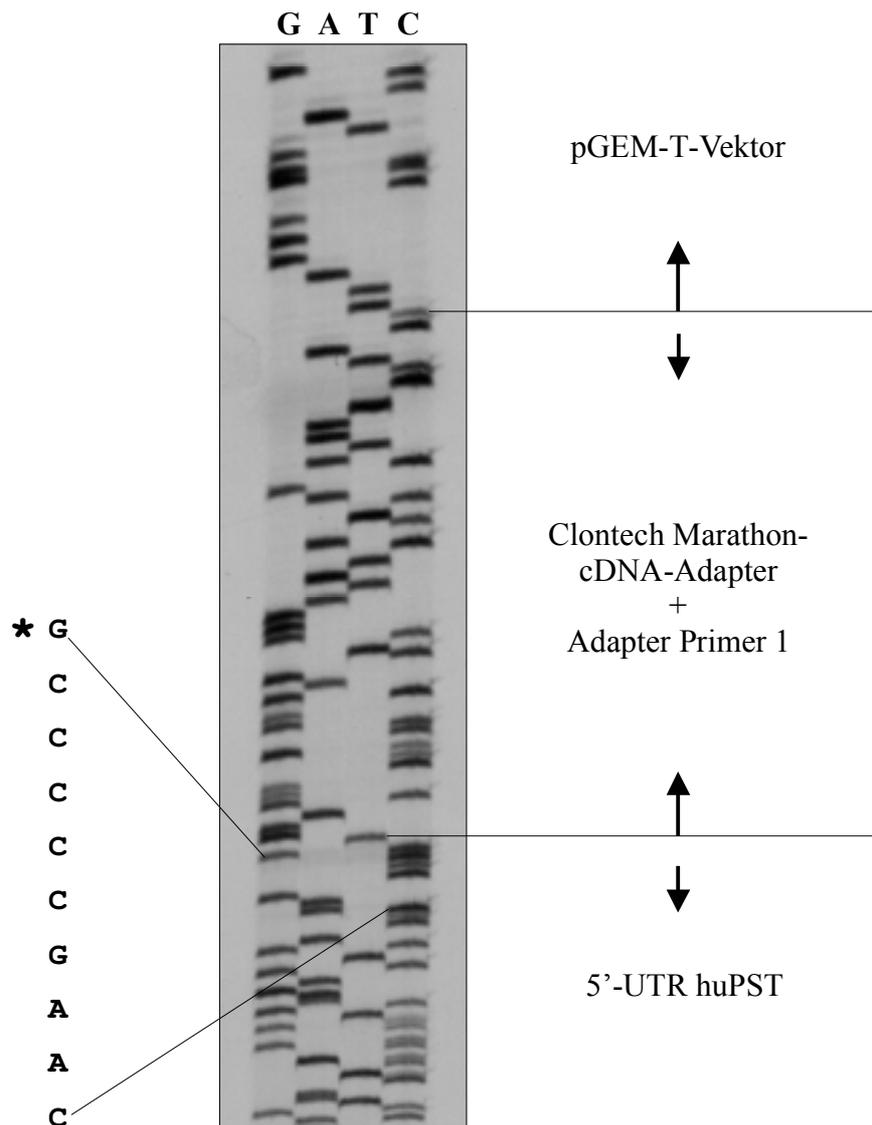


Abb. 7: Sequenzdarstellung des längsten 5'-RACE-Produktes (Autoradiogramm  $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ -dATP-Sequenzierung Klon 9). Die Beschriftung an der linken Seite gibt die Sequenz 3'-wärts vor dem Transkriptionsstart an. Das Sternchen kennzeichnet das letzte Nukleotid in der 5'-nicht-translatierten Region (5'-UTR) der humanen PST vor dem an die cDNA ligierten Adapter und entspricht dem Transkriptionsstart (vergleiche auch mit genomischer Sequenz in Abb. 14 und Sequenz in Abb. 8).

Durch die Visualisierung der Größenunterschiede war es anschließend möglich, DNA-Präparationen und Sequenzdarstellungen der längsten 5'-RACE-Klone vorzunehmen und

kürzere Produkte bei der Analyse zu vernachlässigen. In Abb. 7 ist exemplarisch ein Ausschnitt aus einem Autoradiogramm einer der beiden längsten im 5'-RACE amplifizierten Klone dargestellt. Die 5'-UTR-Sequenz der humanen PST endete bei den Klon 9 und Klon 10 an Nukleotid -323 5'-wärts vom Translationsinitiationscodon ATG. Da in der Analyse von 100 5'-RACE-Klonen kein Klon gefunden werden konnte, der "upstream" der Position -323 weitere Sequenzinformation lieferte, war davon auszugehen, daß das in Abb. 7 dargestellte Guanin den Transkriptionsstart repräsentiert. In Abb. 8 läßt sich erkennen, daß zwar alle im 5'-RACE amplifizierten Produkte spezifische PST-Sequenz besitzen, aber keineswegs alle Klone eine identische Länge aufweisen. Dargestellt sind die durch vorherige Längenselektion ermittelten zehn Klone, die die ausgedehntesten Sequenzinformationen aus dem 5'-Bereich lieferten. Offensichtlich war es während der Herstellung der für das 5'-RACE verwendeten cDNA-Bibliothek im Verlauf der reversen Transkription häufig zu Abbruchereignissen gekommen, was sich in der unterschiedlichen Länge der RACE-Produkte niederschlug. Vermutlich war der hohe GC-Gehalt (s. 3.2.4) des 5'-Bereiches der PST für die schlechte Effizienz der reversen Transkription verantwortlich.

Klon-Nr.	GSP	Position		-1+1
10	CB54	-323	5'-GCCCCCGA	CCAGCTGCAGAACTGCCGCGCCACCTCCAATGCAC-----G A T G----3'
9	CB73	-323	5'-GCCCCCGA	CCAGCTGCAGAACTGCCGCGCCACCTCCAATGCAC-----G A T G----3'
5	CB73	-318	5'-CGA	ACCCAGCTGCAGAACTGCCGCGCCACCTCCAATGCAC-----G A T G----3'
6	CB73	-318	5'-CGA	ACCCAGCTGCAGAACTGCCGCGCCACCTCCAATGCAC-----G A T G----3'
1	CB73	-317	5'-GA	ACCCAGCTGCAGAACTGCCGCGCCACCTCCAATGCAC-----G A T G----3'
4	CB73	-314	5'-CCC	AGCTGCAGAACTGCCGCGCCACCTCCAATGCAC-----G A T G----3'
11	CB54	-314	5'-CCC	AGCTGCAGAACTGCCGCGCCACCTCCAATGCAC-----G A T G----3'
12	CB54	-312	5'-CAG	CTGCAGAACTGCCGCGCCACCTCCAATGCAC-----G A T G----3'
13	CB54	-312	5'-CAG	CTGCAGAACTGCCGCGCCACCTCCAATGCAC-----G A T G----3'
7	CB73	-307	5'-GC	AGCTGCCGCGCCACCTCCAATGCAC-----G A T G----3'

Abb. 8: Partielle Sequenzdarstellung der zehn längsten 5'-RACE-Klone. Die Positionsangaben beziehen sich auf das ATG (Fett): Adenin: = +1. GSP: Genspezifischer Primer.

### 3.1.2 Primer Extension

Um den durch die 5'-RACE-Analytik (s. 3.1) detektierten Transkriptionsstart (Nukleotid -323) mit einer zweiten unabhängigen Methode zu bestätigen, wurde die Primer Extension-Technik (s. 5.2.3.14) gewählt. Als mRNA-Quelle wurde eine von der Firma Clontech erworbene humane fetale PolyA<sup>+</sup>-RNA aus Gesamtgehirn eingesetzt. Die mRNA wurde zunächst mit dem genspezifischen Primer CB98 und nicht-markierten dNTPs revers transkribiert. Um das Risiko von vorzeitigen Abbrüchen zu minimieren, wurde der Primer

## Ergebnisse

CB98 so gewählt, daß die von der reversen Transkriptase zurückzulegende "Strecke" von der Primerbindungsstelle (nt -233 bis nt -263, wenn A des Startcodons = +1; s. Abb. 14) bis zu dem durch das 5'-RACE ermittelten Transkriptionsstart bei Nukleotid -323 mit 60 Nukleotiden möglichst gering war. Der erhaltene cDNA-Einzelstrang wurde anschließend zusammen mit einer Sequenzierreaktion, durchgeführt mit dem Primer CB98 und einem genomischen Sequenzabschnitt aus der 5'-flankierenden Region der PST (PF1, s. Abb. 12), in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, durch Elektroblot auf eine Nylonmembran transferiert und nach Hybridisierung mit einer geeigneten digoxigenin-markierten Sonde über eine Chemilumineszenzreaktion auf konventionellem Röntgenfilm dargestellt.

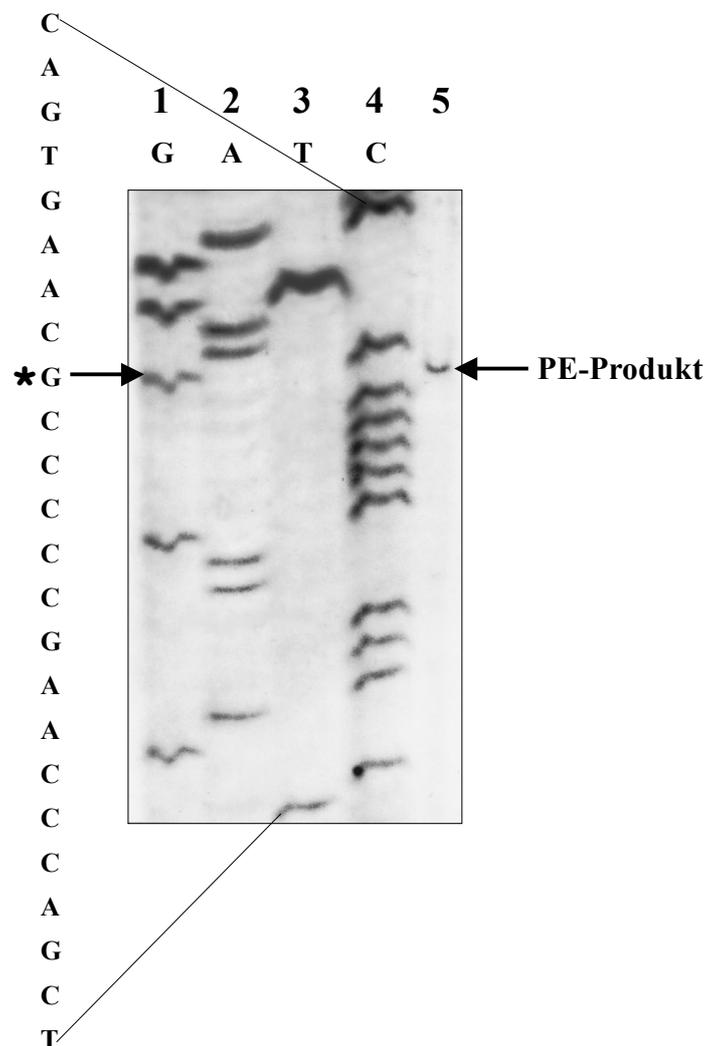


Abb. 9: Primer Extension mit dem huPST-spezifischen Oligonukleotid CB98 und mRNA aus fetalem Gesamtgehirn. In den Spuren 1 bis 4 ist als Größenmarker für das PE-Produkt eine Sequenzreaktion mit dem Primer CB98 und dem PST-Fragment PF1 (s. Abb. 12) aufgetragen. Das PE-Produkt in Spur 5 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. In gleicher Höhe läuft in Spur 1 (Pfeil links) ein durch didesoxy-GTP terminiertes Fragment der Sequenzreaktion. Die Beschriftung an der linken Seite gibt die Sequenz des dargestellten Ausschnitts an. Das durch das Sternchen gekennzeichnete Guanin repräsentiert den Transkriptionsstart (Vergleiche auch mit genomischer Sequenz in Abb. 14 und Sequenz in Abb. 8).

Die übereinstimmenden Ergebnisse von 5'-RACE-Analytik und Primer Extension erlaubten es, den Transkriptionsstart der humanen PST auf ein Guanin in Position -323 festzulegen. Durch die exakte Positionierung des Transkriptionsstarts war eine Voraussetzung für die Analyse der Transkriptionsregulation des PST-Gens erfüllt, da regulatorische Transkriptionsfaktoren 5'-wärts zum Transkriptionsstartpunkt binden müssen. Die hier beschriebenen Methoden zur Ermittlung des Transkriptionsstarts, 5'-RACE und Primer Extension, wurden parallel auch für die humane STX angewandt, führten jedoch zu keinem Ergebnis. In der Primer Extension konnte mit einem spezifischen Oligonukleotid (CB99), daß 58 bp vor dem murinen Transkriptionsstart an die humane Sequenz hybridisierte kein Primer Extension-Produkt generiert werden. Durch eine zur Vorgehensweise bei der PST äquivalenten Anwendung des 5'-RACE konnte für die humane STX lediglich ein Amplifikat generiert werden, das bis -30 Nukleotide "upstream" des ATG-Startcodons reichte und mit Sicherheit nicht den Transkriptionsstart des Gens darstellte. Die Erweiterung des 5'-RACE-Systems um eine zusätzliche Amplifikationsrunde ("Nested"-PCR) und der Einsatz von vier verschiedenen Primerkombinationen hatten ebensowenig Einfluß auf dieses Ergebnis, wie die Verwendung eines alternativen 5'-RACE-Kits (Gibco BRL), so daß für die im folgenden beschriebenen Analysen im Fall der STX auf den murinen Transkriptionsstart Bezug genommen wird (s. Abb. 16, Abb. 18 und Abb. 19).

## **3.2 Isolierung und Charakterisierung potentieller Promotorfragmente der humanen PSTs**

### **3.2.1 Screening einer humangenomischen P1-Phagenbank**

Die für die Promotoranalyse notwendige Isolierung genomischer Sequenzabschnitte aus den 5'-flankierenden Regionen des PST- bzw. STX-Gens erfolgte durch nicht-radioaktive Hybridisierung einer P1-Phagen-Genbibliothek, die das 1.2-fache der humanen Genomgröße repräsentierte [264]. Das P1-Klonierungssystem mit dem Vektor pAd10SacII eignet sich zur Handhabung von Insertgrößen zwischen 70 kb und 100 kb [265]. Die folgende P1-Phagenbank wurde vom RZPD (Ressourcenzentrum/PrimärDatenbank im Deutschen Humangenomprojekt am MPI für Molekulare Genetik in Berlin) bezogen:

<b>Library-Nr.:</b>	700	⇒	<b>Filter-Nr.:</b>	100.25.30
				100.25.56
				100.28.63

## Ergebnisse

Digoxigenin-markierte RNA-Sonden wurden durch *in vitro*-Transkription der klonierten PST-cDNA (Hamster) bzw. STX-cDNA (Maus) hergestellt (s. 5.2.3.18.1.3). Die Sonden enthalten neben der kompletten codierenden Sequenz auch den jeweiligen bisher bekannten nicht-translatierten 5'-Anteil der cDNA. Die Verwendung einer Hamster- bzw. Maussonde war sinnvoll, da die Homologien auf Nukleotidebene innerhalb der codierenden Sequenzabschnitte größer als 90% zwischen den Spezies sind. In einem kombinierten Screening mit beiden Sonden wurde für jedes der beiden Gene je ein Klon aus der P1-Library isoliert:

PST-Klon-Nr.: ICRFP 700 B0395 Q06

STX-Klon-Nr.: ICRFP 700 N053 Q06

Nach Präparation der Phagen-DNA erfolgte eine erste Vermessung der genomischen Klone durch Restriktion mit verschiedenen Endonukleasen und anschließenden Southern-Analysen.

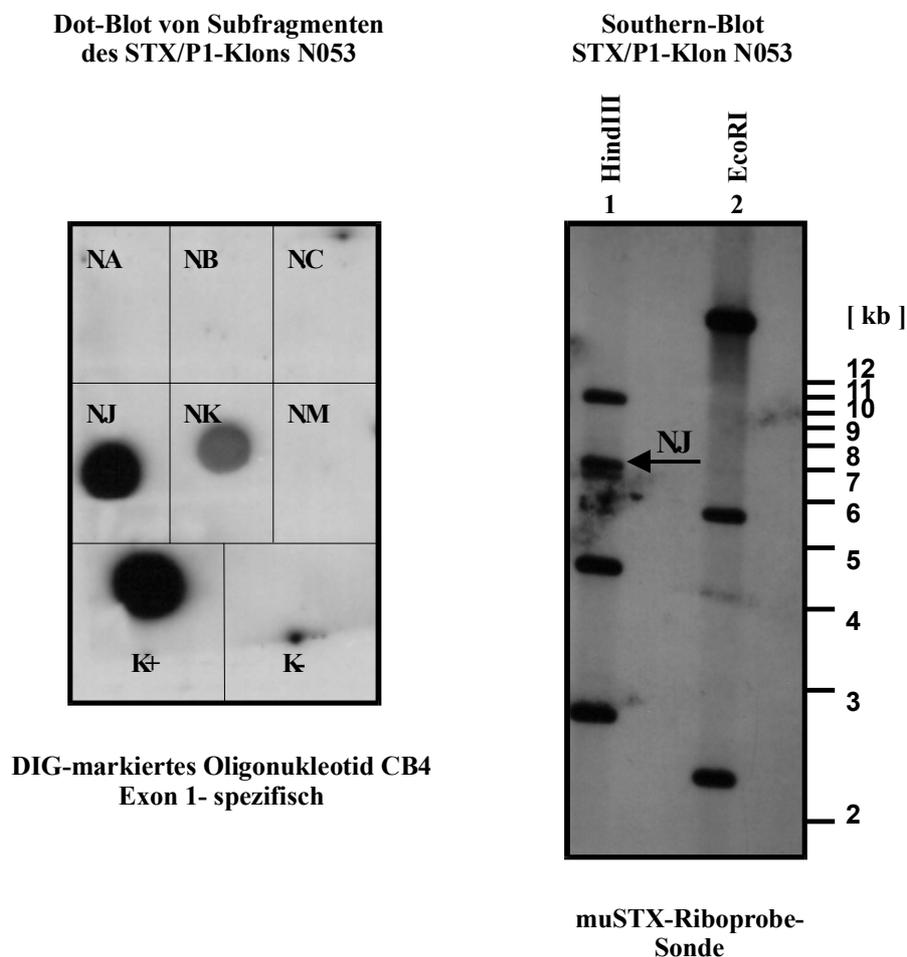


Abb. 10: Southern Blot und Dot Blot von enzymatisch hydrolysierten bzw. klonierten Fragmenten des STX/P1-Klons N053. **Dot Blot:** 1ng Plasmid-DNA der verschiedenen Subklone wurden auf eine Nylonmembran aufgebracht und mit dem Exon1-spezifischen Oligonukleotid CB4 hybridisiert. Der Subklon N.J reagierte deutlich positiv mit der Sonde, während die anderen Subklone kein oder nur ein schwaches (N.K) Signal ergaben. **K+:** Positivkontrolle, murine STX-cDNA im Vektor pBluescript. **K-:** Negativkontrolle, Vektor pBluescript ohne Insert. **Southern Blot:** Das dem Subklon N.J entsprechende HindIII-Fragment (Spur 1) konnte nach der Subklonierung durch seine Größe identifiziert werden ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

## Ergebnisse

Die Southern Blots lieferten eine Gesamtlänge von mindestens 11 kb für das genomische PST-Fragment innerhalb des P1-Klons B0953 und eine Länge von mindestens 33 kb für das genomische STX-Fragment innerhalb des P1-Klons N053. Zur weiteren Charakterisierung wurden Restriktionsfragmente der genomischen P1-Klone in den Vektor pBluescript subkloniert und mit einer Reihe von Oligonukleotiden und PCR-Amplifikaten, die aus definierten Bereichen der cDNA-Sequenzen von PST und STX abgeleitet und digoxigeninmarkiert waren differentiell hybridisiert. Die Abb. 10 zeigt exemplarisch einen Southern Blot von DNA des STX/P1-Klons N053, die mit den Restriktionsenzymen HindIII- bzw. EcoRI behandelt wurde sowie Dot Blot-Analysen verschiedener gleichartig geschnittener Subfragmente im Vektor pBluescript. Für das STX-Gen konnte ein Subfragment (N.J) des genomischen STX/P1-Klons N053 identifiziert werden, welches neben Exon 1 und einem Teil von Intron 1 auch große Sequenzanteile 5'-wärts des Initiationscodons enthielt. Das positive Signal des Subklons N.J durch die Hybridisierung mit dem Exon 1-spezifischen Oligonukleotid CB4 (s. 5.1.6) legte bereits nahe, daß der STX/P1-Klon N053 die für eine Promotoranalyse notwendige 5'-Sequenz enthielt. Durch Sequenzierung des Subklons N.J konnten schließlich 2680 bp aus dem 5'-Bereich des humanen STX-Gens aufgeklärt werden (s. 3.2.3.).

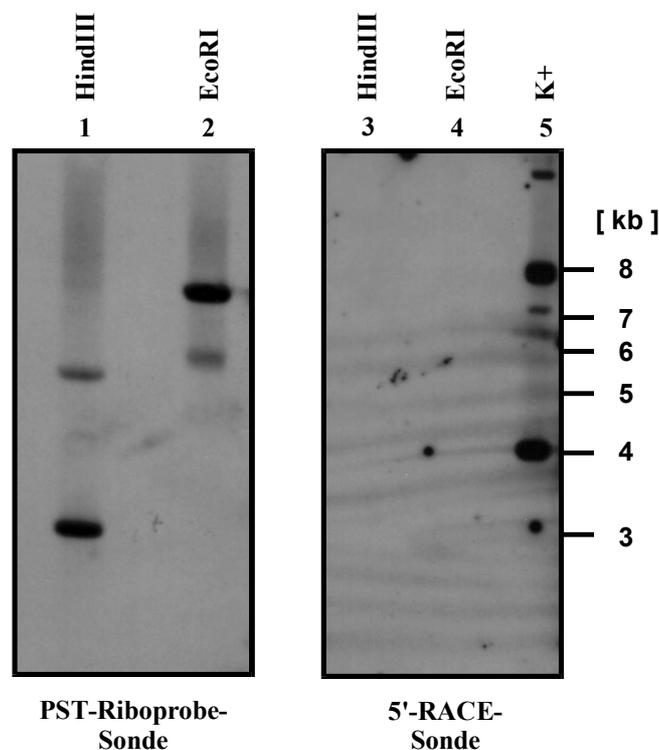


Abb. 11: Southern Blots des PST/P1-Klons B0395. Während in Spur 1 und 2, die mit einer PST-cDNA-Riboprobe Sonde hybridisiert wurden, je zwei Signale zu sehen sind, detektierte die 5'-RACE-Sonde kein Signal (Spuren 3 und 4). Spur 5: K+: Positivkontrolle, Hamster-PST-cDNA im Vektor pAH24.

Die Abb. 11 zeigt beispielhaft einen zur Vermessung des PST/P1-Klons B0935 eingesetzten Southern Blot mit HindIII- bzw. EcoRI-restringierter DNA. Die verdauten DNAs wurden parallel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und mit zwei unterschiedlichen Sonden hybridisiert. Während die Gesamtsonde je zwei Signale in der restringierten DNA detektierte, lieferte eine Sonde aus dem 5'-Bereich der humanen PST kein Signal. Die Sondensequenz wurde mit der 5'-RACE-Methodik gewonnen und umfaßte 308 bp "upstream" des Initiationscodons.

Insgesamt zeigen die Analysen der P1-Klone, daß sowohl der genomische PST-Klon als auch der STX-Klon inkomplett waren. Während der PST-Klon, in Analogie zur bekannten genomischen Organisation des Mausgens lediglich die drei letzten Exons und einen Teil der 3'-nicht-translatierten Region der cDNA enthält, fehlen dem STX-Klon das letzte Exon und der gesamte 3'-nicht-translatierte Bereich der cDNA. Dem genomischen PST/P1-Klon fehlte somit auch der für die geplante Promotoranalyse notwendige 5'-Bereich. Da auch ein wiederholtes Screening der genomischen P1-Phagen-Genbibliothek mit der humanen 5'-Sonde und auch das Screening einer weiteren genomischen Lambda-Phagenbank (human $\lambda$ FIXII, Stratagene) nicht zur Isolierung eines Klons mit PST-5'-Sequenz führte, wurde mit dem "Genome Walking" eine alternative Technik zur Darstellung dieses Sequenzabschnitts gewählt.

### **3.2.2 Amplifikation von potentieller Promotorsequenz der huPST durch Genome Walking**

Die Isolierung genomischer 5'-Sequenz für die humane PST erfolgte mit Hilfe des GenomeWalker<sup>TM</sup> Kits der Firma Clontech (s.5.2.3.12) [266],[267]. Grundlage dieser PCR-unterstützten Methodik zur Amplifikation unbekannter genomischer Fragmente ist ein bekannter Sequenzabschnitt, wie z.B. eine cDNA-Sequenz aus der zwei spezifische PCR-Primer abgeleitet werden können. Im Fall der humanen PST wurde die Wanderung mit dem Oligonukleotid CB54, orientiert an der bekannten Sequenz innerhalb des ersten Exons, begonnen (s. Abb. 12). Als Template für die Amplifikation wurden fünf verschiedene Pools hoch gereinigter genomischer DNA verwendet, an die ein spezieller Adapter ligiert worden war (s. 5.2.3.12). Jeder dieser DNA-Pools war vor der Adapterligation mit einer anderen stumpfendig schneidenden Restriktionsendonuklease, die eine Erkennungssequenz aus sechs Basenpaaren besitzt, behandelt worden. Im ersten Schritt der genomischen Wanderung

## Ergebnisse

wurden die fünf Pools aus genomischen DNA-Fragmenten als Template in parallele PCR-Reaktionen mit dem genspezifischen Primern CB54 eingesetzt (s. Abb. 12). Als Gegenprimer zu dem genspezifischen Primer CB54 wurde ein gegen den Adapter gerichteter Primer (AP1; s. 5.2.3.12) verwendet. Dadurch wurde eine Anreicherung der gesuchten spezifischen Sequenz idealerweise in allen fünf Pools erreicht. Eine 1:25-Verdünnung jedes der fünf primären PCR-Ansätze wurde anschließend als Template in parallelen "nested"-PCRs mit dem genspezifischen Primer CB55 (s. Abb. 12) und dem Adapter Primer 2 (AP2; s. 5.2.3.12) eingesetzt. Nach dieser zweiten Amplifikation war in mindestens einem der Ansätze ein Produkt gelelektrophoretisch darstellbar. Das Produkt wurde aufgereinigt (s. 5.2.3.4) und nach einer TA-Subklonierung in den pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor (s.5.2.3.8) sequenziert (s.5.2.3.20). Durch die Sequenzdarstellung konnte die Spezifität des Produktes anhand eines Überlappungsbereiches zu bekannter cDNA-Sequenz kontrolliert und spezifische Oligonukleotide (CB59/CB60 bzw. CB79/CB80) für zwei weitere Schritte in der genomischen Wanderung abgeleitet werden (s. Abb. 12).

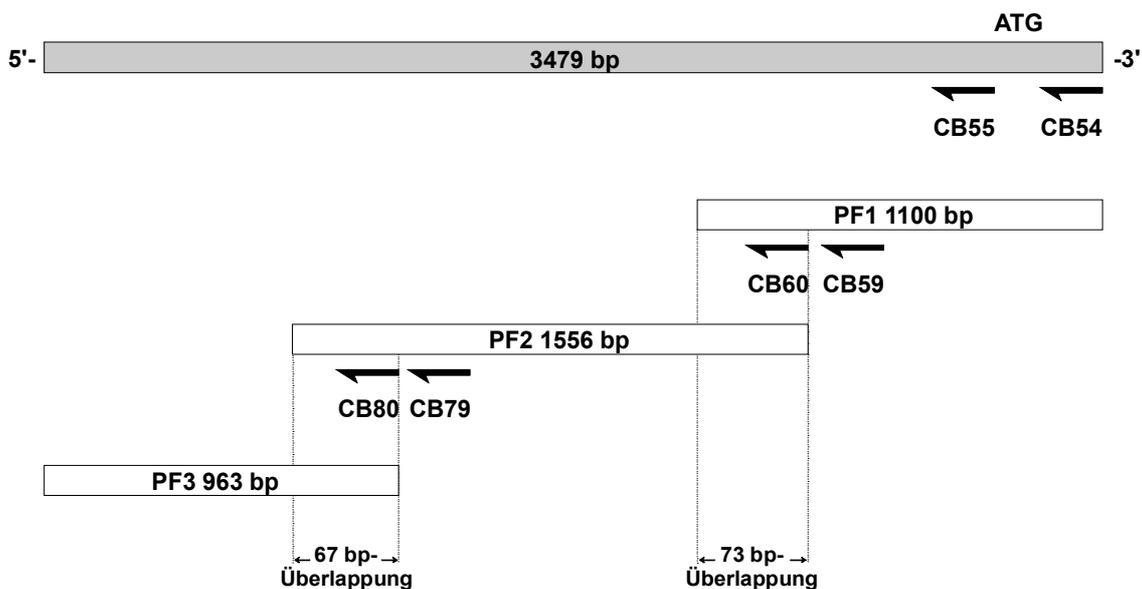


Abb. 12: Schematische Darstellung der drei durch "Genome Walking" gewonnenen Fragmente aus dem 5'-Bereich der huPST. PF: Promotorfinder-Fragment. CB54, CB55, CB59, CB60, CB79, CB80: Spezifische Oligonukleotide, die zur PCR-Amplifikation der Fragmente eingesetzt wurden. Die Spezifität der amplifizierten Fragmente konnte durch ausreichend große Sequenzüberlappungen garantiert werden. ATG: Translationsinitiationscodon. Die Länge der schematisierten DNA-Fragmente gibt nicht exakt die tatsächlichen Verhältnisse wieder.

Um das Risiko von Polymerasefehlern in den PCR-Reaktionen so gering wie möglich zu halten, wurden die Amplifikationen mit dem Advantage<sup>®</sup> Genomic PCR Kit von Clontech durchgeführt. Dieser Kit enthält eine Kombination aus zwei unterschiedlichen thermostabilen

DNA-Polymerasen, der Tth-Polymerase und einer "proofreading" Polymerase mit 3'→5' Exonukleaseaktivität, die falsch eingebaute Nukleotide korrigiert. Durch die Nutzung dieses speziell für die Amplifikation von genomischen DNA-Templates in einer "long-distance"-PCR (LD PCR) [268],[269] geeigneten Polymerase-Mix konnte das Risiko von Punktmutationen in den erhaltenen Fragmenten minimiert werden.

Zusammenfassend gelang durch das Genome Walking mit sechs verschiedenen huPST-spezifischen Oligonukleotiden in drei Amplifikationsrunden, bestehend aus je einer primären und einer "nested"-PCR, die sukzessive Amplifikation von drei überlappenden Fragmenten mit Sequenz aus dem 5'-Bereich der humanen PST. Durch die Sequenzierung der drei subklonierten "Promotorfinder"-Fragmente konnten schließlich 3479 Basenpaaren "upstream" des Initiationscodons des humanen PST-Gens aufgeklärt werden (s.3.2.3).

### 3.2.3 Sequenzdarstellung der genomischen 5'-flankierenden Regionen von humaner PST und humaner STX

#### STX:

```

AAGCTTCCAC TGTTCTGTG CACTCATATG ACTCTGGTCT GGTGGGTGCA AAGAAGGAAG ACTGAGCCTG GGATGAGAAC 80
ATGGGCCACC TAACAGGAAA CGGAAATAGA TTCTGTGTA ATCGTGGGTC ACCTAACAGG AAATGGAAAT AGACTCTGTT 160
GTAATTGTGC TTGCAGCAAT GAGGTTGACC CGACCTGGTG AATTTAGTAC CACGGCAACA CTTCATGAT GTTCTGCATG 240
GTAAGAGTGC AGTAGGTAGA GAAGCAGAGA AGCAGAGAAC AGAGGAGAGA AAGGTCAGTT TCTTCTTGCT CTTTTGGGNN 320
GTCTRRTTAA TCAATTATAA GTGAGCCAGG AGACCTTAGG TCTACTGCAG CTCAAATCCC CTATCATAAT TAGACACCTG 400
AATGTCTGTC TCCCTTGTA ACAGTGAGCC ACTAGAGGGC AGGAAACCCG AGGTGTCTCT CTCCACTTGG TGCTCTAGC 480
TCCTAGACA GAGCCTGGTA CAAGGTAGGT TAAATATTGC TGCACGTGG AGTGAGTGGG GGAGCGATT CAAATACAGAG 560
CAGCATACCA GGCGCATCCT GTACTTTCCT CTCCTATTCA AGGTATCCCA ACCATTCCCT TCAGAAAAA AAGGCAAAAT 640
GATGACAAAA ACCTCTCCAC ACCTCCTAAA CCACCCTTCA AGCAAGAAAA AGGGAAAGAT TTTGGCATT TGAAAACTTG 720
AAATAAGGAT GGTTAGACCC CGTGCCAGCC AACTGATGG GAAACTCTCC TTTGACGTCT CATCCCTGCC TCTAACAGAC 800
AGGGAGAGTG ACGTCCAACA TTGTTCTCAA CATCAGAAAA ACCTCACCCC AAGAAAAATA CATgggattt tCGaagtgc 880
tactgtaaaa ggagcagggt ggcctgactt cgccaaggaa tgggaaggaa atgaagcgc gaggtggaa ttagtacacg 960
cttctctggt ggaaaagaca tctgctcctg gcaactcctca aaggagggtga tgcagagctc tcccttgacg ctgtgctgct 1040
tcccgtaatc cattctccag gctgggtgat gggacctctt cctgacgggg agagcctgcc ctggctcca ggtcaacaa 1120
gggcagcagc ccccggtctg gaagcctccc tctgccccct ccttacacac gaagggcag aagggtctg ggcacaagca 1200
gtacttttgg agaaaatcag aaggccctct tacatccccg ggggcgcat gaagggactt ggctgctgc agcccctgc 1280
caaactctct tgagtggtcc aggggataag gccgaacgc cctcccatt cactggggtg tggtttccag cacttaggac 1360
attccatgta gtttctccaa caggactcct cctccccaca ctcaaaccca aaggaccctt tcataaacca gatgatcatt 1440
tctggaaagt tacatttctt aatttcagga attgttccaa ttctgcaaaa gaaaataaaa ggttaattatc taattccagt 1520
aaaacttaat ggggcccttc ccaccctgg ctaatggtg gtgtgaaatg taatttgact taaactgtct aaggctgtga 1600
aagtgtacaa tattcggaag ggtggggggc attaccctt gtgggagcca tatttttcta gaaggcattt tgatcaagc 1680
aggcctccc cggttatgta tcttaggtc attgagatc caagaactgg gggatgaag gccaccggc gtcagcaccg 1760
cgagggcgga cggaaagcgg gcgctgagtc tcccattggg gttctagccg agggttccag ccaggattgc gtgatctggg 1840
ggcagctcgg agagctctcc cgaccagta tgggtctat aaatggagat aaagatcagc acctggaggg agtggtttct 1920
cgagggctga gagcctcgc cacaaactgt agtgagcat ttaactgaag ttggcctatc ttggatattt ctctctcct 2000
ccccttccc caccctccc cataattcat caactgctga aacatctgcc tggctgaaac cgcttctcg ccgcgctg 2080
gggctgtcc ccagggtgtg gtctttgtgt cgagaaaact ttgagaggag gcgagggagc tggacaaaaga gggggcaggg 2160
gagggcggtt gccagcctga ggggtgcgcc gggcggtgag ggcacttgcc tggctcagc tccgtaccgg gtcgctcgg 2240
gtggccagag ccagctctct ctaggccagg agtgcgctcc cgcctgcatc ccgcccctc gggagctgaa taaagccagg 2320
cgggagaagc aaaggctagc gcctggagc tggagttggt gggagggagg gagcagaggc gggagcaaaa gctgtcaaac 2400
tgcgcgcgga gccggcgcg gggcggggga agggagagga gggagggagg ggcagggcgg agccgggagg gagcagcgg 2480
gctcgccgg cctgagcaac ccctgctgt cgctgcccgt gccgctgccc ctgcccgcgc cggcccggac tegtccggag 2560
cgcaggtgt ctgcccagct gcgcgcggg cgcgagget ccggctgccc ccgctgccc ctccggcccc tgcctctcgc 2640
gccggcccgc ttgggtcctg gcgggcgca accaccATG-----AAGCTT (ca. 4.1 kb im Intron 1) 2680

```

Abb. 13: Genomischer 5'-Bereich der humanen STX, Ausschnitt aus dem Subklon N.J des P1-Klons N053. Das ATG-Startcodon ist fett dargestellt, die HindIII-Klonierungsstellen unterstrichen. Kleinbuchstaben symbolisieren den zu Beginn dieser Arbeit bekannten entsprechenden murinen Sequenzabschnitt [270].

## Ergebnisse

### PST:

CTGCCATTAC	TCACATTATT	TATTTATAGG	CTATTGTATA	ATTGTAGAAT	TGTGCTGAAT	AAGACAAAT	ATATTCTCTT	80
TATTGAAGAA	CTTACAATCC	AAAGATCAAA	TGAAAATTTA	GAAACAATCT	TATTTGCTCA	GGAGCATCAA	ACTAAGCATT	160
CTAATAGAA	AAGTTAATTC	CAAAGGACTT	CTTTATAGTC	TTTTGGTGCT	CAGGAACATC	AAACTAAGCA	TTCTAATAGA	240
AGTTAATTC	AAAAGACTTT	TTATCCAATA	TTTATAGTTC	TTGCACCTAT	TTACATATTG	AGAAAAAAC	ATGCTGTCTT	320
CACTTTTGTC	TAAGTATTGG	CCTGTATGGC	TTCTTTTAA	TTGGCAAATT	ATAATGGCTA	TATATTTAAC	GAATCTAACA	400
ATATTAACA	AATGTCATTC	AATTACACTC	CAAACACTAA	ATTGCTTTAA	TTTGGGAAGA	AGAATTCCTG	GAGTCTCGCT	480
GAACAGTAT	CAGTCATTC	GAATTGCTCG	CCTTAATATA	AAAAGTTCG	TACCTAAAA	ATTCAGAAAC	AGCAGCATA	560
TACAATTGGA	GAGTTCACTT	ATTTTCTCT	TGGACATTTA	AATTTGTCTT	ATGTTTCTT	ATAACTAGTT	CTTGATTGCT	640
TTGCTCTCG	TCTTTTTTTT	TTTTTCTTTT	CTTTTTTTT	TTGTTTGT	GTTTTTCTT	GTTTGGGCTA	GGTAAGTAGT	720
TTCCCCTAAA	TGTAATTTAA	AGCTTGATAT	AGATTATACT	CACTTTCTC	TTGAAGATT	TCTTGTGGCT	TTCTCATTAC	800
AGAAGACTGT	TCCACACTCT	GGAGCCATAG	AATATTATGA	GTATACCGAA	ACTTTTGGAC	CAGCACTCTC	CCTTACCCT	880
TTCCCTTCTA	ACAGTACTGA	GCCACTTCAA	AGTTGCCCCA	AAGCACCAGA	GTTTTATTAC	TCTCTGGAGT	TGCGCATACT	960
						← CB80		
CCTTTTTCCA	CCTGCAATGT	TCTATCCTCC	CTCTGCTTGG	CTTACTTCTT	TGTCAGCTTT	GAAAACAGGA	GTCTGTGTGT	1040
				← CB79				
CCCCTTACC	CGGAAACTCA	TCTTCCGGGC	TTCAAAGGC	TAAACACCC	CATCTGCTTC	AACCCAGGAG	CTTACTCAGA	1120
TACCATATAT	ATTTTAAATG	ATGTTTCTGA	TTCATGTTGC	CATACTGTAA	ATTATATT	TTAAAAGATG	CCCCTTTGA	1200
GTGAGTAGGA	TTTGTGCTG	ACTAGATGCT	AAGTTTTATT	CATCTTTGTG	TTCCCATCTC	CGCACACATT	GCCTGCCCA	1280
TAACCATGC	TTAAGAAATA	ATGAGTTTAA	TGAAACGATG	CATATTACTC	TATCCCTGAC	AGAGGGTGAT	GTTTTACCTA	1360
TAATCTAAA	TATAGTTGTC	TACTGTTTAA	AAATCAAAGT	TTATCCTTGA	GAATTTAGCA	TCCTAACCAT	GCATCCCTCT	1440
NCCACCCGGC	CCCTGCCTC	AGCCCCGGAT	CCCTTTTAA	TTAAATAAGA	AGCTGTTTTA	TTCTGGCAGT	TTTTGCCAGA	1520
AGAAAAGTGA	GTCTAACAGA	AGTCAAFTCTA	ACAGAAATGC	ATTAATGCAG	GCTGGATTG	CCTAGACATC	AATAAGCTCG	1600
AAAGGCTCCC	TGTGGGCCAC	TTGTAGTGTC	AATAAACGTT	CGTAATTACT	TGCTCCTTGG	AGCATTTTTA	TACCCGACCC	1680
CGTTCGCTGT	GCTGCAAAGA	GGAAATTCAA	GATCTCGGAA	GTTCTTAACT	TCTTAAACTC	TAGAGGAAGT	ATGGTAAACA	1760
CTGGCGGGA	CCTTGGGTTT	TTAAGCAAAG	ACGCTGGCTG	TTTTCGTTG	TATTTTAAAG	TGTCAGGCGA	CAAGCAACTC	1840
AGAAATCCCC	TTCTTACTTC	CGGCGGGAGG	GAAgattgga	attgggcttc	atcatttctg	agcgtgaaaa	agcgtgaaag	1920
ctactgttca	acctgaagga	acacggaatt	caactggaga	gaaaccttg	cgaccaggga	gctggggacc	ggcgcatata	2000
gatgaggaa	atcctggctt	ccagacactg	tctcatgcta	gaggtgcctc	ccgacctacc	agccaacagt	agagaccgga	2080
accaaggcgt	ggtactagca	gagtagcaag	catctctccc	aatgagggca	acgactggag	gatggtggag	aggtactcag	2160
agtgaacaat	cgaacacaga	actcttga	agtgtccctg	ccaccacaata	caagtgcgaa	aaatggtggg	acggaggaga	2240
ggtgacaatc	agaggctata	tatataattg	agacttttag	agaggacttt	gctcttcctt	cctcccctcc	ctttctcttc	2320
ctttcttttc	ttccttcctt	ccttggtatc	cgaatgtgtg	tgggtgtact	tgcgtttaa	agagaggtcc	atggtagtctg	2400
cttttttttc	agaactctgt	ttctccgcaa	tgaagtttaa	gtgggattgg	agtttccttg	acttctgcgt	gaggagtctc	2480
		← CB60				← CB59		
caaatggcaa	tgaagaggag	gcgcataaat	atccataaag	ttcctaata	cacctctatc	atcacttgtt	tctgcaaaa	2560
tcctgagcca	gggtcgtcgt	ccaccaccca	tgcagagtgg	gcccacggc	taacaagttc	atgtgtgat	ttgcacttcc	2640
cagattgagt	aataaaagtc	ttcttccttc	caccgcccgc	cccacccccg	caccccgttt	cacccacct	tggagggcgt	2720
gtttctcgt	gtgagggtgt	gtgtttagca	aaagcgattg	aaagaaggta	ctcttcttgc	aatccacccc	tagctctacc	2800
tgaagcattc	ctctggcggg	acgcttttgc	aatctgtccc	caggcgagg	gacctctcac	ctagatgagg	atagactatc	2880
ttggagctcc	caggtccaga	gagctgatgc	tttgatgtcc	caggagagtg	tgtgtgattc	tgcgtgtacg	tgtgtgtgca	2960
tatgtatgta	tgtgtgatg	tatgtatag	tgtatgagcg	cgagctcgca	ggcgcgtagc	actgtgagct	tctctcccgc	3040
gcacagagca	ggcagagccg	gggacgttac	tctccaagca	gcctccgccc	cctcagcctg	gtgattgctt	ttgcgcagcg	3120
tttatctcct	agcaagaggg	aagggccagt	gacgccccgc	aaccagctg	cagaagctgc	cgccacctcc	aatgcacaag	3200
gtgtctcatc	tgaaaaagaa	cctgagcccc	agggaggcgg	cgcgagcagc	cctggcagag	ctggcgcaaa	cagggcgaga	3280
		← CB98						
ggtcgctggg	cagcgttcga	ggaccagagg	gagctcgccc	acagaagacc	ccagtgatct	gatcccggga	tcccggctcc	3360
aagctctcct	cgcattttac	agatttcacc	cccgcgacta	tctcccaaaa	acggagcctt	tatatcaaga	gaaggtgagg	3440
gagctggggc	aaccaggact	ttctcgggca	cccaag <b>ATG</b>					3479
		← CB55						

Abb. 14: Genomischer 5'-Bereich der humanen PST. Das ATG-Startcodon ist fett dargestellt. Kleinbuchstaben symbolisieren den zu Beginn dieser Arbeit bekannten entsprechenden murinen Sequenzabschnitt [271],[272]. Der Transkriptionsstart der humanen PST ist doppelt unterstrichen. Die Positionen spezifischer Primer für die huPST, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind durch Unterstreichung der entsprechenden Sequenz gekennzeichnet.

### 3.2.4 Sequenzalignments zwischen den 5'-Bereichen der murinen und humanen PST sowie der murinen und humanen STX

Die paarweisen Homologievergleiche in Abb. 15 und Abb. 16 wurden mit der Analysensoftware "DNASar, Megalign 3.1.7" der Firma "Lasergene" nach der Clustal-Methode (Parametereinstellungen: Ktupel: 2, Gap Penalty: 5) vorgenommen. Da die Sequenz der Promotorregion des murinen PST-Gens bekannt war, konnte nach der Isolierung und Aufklärung der humanen Sequenz des potentiellen PST-Promotors durch die Technik des



Dem potentiellen PST-Promotor fehlte im Bereich 5'-wärts vor dem Transkriptionsstart (nt 1281 in Abb. 15) eine TATA-Box und auch ein CCAAT-Motiv war nicht eindeutig zu definieren. Von den drei basalen "upstream"-Elementen eukaryontischer Promotoren (TATA-, CCAAT- und GC-Box) fand sich 62 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart eine in beiden Spezies hoch konservierte inverse GC-Box mit der dazugehörigen Bindungsstelle für den basalen Transkriptionsfaktor Sp1. Die Region zwischen dieser GC-Box und dem Initiationscodon (ca. 400 bp) besitzt eine hohe Sequenzidentität (76%) und einen auffallend hohen G+C-Gehalt (62%). Dagegen weist der gesamte Abschnitt "upstream" der GC-Box einen G+C-Gehalt von 50% und einen Homologiegrad von nur 30.5% auf. Aber auch in diesem Bereich finden sich kleinere Inseln zwischen 8 und 13 bp, die in Sequenz und Position zwischen den Spezies konserviert sind. Weiterhin konnten über den gesamten Ausschnitt sowohl der humanen als auch der murinen Sequenz verteilt je 66 CpG-Dinukleotide identifiziert werden. Diese CpG-Dinukleotide stellen potentielle Methylierungsstellen dar. Das CpG-Dinukleotid ist in der Vertebraten-DNA gegenüber dem Dinukleotid GpC normalerweise deutlich unterrepräsentiert. Aufgrund der spontanen Desaminierung von 5-Methylcytosin zu Thymin sind diese Methylierungsstellen in besonderem Maße von Mutationen betroffen. Ein wie in diesem Fall gehäuftes Auftreten von CpG-Dinukleotiden (Verhältnis von CpG zu GpC = 0.62) spricht dafür, daß die Methylierung an der Regulation des PST-Promotors beteiligt sein und möglicherweise zum "Silencing" des Gens beitragen könnte. Auffällig viele (24) dieser CpG-Dinukleotide lagen in dem 400 bp-Abschnitt zwischen GC-Box und ATG-Startcodon, 15 davon an zwischen den Spezies konservierten Positionen. Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung der Cytosin-Methylierung an der Transkriptionsregulation des Gens war das Vorhandensein eines konservierten CpG-Dinukleotids innerhalb der GC-Box. Der basale Transkriptionsfaktor Sp1 kann nicht mehr an seine Erkennungsstelle binden, wenn der Cytosinrest in dieser Sequenz methyliert ist.

Weitere Merkmale der PST-Promotorregion sind eine purin-reiche Region von nt 339 bis nt 394 (murin 93%, human 73% Purine) gefolgt von einem pyrimidin-reichen Abschnitt von nt 414 bis nt 471 (murin 93%, human 98% Pyrimidine).

Nach der Isolierung und Aufklärung der humanen Sequenz des potentiellen STX-Promotors aus dem STX/P1-Klon N053 konnte durch die Existenz einer entsprechenden Mausequenz ebenfalls ein Homologievergleich durchgeführt werden. Der STX-Promotor stellt einen zwischen den beiden Spezies stark konservierten Sequenzabschnitt dar und besitzt weder eine TATA- noch eine CAAT-Box (s. Abb. 16). In Entfernungen von 34 und 63 Basenpaaren vor

dem murinen Transkriptionsstart konnten zwei in beiden Spezies konservierte GC-Boxen mit den dazugehörigen Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Sp1 lokalisiert werden. Die GC-Boxen rahmen eine purin-reiche Region ein, die im humanen jedoch weniger ausgeprägt ist als im murinen Gen. Der Homologiegrad in einem 258 bp-Abschnitt zwischen den GC-Boxen und dem ATG-Startcodon liegt bei 61%, wobei der G+C-Gehalt dieser Region mit 81% noch wesentlich höher ist als in dem vergleichbaren Bereich des PST-Promotors. Die Sequenzhomologie im Bereich "upstream" der GC-Boxen erreicht einen Wert von 35.5%. Im dargestellten Sequenzausschnitt konnte, ähnlich wie beim PST-Promotor beschrieben, auch im STX-Promotor eine Häufung von CpG-Dinukleotiden festgestellt werden. Insgesamt fanden sich 109 potentielle Methylierungsstellen (Verhältnis von CpG zu GpC = 0.63) innerhalb der abgebildeten Sequenz (s. Abb. 16), 39 dieser CpG-Inseln liegen in dem 258 bp-Abschnitt zwischen GC-Boxen und ATG-Startcodon, 20 davon an zwischen den Spezies konservierten Positionen. Von nt 1148 bis nt 1196 (s. Abb. 16) erstreckt sich eine konservierte, pyrimidin-reiche Region (murin 94%, human 86% Pyrimidine).

Obwohl keine ausgedehnte direkte Sequenzhomologie zwischen den 5'-flankierenden Sequenzen von PST und STX gefunden werden konnte, demonstrierte eine Gegenüberstellung der im Homologievergleich zwischen den Spezies herausgearbeiteten spezifischen Merkmale einen sehr ähnlichen Aufbau der Promotoren von PST und STX. Beide Gene werden von TATA-losen Promotoren kontrolliert und besitzen zumindest eine GC-Box in vergleichbarer Entfernung 5'-wärts des Transkriptionsstarts. Die Transkriptionsstartpunkte sind eingebettet in G+C-reiche Regionen, die die Merkmale von CpG-Inseln erfüllen. Diese strukturellen Merkmale werden sehr häufig im Aufbau der Promotoren von "housekeeping"-Genen gefunden, sind aber auch schon für eine Reihe anderer gewebsspezifisch und entwicklungsabhängig regulierter Genen beschrieben worden [273]. Die Positionierung der GC-Boxen und der Transkriptionsstartpunkte von PST und STX macht es sehr wahrscheinlich, daß der Faktor Sp1 an der Transkriptionsinitiation beider Gene beteiligt ist. Der an GC-Boxen bindende Transkriptionsfaktor Sp1 ist besonders hoch in fetalen Geweben exprimiert, was mit der Expression von PSA und der PSTs korreliert. Durch den homologen Aufbau von PST- und STX-Promotor wird verständlich, daß beide Gene sowohl räumlich wie auch zeitlich parallel exprimiert werden können (s. 2.4.1 und 2.4.2). Die Differenzen in der entwicklungsabhängigen Regulation von PST und STX (s. Abb. 20) lassen sich jedoch nicht befriedigend durch die beschriebenen Promotorbestandteile, wie z.B. das Vorhandensein oder Fehlen einer singulären Sp1-Bindungsstelle, erklären.



Die besonders in postnatalen Stadien abweichende Transkriptionsregulation von PST und STX (s. Abb. 20) muß durch andere Promotor- und/oder "Enhancer"-Komponenten realisiert sein, die entweder nicht innerhalb des gezeigten Sequenzabschnitts liegen, oder durch die bislang durchgeführten Homologievergleiche nicht zu erkennen sind. Um über die basalen eukaryonten "upstream"-Promotorelemente hinaus weitere potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in den Promotoren von PST und STX zu detektieren, wurden die folgenden Analysen durchgeführt.

### **3.2.5 Potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in den 5'-Bereichen der humanen Polysialyltransferasen**

Die Untersuchungen der 5'-Sequenzen von muriner und humaner PST sowie muriner und humaner STX auf potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wurden mit folgender Software der Gesellschaft für Biologische Forschung in Braunschweig als "Online"-Abfrage durchgeführt [274],[275],[276],[277]:

TFSEARCH, Version 1.3

Database: Transfac Matrix Table, Release 3.3 (06.01.1998)

Taxonomy: Vertebrate

Threshold: 85.0 point

Die vier Sequenzen wurden einzeln auf potentielle Bindungsstellen untersucht und die erhaltenen Ergebnisse anschließend für jedes der beiden Polysialyltransferasengene zwischen den Spezies abgeglichen.

# Ergebnisse

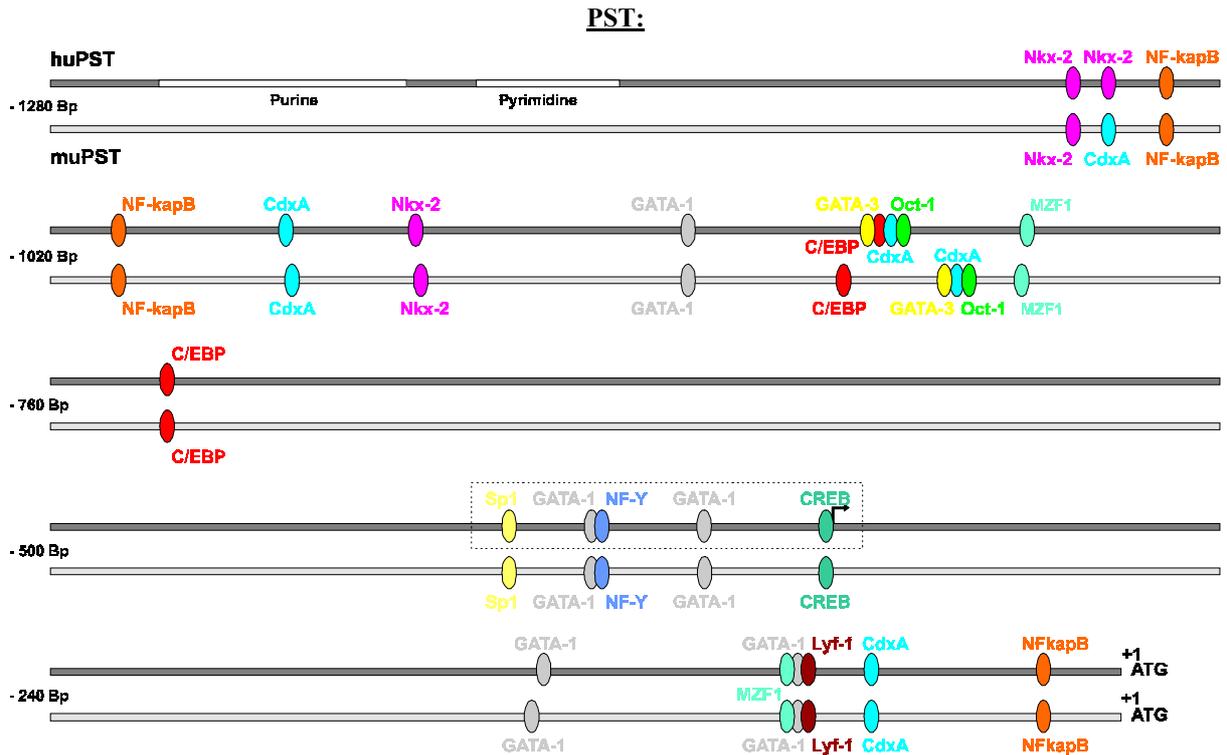


Abb. 17: Vergleich potentieller Transkriptionsfaktorbindungsstellen (Ovale) zwischen der murinen und der humanen PST. Gezeigt ist eine schematisierte Darstellung der PST-Promotorsequenz von 1280 bp stromaufwärts der Translationsinitiation bis zum Startcodon (ATG = Fett). ▴: Humane Transkriptionsstartstelle. Die Spezifität der einzelnen Faktoren ist der Beschriftung zu entnehmen, gleiche Farben symbolisieren dabei gleiche Bindungsstellen.

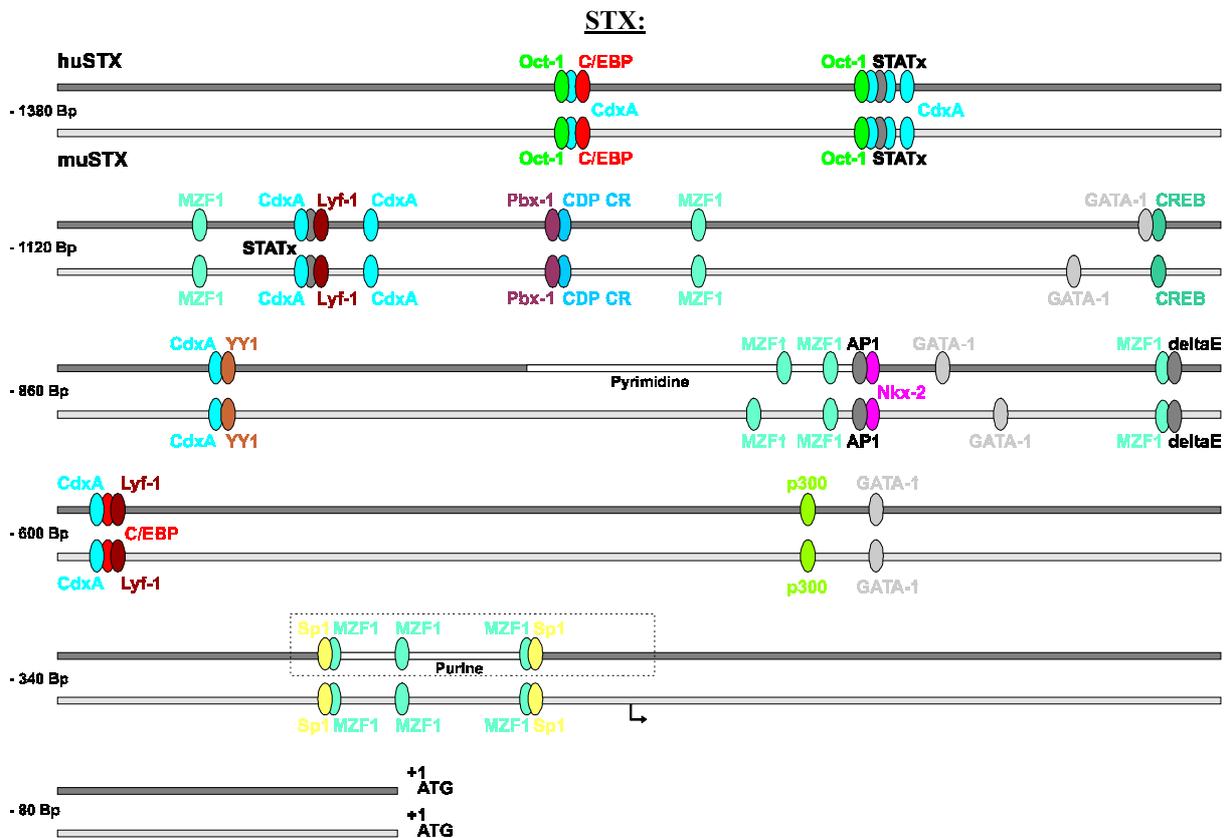


Abb. 18: Vergleich potentieller Transkriptionsfaktorbindungsstellen (Ovale) zwischen der murinen und der humanen STX. Gezeigt ist eine schematisierte Darstellung der STX-Promotorsequenz von 1380 bp stromaufwärts der Translationsinitiation bis zum Startcodon (ATG = Fett). ▴: Murine Transkriptionsstartstelle. Die Spezifität der einzelnen Faktoren ist der Beschriftung zu entnehmen, gleiche Farben symbolisieren dabei gleiche Bindungsstellen.

Im folgenden ist eine kurze Beschreibung der in Abb. 17 und Abb. 18 dargestellten potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen angegeben. Dabei wurden insbesondere Aspekte berücksichtigt, die im Hinblick auf die Regulation von PST und STX interessant erscheinen:

### **Gemeinsame potentielle Bindungsstellen innerhalb des PST und des STX-Promotors:**

#### **C/EBP** (CCAAT/enhancer binding protein, [278])

Die C/EBP-Proteine bilden eine Familie von transkriptionaler Aktivatoren aus mindestens sieben Mitgliedern. Diese Proteine besitzen drei strukturelle Komponenten, einen C-terminalen "leucine zipper", eine basische DNA-bindende Region und eine N-terminale transaktivierend Region. Durch Dimerisierung über den "leucine zipper" können Homo- und Heterodimere ausgebildet werden, die mit ihren basischen Regionen an DNA-Sequenzen in Promotor- und "Enhancer"-Elementen einer großen Bandbreite von Genen binden. Die DNA-Bindungsspezifität ist allerdings gering (C/EBP-beta), es gibt sowohl Hinweise auf Bindung von C/EBP an AP-1-Bindungsstellen, als auch auf eine mögliche Heterodimerisierung mit entweder c-Fos oder c-Jun, wobei durch diese Assoziationen das Transaktivierungspotential reprimiert wird [279]. Weiterhin sind synergistische Effekte durch eine Interaktion mit NF-kappaB1 (p50) über den "leucine zipper" beschrieben worden [280]. Die Expression von C/EBP ist häufig mit der gewebsspezifischen Expression von Genen verbunden und ist besonders prominent in Adipozyten, Hepatozyten und Monozyten/Makrophagen. C/EBP ist ein "master regulator" der Akutphasenreaktion [281] Zielgene für C/EBP sind u.a. die Akutphasenantwortgene in Leberzellen und Zytokingene in Monozyten/Makrophagen. C/EBP reguliert sowohl konstitutiv als auch durch IL-1 induziert die Transkription von IL-6.

#### **CdxA** (chicken homeobox gene, [282])

Dieser Transkriptionsaktivator wurde als Homolog des Caudal-Homöoboxgens (cad) aus *Drosophila* beschrieben. In *Xenopus laevis* sind drei Mitglieder dieser Familie bekannt. Entsprechende humane oder murine Faktoren sind bislang noch nicht kloniert worden, obwohl es Hinweise auf die Existenz der drei *Xenopus*-Homologen gibt. CdxA spielt eine Rolle bei der frühen Gastrulation des Hühnerembryos, wird aber auch in adulten Organen, wie Intestinum, Herz, Niere, Leber und Lunge gefunden.

### **CREB** (cAMP-responsive element binding protein, [283])

Eines der am besten verstandenen Beispiele von "second messenger"-regulierter Gentranskription stellt die Aktivierung von Genen durch cAMP dar. Die Stimulation von verschiedenen Hormon-, Wachstumsfaktor-, und Neurotransmitter-Rezeptoren aktiviert die Adenylat-Cyclase, die cAMP generiert. Die Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit der PKA setzt ihre katalytische Untereinheit frei, die in den Nukleus transportiert wird und dort über eine Phosphorylierung an Serin133 den Transkriptionsfaktor CREB aktiviert. CREB ist Mitglied einer großen Familie von Faktoren, die als Dimere an ein "enhancer"-Element ("cAMP-response element", CRE) binden und dort sowohl als Aktivatoren als auch als Repressoren fungieren können und ein "basische Domäne/leucine zipper"-Motiv besitzen. Durch die Phosphorylierung an Serin133 kann CREB mit dem Coaktivator CBP, der an Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie bindet, über eine "leucine zipper"-unabhängige Bindung interagieren [284],[285]. Da CBP und sein Homolog p300 Ziele einiger viral-transformierender Proteine sind, wird diesen Coaktivatoren eine bedeutendere Rolle für die zellulären Funktionen zugeschrieben. In dieses Bild paßt auch der Befund, daß verschiedene andere Transkriptionsfaktoren, wie c-jun, c-myc, MyoD, E2F1 und YY1 an CBP binden können. CREB beeinflußt als Bestandteil eines intrazellulären Signaltransduktionsweges eine große Bandbreite biologischer Prozesse, wie Spermatogenese, zirkadianen Rhythmus sowie Lern- und Gedächtnisleistungen. CREB-Expression wurde in Milz, Herz, Thymus, Gehirn, Niere und sehr schwach in Testis und Leber nachgewiesen.

### **GATA-1** [286]

Die GATA-Faktoren stellen eine Familie von Zinkfinger Proteinen dar, die entscheidend an der erythroiden Differenzierung und Hämatopoese beteiligt sind. GATA-1 ist ein regulierender Aktivator der Transkription der Globingene während der Entwicklung und Differenzierung, ist involviert in die frühe Herzentwicklung und hoch exprimiert in Megakaryozyten sowie Mastzellen. In der Regulation der Globingene aktiviert GATA-1 die Transkription synergistisch mit dem ubiquitären Zinkfingerprotein Sp1 [287]. Die Kombination von GATA-1 und Sp1-Bindungsstellen wird aber auch in den Promotoren und Enhancern einiger Nicht-Globingene gefunden und keines der Mitglieder der GATA-Familie zeigt eine ausschließliche Spezifität für erythroide Zellen. GATA-defizienten Mäusen fehlen allerdings wichtige hämatopoetische Linien erythroiden, thrombozytären, und eosinophilen Ursprungs, was die Rolle von GATA in der Programmierung der entsprechenden Vorläufer nahelegt.

### **Lyf-1** [288]

Der Faktor Lyf-1 stellt ein vom Ikarusgen (Ik-1) abgeleitete alternative Spleißvariante dar. Lyf-1 ist ein Zinkfingerprotein und wurde ursprünglich als genereller Aktivator in unreifen B- und T-Zellvorläufern beschrieben. Es konnten aber auch schon Bindungsstellen im Promotor eines gehirnspezifischen Proteins bestätigt werden. Lyf-1 gehört wahrscheinlich zur Ets-Familie von Transkriptionsfaktoren.

### **MZF1** (myeloid zinc finger protein, [289])

Der Faktor MZF1 ist ein durch Retinsäure induzierbarer bifunktionaler Transkriptionsregulator. Er reprimiert die Transkription in nicht-hämatopoetischen Zellen und wirkt aktivierend in Zellen hämatopoetischen Ursprungs [290]. Die Expression MZF1 durch humane Knochenmarkszellen ist essentiell für die Granulopoese. In HL-60 Zellen kann der MZF1-mRNA Level durch granulopoese-induzierende Substanzen wie Retinsäure und GM-CSF deutlich gesteigert werden [291].

### **Nkx-2** (homeo domain factor Nkx (Csx, Tinman-Homolog), [292])

Nkx-2.5 ist ein murines Homöobox-Gen, das hauptsächlich in Cardiozyten und ihren Vorläuferzellen exprimiert wird und eng verwandt ist mit dem in Drosophila entscheidend an der Herzformierung beteiligten Tinman-Protein. Homologe Homöodomänen-Faktoren von Nkx im Haushuhn werden vor allem in frühen Stadien der Embryogenese exprimiert. Andere Mitglieder der Nkx-Familie spielen eine Rolle bei der Entwicklung des murinen Vorderhirns, indem sie die longitudinale Organisation der anterioren Neuralplatte und des Neuralrohrs beeinflussen und sind involviert in die Regulation der Myogenese. Nkx-2 ist als moderater Transaktivator hoch exprimiert in fetalem und adultem Herz, niedrig in adulter Milz, fetalem, neonatalem oder adultem Gehirn, fetaler Leber, adultem Knochenmark, Niere, Leber, Lunge, Lymphknoten, Ovar, Skelettmuskel, Testis, Thymus und Uterus. Nkx-2.5 wirkt als akzessorischer Faktor des "serum response factor" (SRF) stark aktivierend auf die Transkriptionsinitiation des  $\alpha$ -Actinpromotors in murinen Cardiozyten. Dieser Synergismus zwischen Nkx-2.5 und SRF kann durch den Faktor YY1 negativ beeinflusst werden [293].

### **Oct-1** (octamer-binding factor 1, [294])

Oct-1 und Oct-2 gehören zu den Transkriptionsfaktoren mit POU-Domäne und rekrutieren im Zuge ihrer DNA-Bindung den Coaktivator OBF-1 in den Transkriptionsinitiationskomplex der Promotoren verschiedener Gene. Oct-1 ist ein ubiquitärer Transkriptionsfaktor, der bislang

in allen untersuchten Zellen nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu ist Oct-2 auf die Steuerung der Immunglobulingene in B-Lymphozyten restringiert. Oct-1 interagiert direkt mit dem generellen Transkriptionsfaktor TFIIB und zwischen Oct-1 und Sp1 sind kooperative Effekte beschrieben worden. Diese Transkriptionsregulatoren können reprimierend oder aktivierend wirken und ihre DNA-Bindungsaktivität und ihr transagierendes Potential werden durch eine reversible Phosphorylierung kontrolliert. Für Oct-1 konnte weiterhin eine Beteiligung an der Kontrolle der DNA-Replikation beschrieben werden. Nah verwandte oktamer-bindende Proteine wurden in murinen Gesamtgehirn-extrakten nachgewiesen und es konnte gezeigt werden, daß der Effekt von NGF (nerve growth factor) auf sensorische Neurone z.T. über oktamer-bindende Proteine vermittelt wird. Weiterhin kommen octamer-ähnliche Motive im GnRH-Gen vor, das exklusiv von einer bestimmten Neuronenpopulation des Hypothalamus exprimiert wird.

### **Sp1** (stimulating protein 1, [295])

Das Zinkfingerprotein Sp1 wurde als einer der ersten zellulären Transkriptionsfaktoren identifiziert. Seine Isolierung und Klonierung erfolgte durch die Analyse des frühen SV40-Promotors. Das Sp1-Protein bindet an ein G-reiches Erkennungsmotiv (GC-Box), daß eines der drei basalen "upstream"-Elemente eukaryontischer und viraler Promotoren darstellt und stimuliert ihre transkriptionale Aktivität. Sp1 kann durch eine DNA-abhängige Proteinkinase an Serin- und Threoninseitenketten phosphoryliert, aber auch durch N-Acetylglucosamin modifiziert werden. Die Multimerisierung des Proteins führt zu einer Superaktivierung. Sp1 kann weiterhin mit zahlreichen anderen Faktoren wechselwirken (u.a. mit Oct-1 und NF-kapB) und kooperiert synergistisch mit E2F.

### **Exklusive potentielle Bindungsstellen im PST-Promotor:**

#### **GATA-3** (GATA-binding factor 3, [286])

Das humane enhancer-bindende Protein GATA-3 gehört wie GATA-1 in die Familie von Zinkfingerproteinen, in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden. Diese Faktoren sind notwendig für erythroide und megakaryozytäre Linien (GATA-1), für T-lymphoide Linien (GATA-3) und für die Proliferation von undifferenzierten hämatopoetischen Vorläufern (GATA-2). GATA-3 ist entscheidend involviert in die Differenzierung von T-Lymphozyten, wird aber auch in einer Reihe weiterer embryonaler Huhn- und Mausgewebe sowie in der sich entwickelnden humanen Niere, Neuroblastom-Zelllinien und dem embryonalen zentralen

Nervensystem exprimiert. GATA-3 kontrollierte Gene sind durch Retinsäure induzierbar.

### **NF-Y** (CCAAT Box-Binding Protein; Maushomolog zum humanen CBF, [296])

Der Faktor NF-Y gehört zur großen Familie der CCAAT-Box bindenden Proteine, die einen positiven Einfluß auf die Transkription nehmen. NF-Y (CBF) besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten und interagiert spezifisch mit dem CCAAT-Motiv. In jeder NF-Y-Untereinheit sind die für die Formierung des NF-Y/DNA-Komplexes notwendigen Bereiche von den NF-Y-homologen Proteinen der Hefe bis zum humanen CBF evolutionär konserviert. Diese konservierten Bereiche zeigen in zwei der CBF-Untereinheiten, CBF-A und CBF-C, eine hohe Homologie zum Faltungsmotiv eukaryontischer Histone. Die Histonfaltungsmotive von CBF-A und CBF-C interagieren miteinander und führen zur Ausprägung eines Heterodimers. Durch Wechselwirkung mit CBF-B entsteht das heterotrimere CBF-Molekül, das spezifisch an sein DNA-Erkennungsmotiv bindet.

### **NF-kapB** (nuclear factor kappa B, [297])

Einer der Transkriptionsfaktoren, der durch oxidativen Streß aktiviert werden kann ist NF-kapB. Ursprünglich wurde diesem Faktor eine Hauptrolle in der Aktivierung von Genen zugeschrieben, die an Immunantwort und Entzündung beteiligt sind. Mittlerweile ist deutlich, daß gleichfalls eine enge Korrelation zwischen der Aktivierung von NF-kapB und neuropathologischen und neurodegenerativen Prozessen sowie neuronalem Zelltod besteht.

Die Aktivierung von NF-kapB spielt eine Rolle im apoptotischen Geschehen, wobei der Faktor abhängig vom Zelltyp in dem er exprimiert wird, entweder anti-apoptotische oder pro-apoptotische Wirkung entfalten kann. Die gut untersuchte Rel/NF-kapB-Familie umfaßt eine Reihe von strukturell verwandten Vertebraten-Transkriptionsfaktoren (p50, p52, RelA, RelB, c-Rel), die als Dimere DNA binden und deren Aktivität durch ihre subzelluläre Lokalisation reguliert sind. Alle Rel-Proteine enthalten die hoch konservierte "Rel homology"-Domäne (RH), die alle für die Homo- oder Heterodimerisierung, die nukleäre Lokalisation, die DNA-Bindung und die Bindung von IkappaB Sequenzabschnitte enthält. Die inhibitorischen, ankyrin-reichen IkappaB-Proteine interagieren mit den Rel-Dimeren und regulieren die Aktivität des eukaryontischen NF-kapB-Transkriptionsfaktorkomplexes durch Modulation seiner cytoplasmatische Retention. Die Rel-Domäne von NF-kapB interagiert mit den "leucine zipper"-Strukturen von c-Fos, c-Jun [298] und C/EBP-beta [299] und möglicherweise auch mit der Zinkfingerdomäne von Sp1 [300] wobei alle genannten Interaktionen zu synergistischen Effekten in der Transaktivierung durch NF-kapB führen können.

### Exklusive potentielle Bindungsstellen im STX-Promotor:

#### **p300** [301]

Der Faktor p300 und sein Homolog, das CREB binding protein (CBP), sind große nukleäre Moleküle, die verschiedene Regulationssysteme der Transkription mit der Remodulierung des Chromatins koordinieren. Sie haben alle Charakteristika transkriptionaler Adapter und interagieren sowohl mit transkriptionalen Aktivatoren als auch mit Repressoren, sind beteiligt an der direkten chromatin-vermittelten Transkription und nehmen Einfluß auf die terminale Differenzierung verschiedener Gewebetypen. Diese Proteine gehören zu der Klasse der nicht-DNA-bindenden transkriptionalen Coaktivatoren (p300 besitzt im Kontrast zu CBP eine intrinsische DNA-Bindungskapazität [301]) deren Funktion primär als "bridging"-Proteine zwischen DNA-gebundenen Transkriptionsfaktoren und dem basalen Transkriptionskomplex zu sehen ist. p300 interagiert mit durch die PKA an Serin133 phosphoryliertem CREB, bindet an die N-terminal Region von E1A, und kann den Eintritt von ruhenden Zellen in die S-Phase induzieren [302]. Die Rolle dieser Proteine in einigen onkogenetischen Prozessen und anderen schwerwiegenden humanen Erkrankungen legt nahe, daß p300 und CBP Tumorsuppressorproteine mit essentiellen Funktionen in Zellzykluskontrolle, zellulärer Differenzierung und humaner Entwicklung darstellen.

#### **deltaE** (delta-crystallin enhancer-binding protein, [303])

Das Zinkfinger/Homöodomäne-Protein deltaEF1 ist ein kompetitiver Repressor der E2-Box-vermittelten Genaktivierung und involviert in embryonale Postgastrulationsperioden mesodermaler Gewebe. Das E2 Box-Element (CACCTG) ist eine Bindungsstelle verschiedener "basic helix-loop-helix"-Aktivatoren. Im Verlauf der Embryogenese ist delta EF1 am stärksten im Myotom exprimiert, weshalb eine Beteiligung des Faktors an der Regulation der embryonalen Myogenese durch Modulation der Aktivität von Proteinen der MyoD-Familie angenommen wird. Neben dem Mesoderm wird delta EF1 im Nervensystem und in der Linse exprimiert, aber nur sehr schwach in ektodermalen Geweben und im Endoderm.

#### **CDP CR** (cut-like homeodomain protein, CCAAT displacement protein, [304])

Der reprimierende [305] Faktor CDP, ein Homolog des cut-Proteins in Drosophila, ist ein ubiquitäres Homöoprotein und reguliert verschiedene entwicklungsabhängige Systeme. Das Protein enthält vier unabhängige DNA-bindende Domänen: Drei "cut repeats" und die

Homöodomäne. Es wird angenommen, daß die unterschiedlichen DNA-Bindungsdomänen von CDP für die Regulation von unterschiedlichen Genen in diversen Geweben im Verlauf der Entwicklung verantwortlich sind. CDP ist aktiv in undifferenzierten, aber inaktiv in ausdifferenzierten Zellen. Eine der spezifischen DNA-Bindungsvarianten betrifft die CCAAT-Box, an der CDP die Mitglieder der großen Familie von CCAAT-Box-bindenden Proteinen ersetzen und auf diesem Weg seine reprimierende Wirkung entfalten kann. Ein vergleichbarer Mechanismus ist auch für die Interaktion von CDP und Sp1-Bindungsstellen beschrieben worden [306].

### **YY1** (Yin und Yang 1, [307])

YY1 ist ein multifunktionaler Transkriptionsregulator aus der GLI-Familie von Zinkfingerproteinen. Der Faktor kann als Aktivator oder Repressor wirken und bindet an die Transkriptionsinitiationsstelle. Seine reprimierende Funktion wird durch die Interaktion mit E1A unterstützt. YY1 wirkt durch eine Konkurrenz um die Bindungsstelle antagonistisch zu SRF, interagiert weiterhin mit CBP und wird durch die Bindung an das c-Myc Onkoprotein in seiner Aktivität inhibiert.

### **STATx** (signal transducers and activators of transcription, [308])

Die STAT-Familie besteht aus latenten cytosolischen Proteinen mit einem "leucine zipper"-ähnlichen Motiv, die nach Aktivierung durch an der Zelloberfläche gebundene Polypeptidliganden in den Nukleus translozieren, um dort Transkriptionsereignisse zu dirigieren. Diese Proteine vereinen die Funktionen von Signaltransduktionsmodulen und Transkriptionsregulatoren und ihre Aktivität wird durch eine enorme Bandbreite von Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinflusst. Seit der Entdeckung ihrer physiologischen Rolle in der Verarbeitung von Zytokinsignalen haben die STATs zunehmend Aufmerksamkeit auf sich gezogen, bis zu dem Punkt der Entwicklung eines Konzepts für einen neuen intrazellulären Signaltransduktionsweg, genannt JAK/STAT-"Pathway". Dieser Weg, der eine sehr schnelle Transduktion eines extrazellulären Signals in den Nukleus erlaubt, beinhaltet die ligandabhängige Aktivierung einer speziellen Klasse von Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen, den JAK-Proteinen (Janus-Kinasen), die sich selbst ebenso wie Rezeptorkomponenten phosphorylieren, um Rekrutierungsstellen für die STAT-Transkriptionsfaktoren zu kreieren. Die STATs werden phosphoryliert, dissoziieren vom Rezeptor/JAK-Komplex, dimerisieren und translozieren in den Nukleus, wo sie die Expression ihrer Zielgene durch Bindung an "enhancer"-Elemente modulieren. Obwohl dieser Weg ursprünglich anhand der Aktivierung

durch Interferone [309] aufgedeckt wurde ist mittlerweile deutlich, daß eine Große Zahl von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und hormonellen Faktoren [310] JAK- und/oder STAT-Proteine aktivieren kann.

### **AP-1** (activator protein 1, [311],[312])

Die Bezeichnung AP-1 stellt einen Sammelbegriff dar, der dimere Formen aus Untereinheiten der Transkriptionsfaktorfamilien Jun und Fos beschreibt. Es kommen Kombinationen aus zwei Jun-Peptiden oder einem Jun- und einem Fos-Peptid (oder Homologen) vor, die an ein gemeinsames DNA-Motiv binden. Unterschiedlich zusammengesetzte AP-1-Faktoren besitzen unterschiedliche biologische Funktionen und regulieren unterschiedliche Zielgene. Die Aktivität von AP-1 wird zusätzlich durch Interaktionen mit spezifischen Proteinkinasen und einer großen Bandbreite transkriptionaler Coaktivatoren reguliert. AP-1 (Fos/Jun) Transkriptionsfaktoren spielen vielfältige Rollen in der Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen zu den entsprechenden funktionellen Zellen des Blutes. Dazu gehören die Monozyten/Makrophagen-Linie, die Mastzelllinie, granulozytäre, megakaryozytäre, und erythroide Linien. Weiterhin mehren sich die Hinweise auf eine Rolle von AP-1 (Fos/Jun) Transkriptionsfaktorkomplexen als positive und negative Modulatoren verschiedener Apoptosesysteme. Fos/Jun sind als positive Modulatoren in die Apoptoseinduktion in hämatopoetischen Vorläufern der myeloiden Linie involviert. Andererseits entfaltet AP-1 in der durch DNA-schädigende Agenzien induzierten Apoptose protektive Wirkungen. AP-1 Transkriptionsfaktoren werden weiterhin während der neuronalen Antwort auf Verletzungen des Gehirns induziert. Abhängig von der AP-1-Dimerenkombination werden neuronale Gene transkribiert, die entweder positiv oder negativ auf das apoptotische Geschehen wirken. Ein 35 kDa Fos-Homolog/JunD-Dimer wird in Neuronen exprimiert, die die Verletzung überleben. Dagegen existiert in apoptotischen Neuronen ein Jun/JunD-Dimer.

### **Pbx-1** [313]

Pbx-1 ist ein breit exprimiertes humanes Homöoboxgen dessen Produkt eine abgewandelte Form der Homöodomäne enthält und Homologien zu dem Drosophila-Protein Exd und dem Hefeprotein MATa1 aufweist. Es stellt einen Cofaktor für viele andere Homöodomänen-Proteine dar [314]. In der akut lymphoblastischen Leukämie wird die Transaktivierungsdomäne des E2A-Gens durch eine t(1;19) Translokation mit der Homöobox von PBX-1 fusioniert [315]. Das resultierende chimäre Protein E2A-Pbx-1 wirkt als starker transkriptionaler Aktivator, induziert eine verstärkte Proliferationsrate und blockiert die normale

Zelldifferenzierung. Sowohl Pbx-1 als auch E2A-Pbx-1 binden ihr DNA-Motiv in einem kooperativen Mechanismus mit den Produkten vieler muriner Hox-Gene, von denen einige selbst als Onkogene bezeichnet werden.

### 3.3 Reporterassays zur Charakterisierung der Minimalpromotoren von PST und STX

Nach der Charakterisierung potentieller Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in den 5'-flankierenden Regionen der beiden humanen Polysialyltransferasengene wurden die minimalen funktionellen Einheiten von PST und STX, die das Potential zur Expression eines Reportergens besaßen durch Deletionsanalysen bestimmt. Zur Überprüfung, ob Faktoren, die potentiell direkt "upstream" des jeweiligen Transkriptionsstarts binden (s. 3.2.5), tatsächlich Einfluß auf die Initiation der Transkription der Gene nehmen, wurden die entsprechenden Sequenzabschnitte mittels PCR (Primer s. Abb. 19 und 5.1.6) amplifiziert und über HindIII/EcoRI-Schnittstellen gerichtet in einen geeigneten Testvektor kloniert. Die Reporterassays wurden mit dem Great EscAPe™ SEAP Reporter System2-Kit der Firma Clontech durchgeführt (s. 5.2.3.19). Dieses System verwendet als Reportergen für die Analyse eukaryontischer Promotorelemente eine sekretierte Form der humanen alkalischen Phosphatase aus der Plazenta (SEAP: secreted form of human placental alkaline phosphatase) [316],[317]. Durch den Einsatz des Chemilumineszenzsubstrats CSPD konnte die Aktivität potentieller Promotorfragmente in einem einfachen Test mit dem Überstand transient-transfizierter Zellen analysiert werden. Die Abb. 19 gibt einen Überblick über die getesteten Konstrukte. Es wurden für jedes Gen zwei Fragmente mit unterschiedlicher Länge auf Promotoraktivität getestet. Das Promotorfragment pSEAP-Enh.PST1 umfaßt einen 439 bp langen Bereich "upstream" des ATG-Startcodons und enthält neben dem Transkriptionsstart auch potentielle Bindungsstellen für die Faktoren SP1, GATA-1 (2x), NF-Y und CREB (s. 3.2.5 und Abb. 17). Diese Bindungsmotive, wie auch der Transkriptionsstart waren im Fragment pSEAP-Enh.PST2, das einen Bereich von 313 bp umspannt, deletiert. Bei den zur Bestimmung des STX-Minimalpromotors hergestellten Konstrukten wurde eine vergleichbare Vorgehensweise gewählt. Das Promotorfragment pSEAP-Enh.STX1 umfaßt einen 351 bp langen Bereich 5'-wärts des ATG-Startcodons und enthält neben dem Transkriptionsstart auch potentielle Bindungsstellen für die Faktoren SP1 (2x) und MZF1 (3x) (s. 3.2.5 und Abb. 18). Im Fragment pSEAP-Enh.STX2, das einen Bereich von 130 bp umspannt, sind diese

## Ergebnisse

Bindungsmotive und der vermeintliche Transkriptionsstart aufgrund der Verkürzung des Fragmentes deletiert. Die dargestellten Konstrukte wurden parallel transient in die folgenden Zelllinien (5.1.3) transfiziert:

Zelllinie	Herkunft	PST-Expression	STX-Expression	PSA-Expression
IMR-32	Neuroblastom	++++	+++	+++
SH-SY5Y	Neuroblastom	++	+++++	++
KG-1a <sup>+</sup>	myeloische Leukämie	++	–	++
HeLa-229	Zervixkarzinom	–	–	–

Die Zelllinien waren vor der Transfektion auf die Expression PSA und die Anwesenheit von PST- und STX-mRNA getestet (s. Abb. 24 und Abb. 25) und aufgrund ihrer unterschiedlichen endogenen Expressionslevel der PSTs für die Promotoraktivitätstests ausgewählt worden.

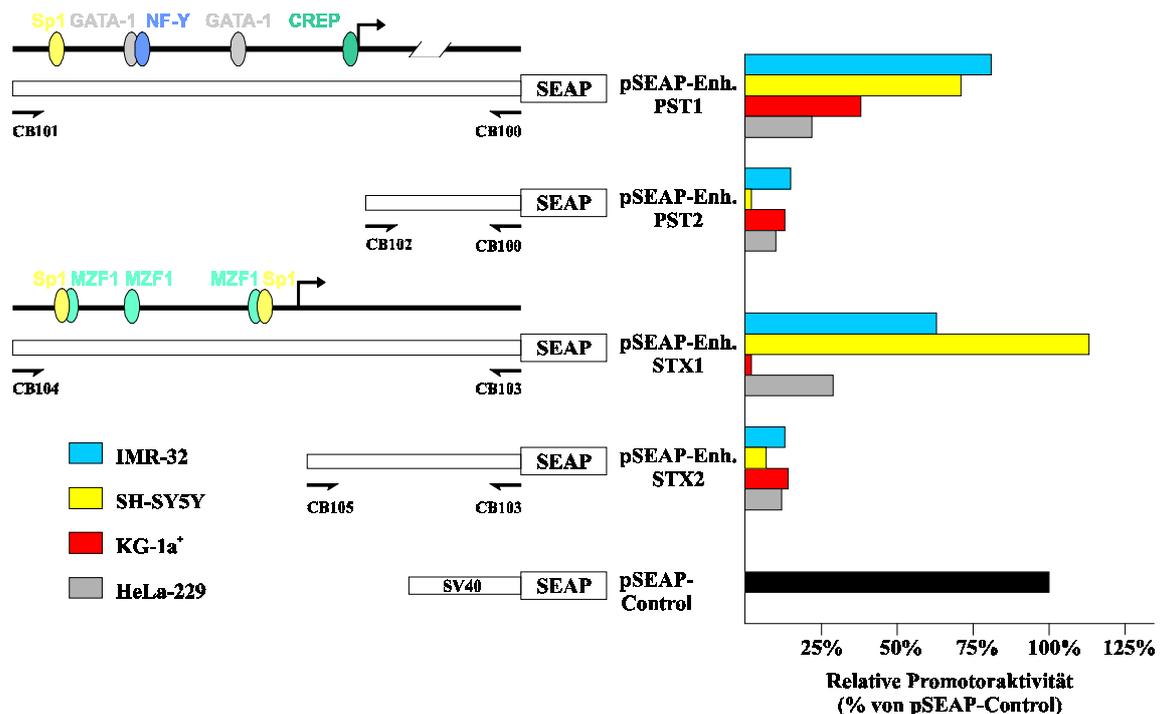


Abb. 19: Reportergenaktivität der Minimalpromotoren von PST und STX in verschiedenen humanen Zelllinien. Die Promotor/SEAP-Genkonstrukte sind auf der linken Seite dargestellt. Darüber befindet sich jeweils eine schematische Darstellung der potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen in dem jeweiligen Konstrukt (vergleiche auch Abb. 17 u. Abb. 18, gestrichelte Rechtecke).  $\nabla$ : Transkriptionsstartstellen.  $\blacktriangleright$ : Primerbindungsstellen für die PCR-Primer (CB100 – CB105), die für die Amplifikation des jeweiligen Fragmentes eingesetzt wurden. Die alkalische Phosphatase-Aktivität wurde 72 h nach transienter Transfektion aus dem Zellkulturmediumüberstand bestimmt und über die Expressionsrate des SV40-Promotorkonstruktes (pSEAP-Control) und des promotorlosen Vektors pSEAP-Enhancer (Negativkontrolle, s. 5.2.3.19) normalisiert. Die Resultate sind als prozentuale Werte der SV40-Promotoraktivität (= 100%) im Balkendiagramm auf der rechten Seite dargestellt und repräsentieren das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten, von denen jedes mit Dreifach-Werten durchgeführt wurde.

### Promotoraktivität der PST-Fragmente:

Alle getesteten PSA-positiven Zellen, die mit dem Konstrukt pSEAP-Enh.PST1 transfiziert wurden, zeigten eine signifikante Promotoraktivität, die mit 81% der SV40-Aktivität in der Neuroblastomlinie IMR-32 am höchsten war. Gegenüber der PSA-negativen Linie HeLa-229 (22%) war die Aktivität in IMR-32-Zellen um das 3.7-fache, in SH-SY5Y-Zellen um das 3.2-fache und in KG-1a<sup>+</sup>-Zellen noch um den Faktor 1.7 erhöht. Im Vergleich zum promotorlosen Konstrukt pSEAP-Enh.PST2 konnte in IMR-32-Zellen eine 5.4-fache, in der Linie SH-SY5Y eine 35-fache und in KG-1a<sup>+</sup>-Zellen eine 2.9-fache Induktion der Aktivität beobachtet werden. In der PSA-negativen Linie HeLa-229 lag die Induktionsrate bei 2.2.

### Promotoraktivität der STX-Fragmente:

Das Konstrukt pSEAP-Enh.STX1 zeigt mit 113% der SV40-Aktivität die höchste Aktivität in den SH-SY5Y-Zellen, welche in Übereinstimmung mit diesem Befund hohe endogene STX-Level exprimieren (s. Abb. 24 und Abb. 25). Verglichen mit der Aktivität in PSA-negativen HeLa-229-Zellen (29%) ergab sich für pSEAP-Enh.STX1 in der Linie IMR-32 eine 2.2-fache und in SH-SY5Y-Zellen eine 3.9-fache Induktion. In KG-1a<sup>+</sup>-Zellen, die wie auch die Linie HeLa-229 sowohl in Northern Blot- als auch in RT-PCR-Analysen als STX-negativ befundet wurden (s. Abb. 24 und Abb. 25), konnte keine Induktion der Promotoraktivität beobachtet werden. Im Vergleich zu der Aktivität des Konstruktes pSEAP-Enh.STX2, in dem potentielle Sp1/MZF1-Bindungsmotive und der Transkriptionsstart deletiert sind, ergab sich für pSEAP-Enh.STX1 in IMR-32-Zellen eine 4.9-fache und in SH-SY5Y-Zellen eine 16-fache Induktion der Aktivität. In der PSA-negativen Linie HeLa-229 lag die Induktionsrate bei 2.4. In den STX-negativen KG-1a<sup>+</sup>-Zellen war die Aktivität des pSEAP-Enh.STX2-Konstruktes höher als die des Konstruktes pSEAP-Enh.STX1.

Die Ergebnisse der Reporterassays demonstrierten, daß für die humane PST ein Fragment von 439 bp "upstream" des ATG-Initiationscodons ausreichend für die Promotoraktivität in den getesteten Zelllinien war, die endogen PST exprimieren und somit als Minimalpromotor aufgefaßt werden kann. Da eine Verkürzung dieses Fragments um 126 Basenpaare in 3'-Richtung (pSEAP-Enh.PST2) mit einer drastischen Abnahme der Reporterexpression verbunden war, konnte gefolgert werden, daß der Bereich zwischen nt -439 und nt -313 an der zelltypspezifischen Kontrolle der Transkription essentiell beteiligt ist. In dem genannten Abschnitt fanden sich potentielle Bindungssequenzen für die Transkriptionsfaktoren SP1, GATA-1 (2x), NF-Y und CREB (s. 3.2.5 und Abb. 17), was eine Rolle eines oder mehrerer

dieser Faktoren, möglicherweise über einen kooperativen Mechanismus, in der Kontrolle des Promotors aufzeigte.

Im Fall der STX war ein Minimalpromotorfragment, das sich vom ATG-Startcodon 351 bp nach 5'-wärts erstreckte ausreichend für die Reportergenexpression. Eine Verkürzung um 221 bp führte in allen endogen STX-exprimierenden Linien zu einer drastischen Reduktion des Chemilumineszenzsignals, so daß eine Beteiligung der in dem deletierten Abschnitt potentiell bindenden Faktoren SP1 (2x) und MZF1 (3x) (s. 3.2.5 und Abb. 18) an der Transkriptionskontrolle angenommen werden muß.

### 3.4 Die Expression der eukaryonten PSTs

Ein entscheidender Durchbruch in dem Versuch die Regulation der PSA-Expression aufzuklären, war die Klonierung (s. 2.4.1) der beiden Polysialyltransferasen PST und STX. Aus mehreren unabhängigen Studien der mRNA-Expressionsmuster beider Enzyme konnte gefolgert werden, daß die PSA-Biosynthese durch die Modulation der Transkriptionsrate der PSTs reguliert ist (s. 2.4.2). Eine Zielsetzung (s. 2.6) innerhalb dieser Arbeit war die Untersuchung der Funktionen der PSTs in onkogener Transformation und Filiarisierung. Einige wenig differenzierte Tumorarten mit hohem Metastasierungspotential und ungünstiger Prognose reexprimieren polysialylierte NCAM-Formen (s. 2.3.4). In der innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Studie wurden initiale Daten zu den Expressionsmustern von PST und STX in verschiedenen humanen Tumorzelllinien (s. 3.4.2 u. Tab. 1) und soliden humanen Tumoren, vornehmlich dem Neuroblastom (s. 3.4.3.1), mit Hilfe von Northern Blot-Analysen und reverser Transkriptions-PCR erhoben und mit dem Grad der PSA-Immunreaktivität korreliert.

Zur vergleichenden Beurteilung Expression der PSTs in den hochmalignen Tumoren vor dem physiologischen Hintergrund der Situation in Normalgeweben und zum besseren Verständnis der dynamischen Regulation der PSA-Expression während der Ontogenese wurden die Expressionslevel von PST- und STX-mRNA im Verlauf der postnatalen Entwicklung des Rattengehirns und in verschiedenen humanen Normalgeweben mit Hilfe von Northern Blot- und RT-PCR-Analysen und z.T. auch *in situ*-Hybridisierungsexperimenten untersucht.

### 3.4.1 Die Expression der PSTs im Verlauf der fetalen und postnatalen Gehirnentwicklung

#### 3.4.1.1 Northern Blots von Gesamtgehirn

Die Gesamt-RNA aus verschiedenen postnatalen Stadien des Rattenhirns (s. 5.1.1) wurde durch eine Guanidiniumisothiocyanat-Extraktion mit anschließender Ultradichtegradienten-Zentrifugation durch einen Cäsiumchloridgradienten isoliert (s. 5.2.3.15.2). Im Anschluß wurde PolyA<sup>+</sup>-RNA über Oligotex<sup>TM</sup>-Säulen doppelt aufgereinigt (s. 5.2.3.15.3) und je 1 µg der hoch reinen PolyA<sup>+</sup>-RNA auf einem Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 5.2.3.3.2). Nach dem Transfer der RNA auf eine Nylonmembran (s. 5.2.3.17.1) und der UV-Fixierung erfolgte die Hybridisierung der Blots mit digoxigenin-markierten Riboprobes abgeleitet von PST und STX über Nacht bei 65°C in High-SDS-Puffer (s. 5.2.3.17). Die Filter wurden zweimal in 0.1 x SSC/0.1% SDS gewaschen (s. 5.2.3.17) und die gebundenen Proben durch einen Chemilumineszenznachweis (s.5.2.3.18.2) visualisiert.

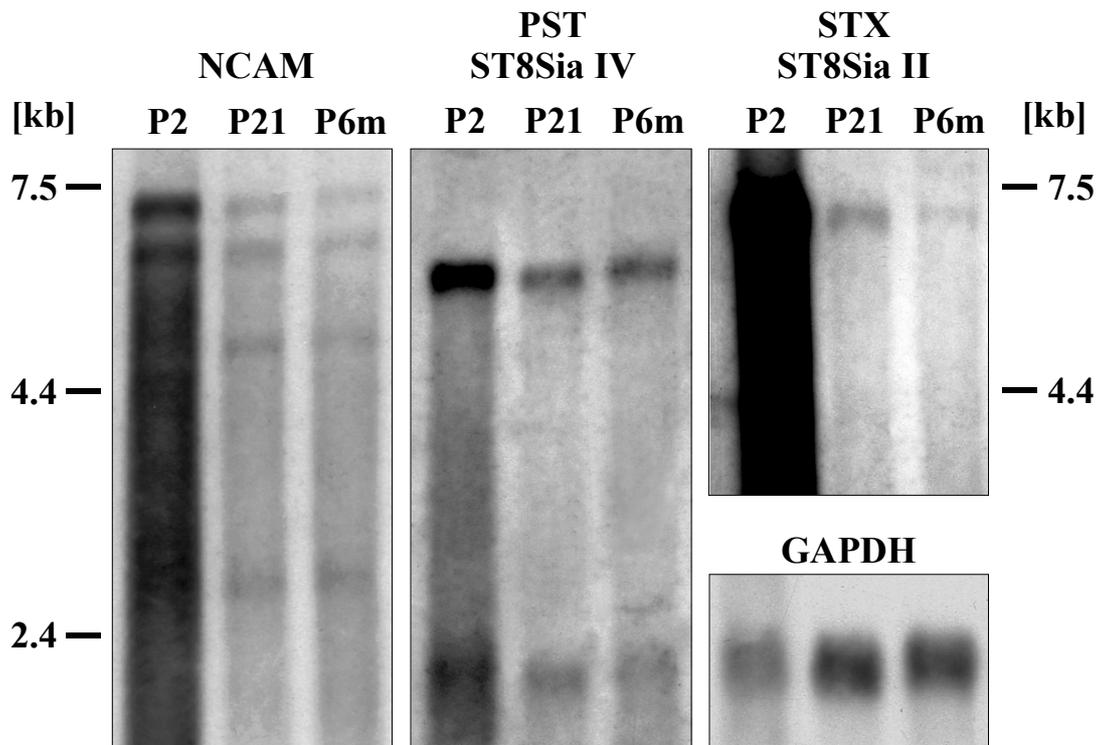


Abb. 20: Northern Blots zur Bestimmung der Expressionslevel von PST, STX und NCAM im Verlauf der postnatalen Entwicklung des Rattenhirns. Je 1 µg PolyA<sup>+</sup>-RNA jeder Entwicklungsstufe wurden für die Expressionsanalyse mit PST- und STX-spezifischen Sonden parallel hybridisiert. Nach dem "Strippen" (s. 5.2.3.17.4) der Filter wurde eine Rehybridisierung des PST-Blots mit einer Probe, die alle NCAM-Isoformen (s. Abb. 2) erkennt und des STX-Blots mit einer Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Sonde (GAPDH) zur Normalisierung der aufgetragenen RNA-Mengen durchgeführt. Die seitlichen Beschriftungen bezeichnen die Fragmentlängen des RNA-Markers in Kilobasen (kb), dabei ist die Größe des GAPDH-Signals (1.4 kb) nicht mit der Markerskala vergleichbar.

## Ergebnisse

Die Abb. 20 zeigt Northern Blot-Analysen mit PolyA<sup>+</sup>-RNA aus Gesamtgehirn von postnatalen Ratten der Altersstufen P2 (Postnatal Tag 2), P21 (Postnatal Tag 21) und P6m (6 Monate, entspricht geschlechtsreifen, adulten Tieren):

Die NCAM-Sonde detektiert ein bekanntes Hybridisierungsmuster mit Banden bei 7.4, 6.7, 5.2 und 2.9 kb. [318],[319]. Die Intensität der Banden ist vom Stadium P2 zum Stadium P21 deutlich reduziert, bleibt aber dann bis zum Zeitpunkt P6m nahezu konstant. Ein sehr ähnlicher zeitlicher Verlauf konnte für die Expression der PST-mRNA beobachtet werden. Es treten zwei Banden bei 5.8 und 2.0 kb auf, deren Stärke vom Zeitpunkt P2 zur Entwicklungsstufe P21 deutlich abnimmt, im weiteren Verlauf bis zum adulten Stadium P6m aber nur geringe Veränderungen zeigt. Dramatische entwicklungsabhängige Veränderungen zeigen sich in der Expressionshöhe der STX-mRNA. Ein ausgeprägter, breiter Schmier, der eine sehr hohe Expression zum Zeitpunkt P2 anzeigt, löst sich im Stadium P21 zu einer singulären Bande von 6.8 kb auf. In der Entwicklungsstufe P6m ist das STX-Signal dann nur noch sehr schwach nachweisbar.

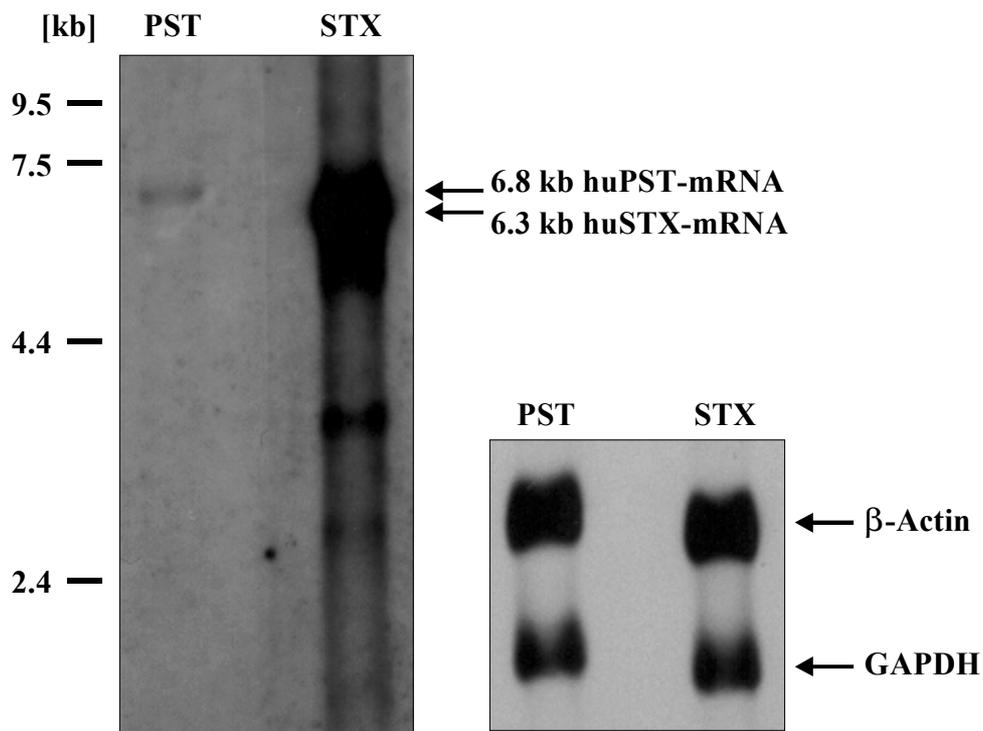


Abb. 21: Northern Blot für PST und STX in humanem fetalem Gesamtgehirn. Die PolyA<sup>+</sup>-RNA wurde von der Firma Clontech bezogen (s. 5.1.12) und repräsentiert einen "Pool" von 24 spontanen Aborten zwischen der 16. und 32. Woche der fetalen Entwicklung. Je 500 ng dieser RNA wurden mit PST- und STX-spezifischen Sonden parallel hybridisiert. Nach dem "Strippen" (s. 5.2.3.17.4) der Filter wurden Rehybridisierungen mit Proben für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH; 1.4 kb) und das humane β-Actin (1.1 kb) zur Normalisierung der aufgetragenen RNA-Mengen durchgeführt. Die Beschriftungen an der linken Seite gibt die Fragmentlängen des RNA-Markers in Kilobasen (kb) an, bezieht sich aber nicht auf die Normalisierungskontrollen.

Die Northern Blot-Analysen demonstrieren eindeutig, daß die Konzentration der STX-mRNA im perinatalen Gehirn die Konzentration der PST-mRNA um ein Mehrfaches übersteigt, während die PST im adulten Rattenhirn dominiert. Es zeigte sich ein substantieller Rückgang der STX von einer extrem hohen Expressionsrate am postnatalen Tag 2 zu nahezu nicht nachweisbaren Leveln im Alter von 6 Monaten. Im Gegensatz dazu wurde für die PST im gleichen Zeitfenster eine wesentlich geringere Abnahme der Expression beobachtet. Die PST ist demnach die vorherrschende Polysialyltransferase im differenzierten, adulten Gehirn. Die Ergebnisse der Northern Blot-Analysen konnten in Zusammenarbeit mit Dr. Herbert Hildebrandt von der Universität Stuttgart Hohenheim, durch *in situ*-Hybridisierungsstudien an ausgewählten Gehirnregionen der Zeitpunkte P2, P11 und P21 bestätigt werden [247]. Diese Studien bewiesen eine drastischen Abnahme der STX-mRNA-Expression im Isocortex, dem Hippocampus, und dem Cerebellum (Ergebnisse nicht dargestellt). Weiterhin konnte die STX-Expression zu keinem Zeitpunkt in der subependymalen Zone und den Schichten des *Bulbus olfaktorius* nachgewiesen werden. Eine persistierende PST-Expression konnte dagegen in der subependymalen Zone, den glomerulären Schichten des *Bulbus olfaktorius* und den Körnerzellschichten des *Gyrus dentatus* gezeigt werden [247].

Ergänzend und in Übereinstimmung mit den Northern Blot-Befunden zur PSTs-Expression in postnatalen Rattenhirnstadien konnten auch in humanem fetalem Gesamtgehirn stark unterschiedliche Expressionshöhen von PST- und STX-mRNA im Northern Blot detektiert werden. In Abb. 21 wird deutlich, daß bereits in späteren fetalen Stadien der Entwicklung die STX-mRNA wesentlich höher exprimiert wird, als die PST-mRNA. Dieses Ergebnis bestätigt die These, daß die STX die vorherrschende Polysialyltransferase in fetalen und perinatalen Stadien des Gehirns ist und zeigt, daß die Transkription der beiden PSTs-Gene unterschiedlichen Regulationssystemen unterworfen ist. Weitere Details der Kooperationsarbeit mit Dr. Hildebrandt werden in Abschnitt 4.3.1 diskutiert.

### 3.4.2 Zelllinien

#### 3.4.2.1 Analysen zur Bestimmung des PSA-Expressionsgrades auf humanen Tumorzelllinien

Eine Übersicht über die analysierten humanen Tumorzelllinien kann der Tab. 1 und dem Abschnitt 5.1.3 entnommen werden.

### 3.4.2.1.1 Durchflußzytometrie zur Bestimmung des PSA-Gehalts

Zur Bestimmung der Oberflächenexpression von polysialyliertem NCAM wurden parallel gleiche Zellzahlen mit dem NCAM-spezifischen mAk 123C3 und dem PSA-spezifischen mAk 735 inkubiert und anschließend mit einem Ratte anti-Maus Kappa Phycoerythrin-Konjugat (Becton Dickinson) gefärbt. Die Emission der markierten Zellen wurde im Anschluß mit einem Durchflußzytometer ("FACScan", Becton Dickinson) gemessen. In Abb. 22 sind exemplarisch die durchflußzytometrischen Daten einer PSA-negativen (HeLa-229) und einer PSA-positiven Zelllinie (SH-SY5Y) dargestellt:

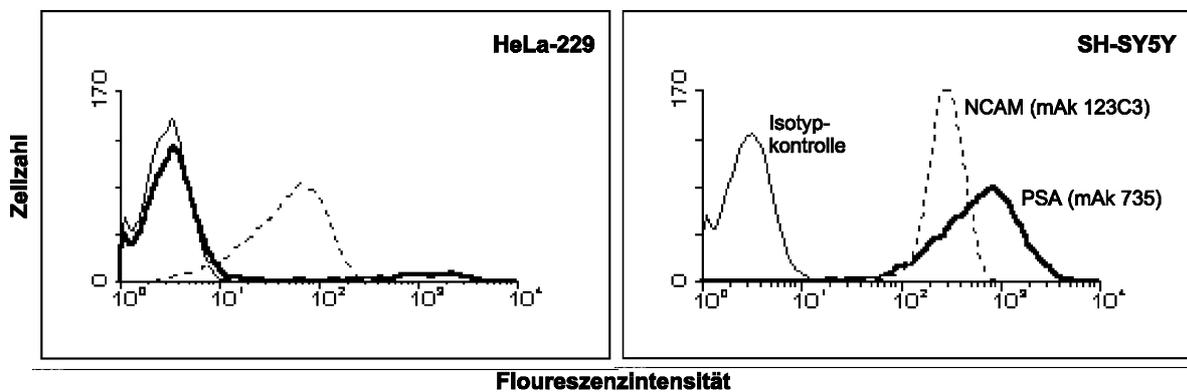


Abb. 22: FACS-Analysen zur Bestimmung des PSA-Gehalts der Zelllinien SH-SY5Y und HeLa-229. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zellzahl. Die Isotypkontrolle wurde mit einem irrelevanten Antikörper durchgeführt, der kein Epitop auf den Zellen erkennt.

Es konnte gezeigt werden, daß die Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y sowohl NCAM als auch PSA exprimiert (Phänotyp NCAM<sup>+</sup>/PSA<sup>+</sup>), während die Zervixkarzinom-Zellen HeLa-229 nur nicht-polysialyliertes NCAM an der Oberfläche tragen (Phänotyp NCAM<sup>+</sup>/PSA<sup>-</sup>).

### 3.4.2.1.2 Western Blot-Analysen zur Bestimmung des PSA-Gehalts

Um die Zelllinien IMR-32, TE671, H69 und KG-1a<sup>+</sup> auf das Vorhandensein von polysialyliertem NCAM zu überprüfen, wurde aus den Lysaten der Zellen NCAM mit dem spezifischen mAk 123C3 immunpräzipitiert, in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Die Blots in Abb. 23 wurden mit dem NCAM-spezifischen mAk KD11 und dem PSA-spezifischen mAk 735 oder nur mit dem mAk 735 angefärbt. Die Western Blot-Analyse zeigte, daß alle untersuchten Linien polysialyliertes NCAM auf der Zelloberfläche exprimieren, erkennbar durch den hochmolekularen Schmier oberhalb von 180 kDa, der durch die heterogene Länge der PSA-Ketten hervorgerufen wird. Die Zelllinien H69

und KG-1a<sup>+</sup> exprimierten zusätzlich nicht-polysialyliertes NCAM, was durch die singuläre 140 kDa-NCAM-Bande, angefärbt durch den mAk KD11, angezeigt wurde. Die Bande bei 140 kDa konnte bei der alleinigen Färbung mit dem mAk 735, der ausschließlich PSA erkennt, nicht dargestellt werden. Da die im Western Blot analysierten Immunpräzipitate aus Zellysaten mit vergleichbarem Proteingehalt durchgeführt wurden, konnte aus den Intensitäten der einzelnen PSA-Färbungen und ihrem Laufverhalten auf PSA-Gehalt und -Kettenlänge der einzelnen Präparationen zurückgeschlossen werden.

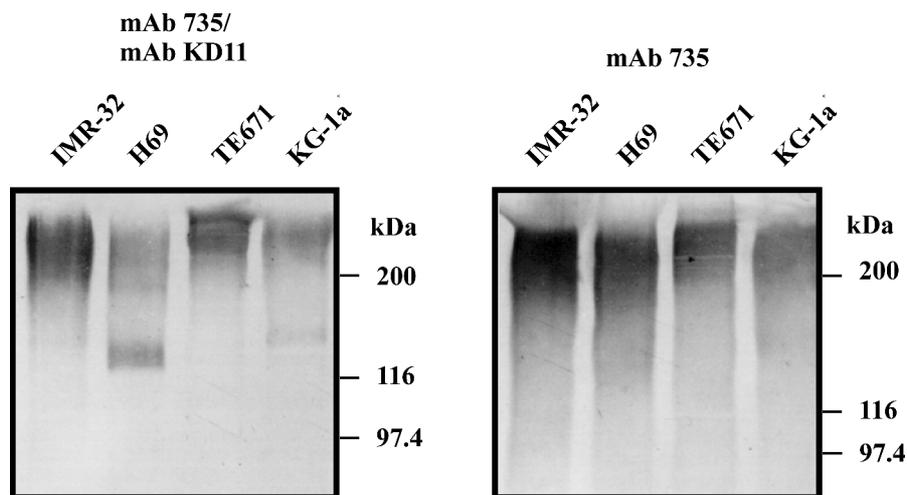


Abb. 23: Western Blot-Analysen zur Bestimmung des PSA-Gehalts der Zelllinien IMR-32, TE671, H69 und KG-1a<sup>+</sup>. Links: Doppelfärbung mit dem NCAM-spezifischen mAk KD11 und dem PSA-spezifischen mAk 735. Aufgetragen wurden Immunpräzipitate, die aus jeweils 25 mg Gesamtzelllysate der entsprechenden Zelllinie mit dem mAk 123C3 gewonnen wurden. Rechts: Identischer Probenauftrag, gefärbt mit dem PSA-spezifischen mAk 735.

Die Neuroblastomlinie IMR-32 und die Rhabdomyosarkomlinie TE671 scheinen durch eine vollständigere Umsetzung des NCAMs einen höheren PSA-Gehalt zu besitzen, als die Bronchialkarzinomlinie H69 und die myeloische Leukämieinie KG-1a<sup>+</sup>. Weiterhin scheint NCAM aus den Linien TE671 und KG-1a<sup>+</sup> eine größere mittlere PSA-Kettenlänge aufzuweisen, als NCAM aus den Linien IMR-32 und H69.

### 3.4.2.2 Northern Blots von humanen Tumorzelllinien

Gesamt-RNA aus den untersuchten Zelllinien wurde mit Hilfe der Guanidiniumisothiocyanat-Extraktion mit anschließender Ultradichtgradienten-Zentrifugation durch einen Cäsiumchloridgradienten isoliert (s. 5.2.3.15.1). Im Anschluß wurde PolyA<sup>+</sup>-RNA über Oligotex<sup>TM</sup>-Säulen aufgereinigt (s. 5.2.3.15.3) und 1 µg der PolyA<sup>+</sup>-RNA auf einem Formaldehyd-

## Ergebnisse

Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 5.2.3.3.2). Nach dem Transfer der RNA auf eine Nylonmembran (s. 5.2.3.17.1) und der UV-Fixierung erfolgte die Hybridisierung der Blots mit digoxigenin-markierten Riboprobes von PST und STX (s. 5.2.3.17). Die gebundenen Proben wurden nach stringenter Wäsche (s. 5.2.3.17) über Chemilumineszenzsignale detektiert (s.5.2.3.18.2).

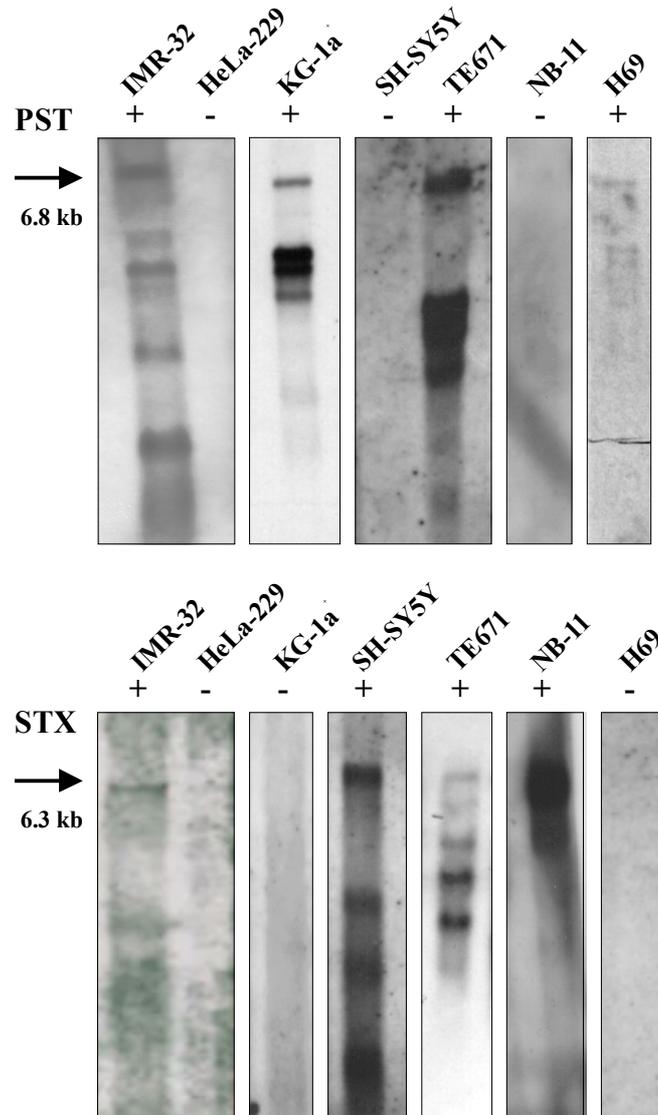


Abb. 24: Northern Blots von PST (oben) und STX (unten) von verschiedenen humanen Tumorzelllinien. Die Hauptbanden für die humane 6.8 kb PST-mRNA bzw. die humane 6.3 kb STX-mRNA sind durch Pfeile auf der linken Seite gekennzeichnet. +: Die jeweilige Zelllinie ist positiv für das Haupttranskript der huPST, respektive der huSTX. -: Die jeweilige Zelllinie ist negativ für das Haupttranskript der huPST, respektive der huSTX.

Die Abb. 24 zeigt, daß mit der Neuroblastomlinie IMR-32 und der Rhabdomyosarkomlinie TE671 zwei der sieben untersuchten Zelllinien eine simultane Expression von PST- und STX-mRNA im Northern Blot zeigten. Im Fall der PSA-negativen Zervixkarzinomlinie HeLa-229

konnte im Northern Blot für keine der beiden PSTs eine Expression gezeigt werden. Die akute myeloische Leukämie-Linie KG-1a<sup>+</sup> und die SCLC-Linie H69 zeigten in den Northern Blot-Analysen exklusiv Signale für die PST-mRNA, dagegen lieferten mit den Neuroblastomzellen SH-SY5Y und NB-11 zwei weitere Linien ausschließlich das STX-Signal.

### 3.4.2.3 RT-PCRs von Zelllinien

Die RT-PCRs wurden mit je 500 ng PolyA<sup>+</sup>-RNA der in Tab. 1 und Abschnitt 5.1.3 genannten humanen Tumorzelllinien, präpariert nach den unter 3.4.2.2 und 5.2.3.15.1 angeführten Methoden nach dem in Abschnitt 5.2.3.16 angegebenen Protokoll durchgeführt. Die Amplifikate wurden in 2%igen Agarosegelen aufgetrennt und nach Ethidiumbromidfärbung über ein UV-Licht-Videosystem dokumentiert (s. 5.2.3.3):

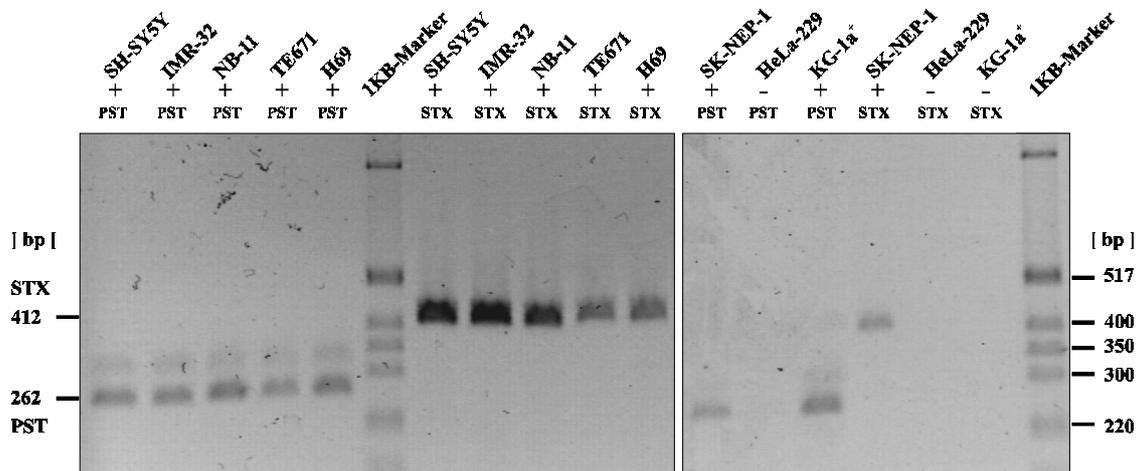


Abb. 25: RT-PCR-Analysen von verschiedenen humanen Tumorzelllinien. Dargestellt ist eine 2%iges Agarosegel. +: Die jeweilige Zelllinie ist PST-positiv, respektive STX-positiv. -: Die jeweilige Zelllinie ist PST-negativ, respektive STX- negativ.

Wie aus der Abb. 25 zu ersehen ist, konnte durch den Einsatz der RT-PCR mit den drei Neuroblastomlinien IMR-32, SH-SY5Y und NB-11, der Rhabdomyosarkomlinie TE671, der Wilms-Tumorlinie SK-NEP-1 und der SCLC-Linie H69 in sechs der acht untersuchten Zelllinien eine simultane Expression von PST- und STX-mRNA demonstriert werden. Die PSA-negative Zervixkarzinomlinie HeLa-229 zeigte in der RT-PCR, wie auch bereits zuvor im Northern Blot, kein Signal für eine der beiden PSTs. Durch die RT-PCR konnte aus der akut myeloischen Leukämie-Linie KG-1a<sup>+</sup> kein STX-Amplifikat generiert werden, so daß diese in Übereinstimmung zur Northern Blot-Analyse exklusiv die PST-mRNA exprimierte. Im Gegensatz zum Northern Blot konnte für keine der untersuchten Linien eine ausschließliche STX-Expression in der RT-PCR bestätigt werden.

### 3.4.2.4 Zusammenfassende Auswertung der Expressionsanalysen in humanen Tumorzelllinien

Die Tab. 1 faßt die durch RT-PCR- und Northern Blot-Studien in humanen Tumorzelllinien gewonnenen Daten zur Expression der PST- und STX-mRNAs und dem Vorhandensein der PSA zusammen:

Zelllinie	Charakterisierung	PSA-Expression	RT-PCR		Northern Blot	
			PST	STX	PST	STX
SH-SY5Y	Neuroblastom	+ (FACS)	+	+	-	+
NB-11	Neuroblastom	+ (FACS)	+	+	-	+
IMR-32	Neuroblastom	+ (WB)	+	+	+	+
H69 (54.2)	Kleinzelliges Bronchialkarzinom	+ (WB)	+	+	+	-
SK-NEP-1	Wilms-Tumor	+ (FACS)	+	+	nd	nd
KG-1a <sup>+</sup>	Akute myeloische Leukämie	+ (WB)	+	-	+	-
TE671	Rhabdomyosarkom	+ (WB)	+	+	+	+
HeLa-229	Zervixkarzinom	- (FACS)	-	-	-	-

Tab. 1: Tabellarische Zusammenfassung der Untersuchungen zur PSA-Expression und zu den mRNA-Expressionsmustern von PST und STX in humanen Tumorzelllinien. nd: Aufgrund einer unzureichenden Ausbeute an mRNA konnte das Experiment nicht durchgeführt werden. FACS: PSA-Expression durchflußzytometrisch bestimmt. WB: PSA-Expression per Western Blot bestimmt.

Es wird deutlich, daß zwischen der Expression von Polysialinsäure und der Expression der Polysialyltransferasen eine enge Korrelation besteht. So exprimiert keine der Zelllinien Oberflächen-PSA ohne gleichzeitig ein Signal für mindestens eine der beiden PSTs in Northern Blot- oder RT-PCR-Analyse zu zeigen und auf allen PST- und/oder STX-mRNA-positiven Linien war mit Hilfe von Durchflußzytometrie (s. 3.4.2.1.1) oder Western Blot-Analysen (s. 3.4.2.1.2) die Expression von polysialyliertem NCAM nachweisbar. Mit den Neuroblastomlinien SH-SY5Y, NB-11 und IMR-32, der Rhabdomyosarkomlinie TE671, der Wilms-Tumorlinie SK-NEP-1 und der SCLC-Linie H69 zeigten sechs der acht untersuchten Zelllinien eine simultane Expression von PST- und STX-mRNA in der Northern Blot- oder RT-PCR-Analyse. Im Fall der PSA-negativen Zervixkarzinomlinie HeLa-229 konnte weder im Northern Blot noch in der RT-PCR eine Expression für eine der beiden PSTs gezeigt werden. Die akute myeloische Leukämieinie KG-1a<sup>+</sup> zeigte in beiden RNA-Analysemethoden exklusiv Signale für die PST-mRNA. In keiner der untersuchten Zelllinien konnte dagegen eine alleinige STX-Expression beobachtet werden.

### 3.4.3 Solide Tumoren und Normalgewebe

In der vorliegenden Arbeit wurden die Expressionsmuster von PST und STX in einer kindlichen Tumorart, dem Neuroblastom, in Zusammenarbeit mit der Kinderklinik der MHH analysiert. Das Neuroblastom gehört zu der Gruppe von hochmalignen und metastasierenden Tumoren, die polysialyliertes NCAM reexprimieren [198],[320]. Aufbauend auf und begleitend zu einer kürzlich publizierten Studie über die prognostische Bedeutung einer erhöhten Serumkonzentration von polysialyliertem NCAM im Verlauf der Neuroblastom-erkrankung [196],[220] wurden innerhalb dieser Arbeit die Expressionsmuster der Polysialyltransferasen-mRNAs in 10 Neuroblastomproben (s. 3.4.3.1) verschiedener Stadien mit Hilfe der Northern Blot-Analyse und reversen Transkriptions-PCR untersucht und mit der PSA-Oberflächenexpression der Tumoren und verschiedenen anderen Parametern, die während des Krankheitsverlaufs erhoben wurden, korreliert. Als Kontrollen dienten dabei kindliche Normalgewebe (Lunge, Leber und Niere) sowie Proben verschiedener anderer Tumorarten (Rhabdomyosarkom, Lymphom und Hepatoblastom). Zum erleichterten Verständnis der gewonnenen Daten werden im folgenden Abschnitt zunächst einige Informationen über das Neuroblastom vorangestellt.

#### 3.4.3.1 Vorbemerkung zum Neuroblastom

Das Neuroblastom ist ein maligner Tumor des autonomen Nervensystems und besteht aus primitiven neuroektodermalen Zellen (Neuroblasten), die der embryonalen Neuralleiste entstammen. Dementsprechend kann der Tumor sowohl in den Nebennieren als auch in Bereichen des sympathischen Grenzstranges lokalisiert sein, wobei Lokalisationen im Bauchraum häufiger als im Thorax oder Hals sind. Die Inzidenz des Neuroblastoms liegt bei 1.1 / 100 000 und sein Anteil an der Gesamtheit kindlicher Krebserkrankungen beträgt als zweithäufigster solider Tumor 7.2%. Das Neuroblastom ist eine Erkrankung des Säuglings- und Kleinkindalters; in Deutschland erkrankten von 1980-1989 jährlich 70-89 Kinder mit einem mittleren Alter von 21 Monaten zum Zeitpunkt der Diagnose. 90% der Patienten waren dabei jünger als 5 Jahre. Die exakte Diagnose erfolgt anhand von Biopsiematerial, welches auch Aufschluß über das klinische Stadium gibt. Allgemein anerkannt ist die internationale Forbeck-Klassifikation [321]. Stadium 1 bezeichnet die komplette Entfernung des auf das Ursprungsorgan begrenzten Tumors ohne Lymphknotenmetastasen, während Stadium 4 die Dissemination mit Fernmetastasen beschreibt. Dieses Stadium weist trotz intensiver Therapie

(Operation, langandauernde Hochdosis-Chemotherapie, autologe Knochenmarkstransplantation) lediglich eine Zehnjahres-Überlebensrate von  $20\pm 3\%$  auf. Streng davon abzugrenzen ist das Stadium 4S, das durch einen unilateralen Primärtumor ausschließlich im Säuglingsalter (mit negativen kontralateralen Lymphknoten) und beschränkter Disseminierung in Leber, Haut und/oder Knochenmark definiert wird und eine Zehnjahres-Überlebensrate von  $79\pm 4\%$  hat. Im Säuglingsalter werden darüber hinaus Ausdifferenzierungen oder Spontanregressionen beobachtet (Stadium 1-3 und 4S), ein Phänomen, welches in dieser Form von keinem anderen Tumor bekannt ist. Die histologische Graduierung (nach [322]) unterscheidet drei Abstufungen: Grad III steht für ein undifferenziertes, klein- und rundzelliges Tumorgewebe. Im Grad II weisen einige Neuroblasten partielle Differenzierung in Ganglienzellen auf, während Grad I durch ein Nebeneinander von ausdifferenzierten Ganglienzellen und noch unreifen Neuroblasten gekennzeichnet ist und daher auch als Ganglioneuroblastom bezeichnet wird. Im Gegensatz dazu kommen im Ganglioneurom, einer gutartigen Wucherung, ausschließlich Ganglienzellen, Schwann-Zellen und Nervenfasern vor. Die Therapie des Neuroblastoms besteht in der initialen möglichst kompletten chirurgischen Resektion und einer am klinischen Stadium orientierten Chemotherapie (alleinige operative Entfernung im Stadium 1). Für Hochrisiko-patienten oder Therapieversager kommt zusätzlich eine Bestrahlung oder im Stadium 4 auch die autologe Knochenmarkstransplantation in Betracht. Als prognostisch sehr ungünstig wird der molekulargenetische Nachweis einer Amplifikation des *N-myc* Protoonkogens angesehen.

### 3.4.3.2 APAAP-Färbungen von Tumor- und Normalgeweben

Die APAAP-Färbungen (s.5.2.1.6.1) an ausgewählten Tumor- und Normalgeweben wurden durchgeführt, um eine direkte Darstellung der PSA-Expression auf der Oberfläche des jeweiligen Gewebes zu ermöglichen welches auf PSTs-mRNA-Expression getestet wurde und so eine Abgrenzung zu den im Serum der entsprechenden Patienten nachweisbaren Konzentrationen von löslichem polysialyliertem NCAM zu gestatten. Der im Patientenserum meßbare PSA-NCAM-Wert geht zwar sehr wahrscheinlich auf die Existenz einer Tumorerkrankung zurück, da der exakte Mechanismus der Freisetzung von polysialyliertem NCAM aus den Tumorzellen aber nicht vollständig verstanden ist, sollte durch die direkte Oberflächenfärbung des Tumorgewebes eine PSA-Expression der untersuchten Proben sichergestellt werden. Die Färbung, Auswertung und fotografische Dokumentation der Präparate wurde in der Kinderklinik der MHH durchgeführt (s. 5.2.1.6.2). Positive Signale

## Ergebnisse

---

stellen sich in den nachfolgend dargestellten Präparaten als rote Färbung der Zellmembranen und Interzellularräume dar, während die Zellkerne dunkelblau gegengefärbt sind. Als Negativkontrolle wurde eine Färbung mit irrelevanten Primärantikörpern vorgenommen.

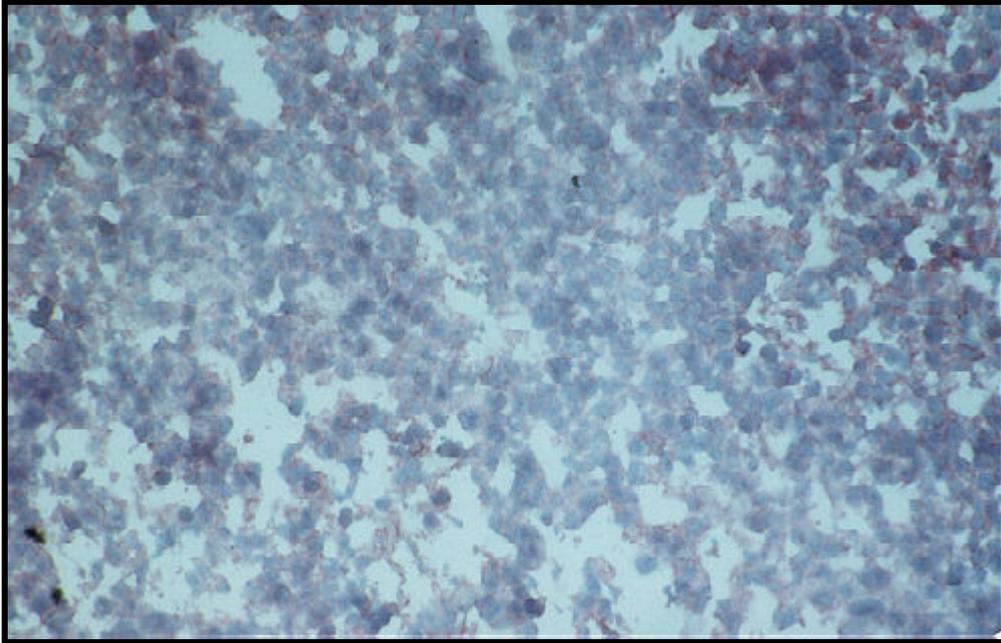


Abb. 26: APAAP-Färbung des Neuroblastoms Nr. 3, "Stage" 3. Die immunhistochemische Rotfärbung mit dem PSA-spezifischen mAk 735 demonstriert eine starke Expression von polysialyliertem NCAM auf den Tumorzellen (Originalvergrößerung x 66).

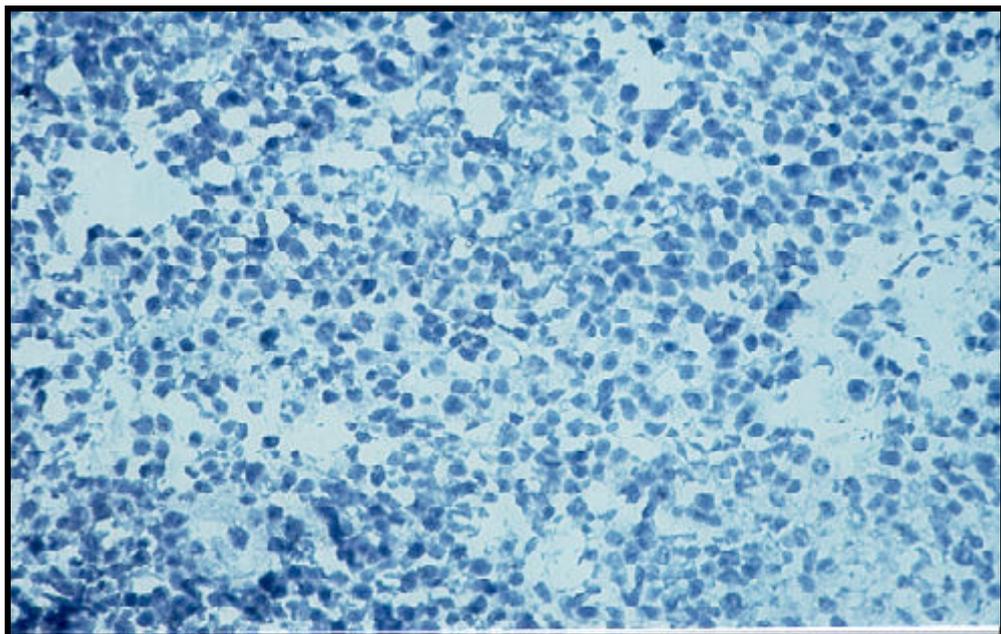


Abb. 27: APAAP-Färbung des Neuroblastoms Nr. 3, "Stage" 3. Die Negativkontrolle mit einem irrelevanten mAk zeigt keine Oberflächenfärbung auf den Tumorzellen, sondern nur die blaue Farbe der Gegenfärbung mit Hämalaun. (Originalvergrößerung x 66).

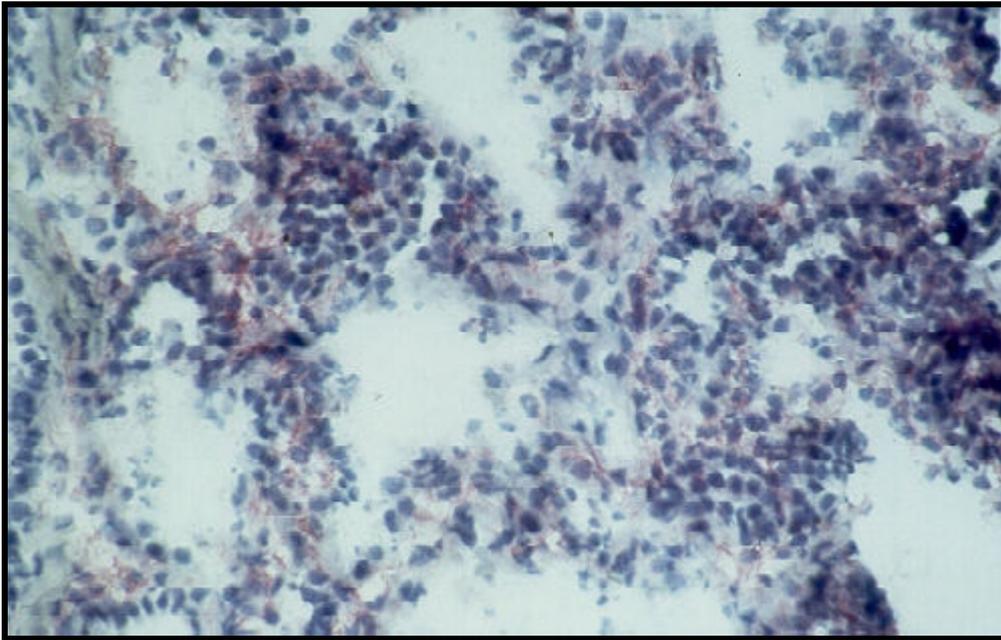


Abb. 28: APAAP-Färbung der Lunge Nr. 16. Die immunhistochemische Rotfärbung mit dem PSA-spezifischen mAk 735 demonstriert eine starke Expression von polysialyliertem NCAM auf den Zellen (Originalvergrößerung x 66).

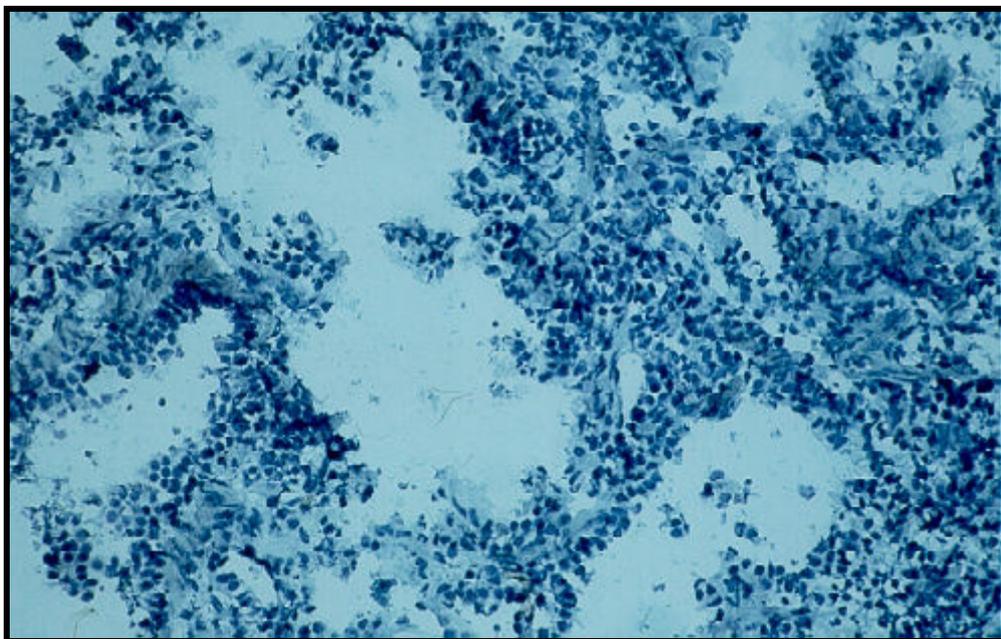


Abb. 29: APAAP-Färbung der Lunge Nr. 16. Die Negativkontrolle mit einem irrelevanten mAk zeigt keine Oberflächenfärbung auf den Zellen, sondern nur die blaue Farbe der Gegenfärbung mit Hämalaun. (Originalvergrößerung x 66).

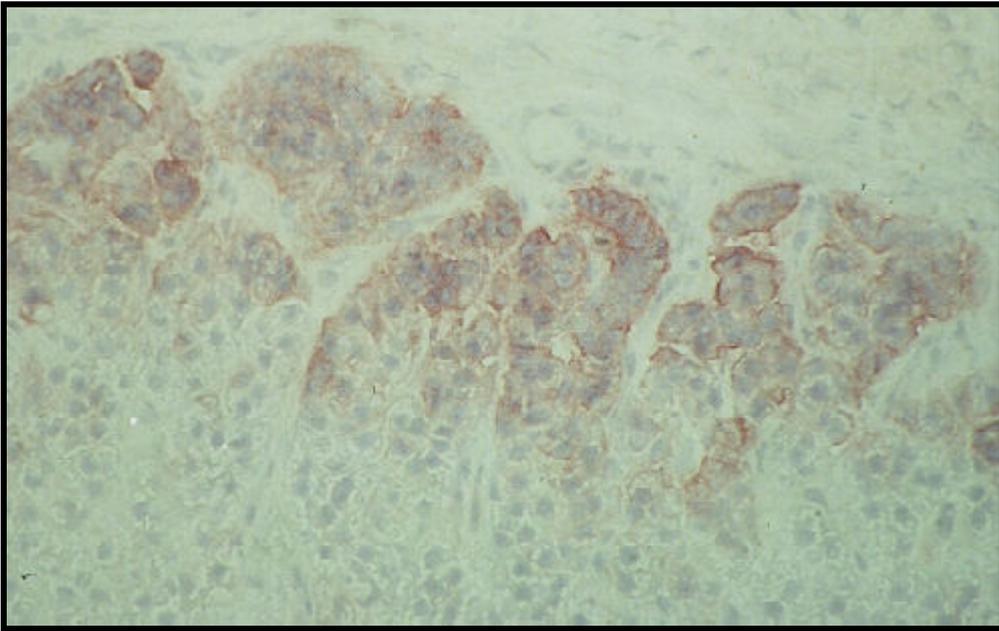


Abb. 30: APAAP-Färbung der Nebenniere Nr. 7. Die immunhistochemische Rotfärbung mit dem PSA-spezifischen mAk 735 demonstriert eine starke Expression von polysialyliertem NCAM in den Randzellschichten. Die PSA-Expression auf den unterhalb dieser Schichten liegenden Zellen nimmt mit wachsendem Abstand kontinuierlich ab. (Originalvergrößerung x 66).

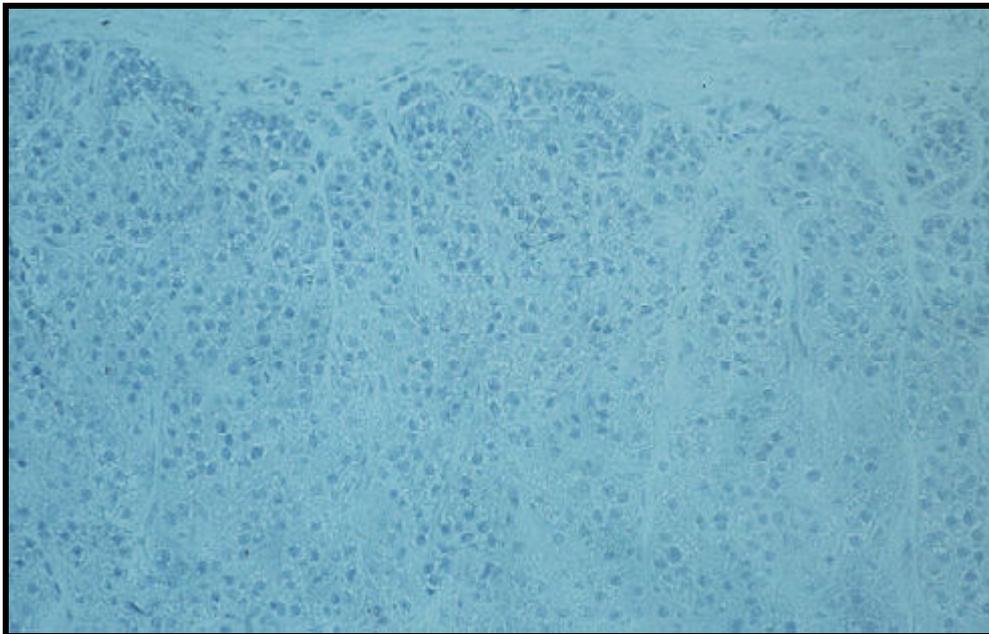


Abb. 31: APAAP-Färbung der Nebenniere Nr. 7. Die Negativkontrolle mit einem irrelevanten mAk zeigt keine Oberflächenfärbung auf den Zellen der Randschichten, sondern nur die blaue Farbe der Gegenfärbung mit Hämalaun. (Originalvergrößerung x 66).

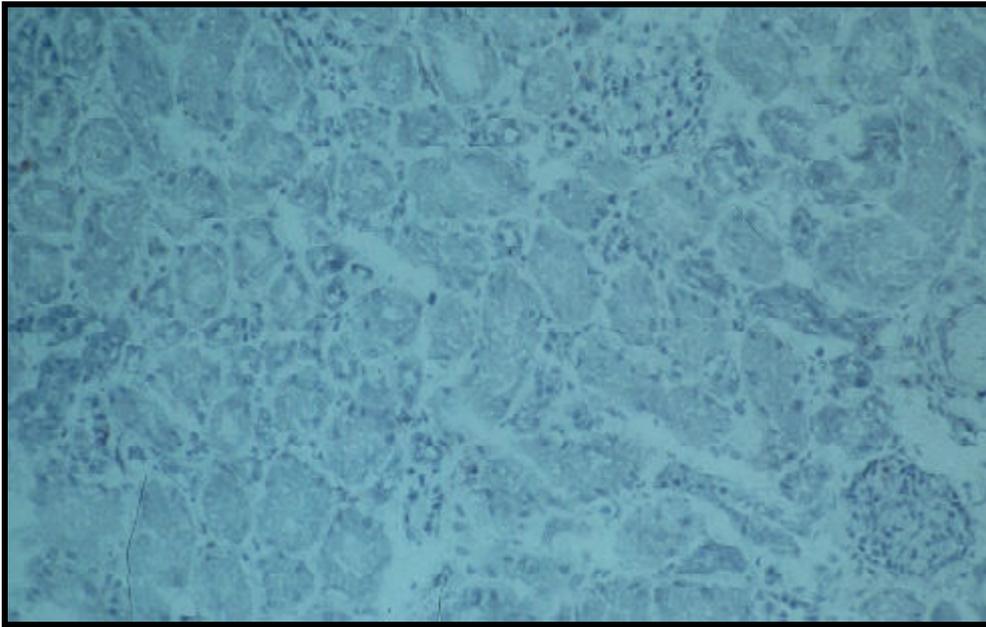


Abb. 32: APAAP-Färbung der Niere Nr. 20. Die immunhistochemische Färbung mit dem PSA-spezifischen mAk 735 zeigt keine Expression von polysialyliertem NCAM auf den Zellen (Originalvergrößerung x 66).

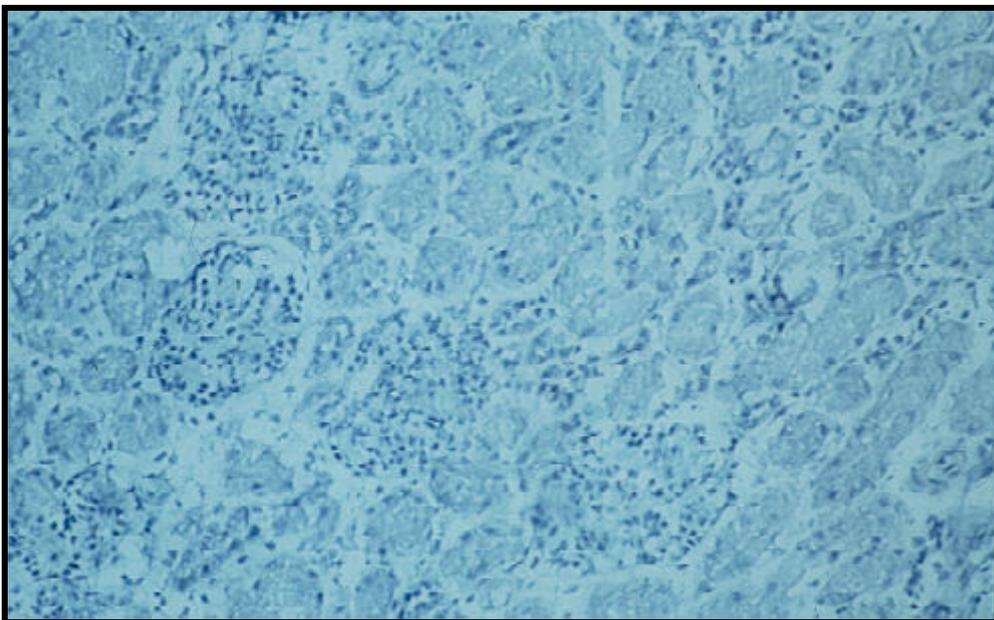


Abb. 33: APAAP-Färbung der Niere Nr. 20. Die Negativkontrolle mit einem irrelevanten mAk zeigt keine Oberflächenfärbung auf den Zellen, sondern entspricht in diesem Fall der Färbung mit dem mAk 735 (s. Abb. 32; Originalvergrößerung x 66).

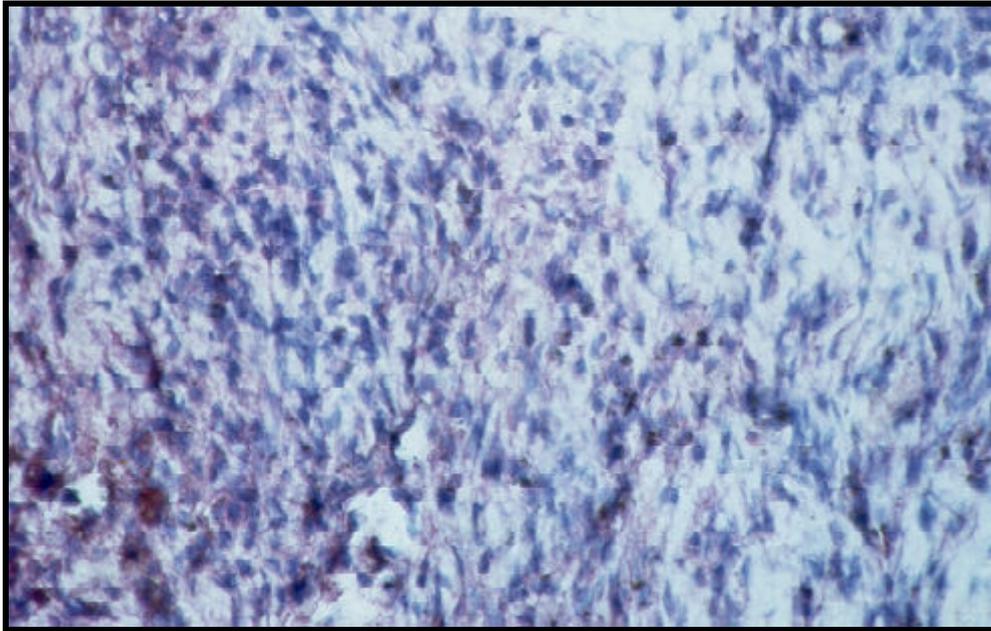


Abb. 34: APAAP-Färbung des RMS Nr. 11. Die immunhistochemische Rotfärbung mit dem PSA-spezifischen mAk 735 demonstriert eine starke Expression von polysialyliertem NCAM auf den Tumorzellen (Originalvergrößerung x 66). Die Negativkontrolle mit einem irrelevanten Antikörper ist in diesem Fall nicht dargestellt, zeigt aber keine PSA-Oberflächenfärbung.

### 3.4.3.3 Northern Blots von Tumor- und Normalgeweben

Zur Analyse der Verteilung von PST- und STX-Transkripten wurde Gesamt-RNA aus den Gewebeproben mit Hilfe der Guanidiniumisothiocyanat-Extraktion mit anschließender Ultradichtegradientenzentrifugation durch einen Cäsiumchloridgradienten isoliert (s. 5.2.3.15.2). Im Anschluß wurde PolyA<sup>+</sup>-RNA über Oligotex<sup>TM</sup>-Säulen aufgereinigt (s. 5.2.3.15.3) und 1 µg der PolyA<sup>+</sup>-RNA auf einem Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 5.2.3.3.2). Nach dem Transfer der RNA auf eine Nylonmembran (s. 5.2.3.17.1) und der UV-Fixierung erfolgte die Hybridisierung der Blots mit digoxigenin-markierten Riboprobes von PST und STX (s. 5.2.3.17). Die gebundenen Proben wurden nach stringenter Wäsche (s. 5.2.3.17) chemilumineszenzdetektiert (s. 5.2.3.18.2). Die Abb. 35 und die Abb. 36 geben einen Überblick über die Expression der PSTs in den einzelnen Geweben. Mit Hilfe der Northern Blot-Technik wurden 14 Tumorproben und sechs Normalgewebe auf die Anwesenheit der PST- und STX-mRNAs untersucht. Unter den 14 analysierten Tumoren befanden sich elf Neuroblastomproben, ein Rhabdomyosarkom, ein Lymphom und ein Hepatoblastom. Zwei der elf Neuroblastome waren als Ganglioneuroblastome (s. 3.4.3.1)

## Ergebnisse

klassifiziert und die Probe Nr. 13 stellte eine Lymphknotenmetastase des Neuroblastoms Nr. 12 dar.

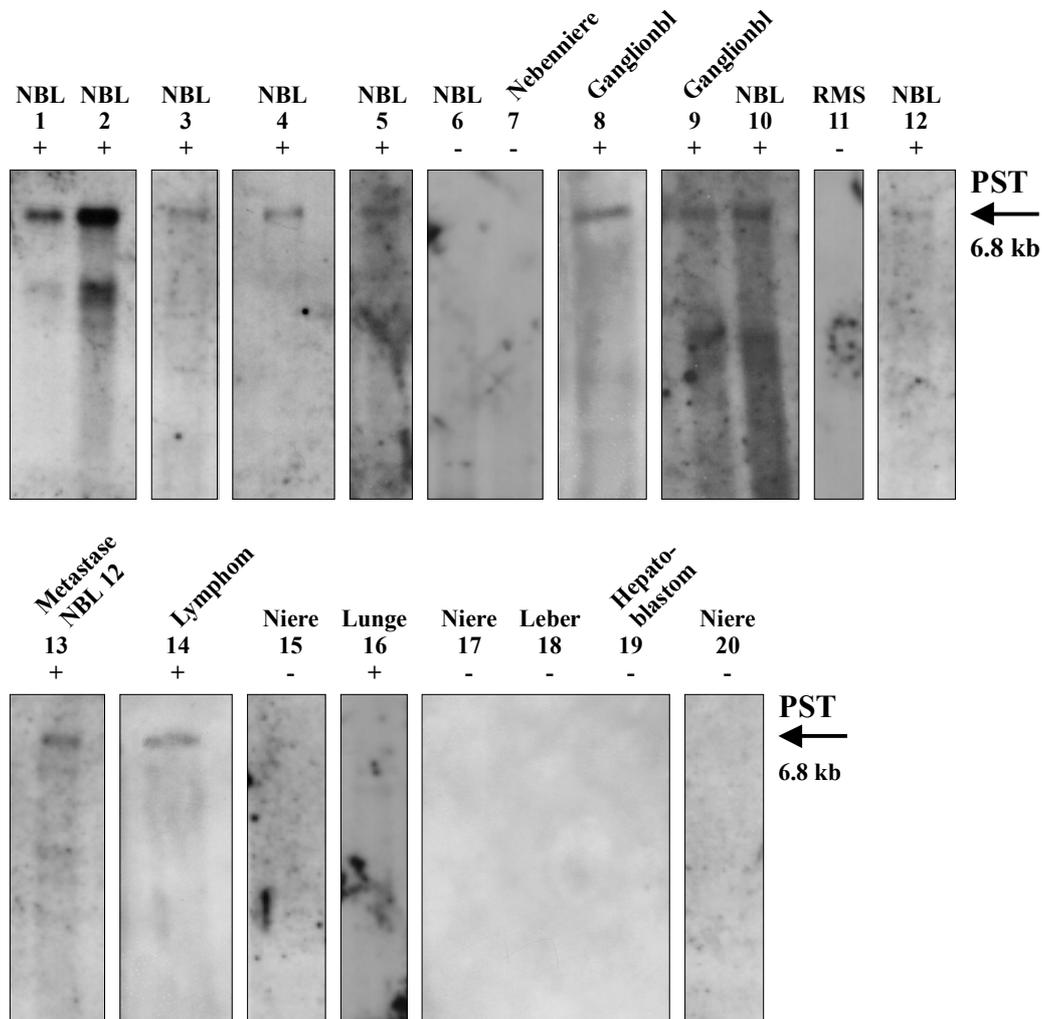


Abb. 35: Northern Blot-Analysen von Tumor- und Normalgeweben für die humane PST. Die Hauptbande von 6.8 kb für die huPST-mRNA ist durch einen Pfeil auf der rechten Seite gekennzeichnet. +: Das jeweilige Gewebe ist positiv für das Haupttranskript der huPST. -: Das jeweilige Gewebe ist negativ für das Haupttranskript der huPST. NBL: Neuroblastom. RMS: Rhabdomyosarkom. Die Zahlen der oberen Beschriftung beziehen sich auf die Nummerierung in Tab. 2.

Die Neuroblastomproben Nr. 1 und Nr. 3 stammten von demselben Patienten und wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten, vor und nach einer chemotherapeutischen Behandlung, entnommen. Unter den sechs untersuchten Normalgeweben waren drei Nierenproben von Patienten unterschiedlichen Alters (s. 3.4.3.5), eine Lungenprobe und eine Leberprobe.

Im Fall der Neuroblastome zeigten neun von elf untersuchten Proben eine parallel Expression von PST- und STX-mRNA im Northern Blot (Proben-Nr.: 1, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 12 und 13). Die Neuroblastomprobe Nr. 2 wies eine exklusive Expression der PST-mRNA auf, während in

## Ergebnisse

Neuroblastom Nr. 6 ausschließlich eine STX-Expression im Northern Blot detektiert werden konnte. Unter den nicht-neuroblastom Tumoren konnte lediglich in dem Lymphom Nr. 14 eine PST-Expression detektiert werden, das Rhabdomyosarkom Nr. 11 zeigte im Northern Blot dagegen ebensowenig ein Signal für eine der beiden PSTs wie die Hepatoblastomprobe Nr. 19. Alle analysierten Normalgewebe (Proben-Nr.: 7, 15, 17, 18 und 20) wiesen mit Ausnahme der Lungenprobe Nr. 16, die positiv für die PST-mRNA getestet wurde, keinerlei PSTs-mRNA-Expression im Northern Blot auf.

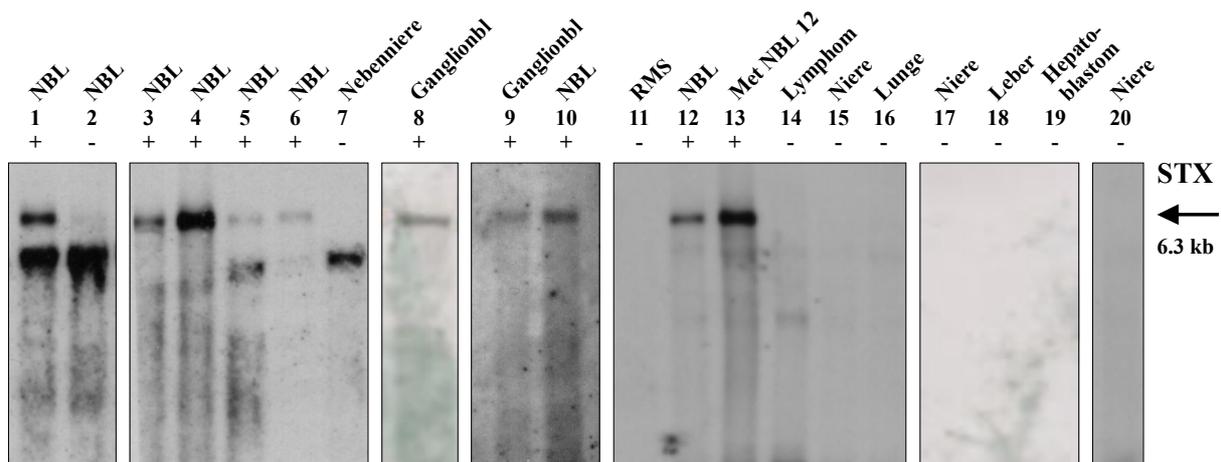


Abb. 36: Northern Blot-Analysen von Tumor- und Normalgeweben für die humane STX. Die Hauptbande von 6.3 kb für die huSTX-mRNA ist durch einen Pfeil auf der rechten Seite gekennzeichnet. +: Das jeweilige Gewebe ist positiv für das Haupttranskript der huSTX. -: Das jeweilige Gewebe ist negativ für das Haupttranskript der huSTX. NBL: Neuroblastom. RMS: Rhabdomyosarkom. Die Zahlen der oberen Beschriftung beziehen sich auf die Nummerierung in Tab. 2.

### 3.4.3.4 RT-PCRs von Tumoren und Normalgeweben

Die RT-PCRs wurden mit je 500 ng PolyA<sup>+</sup>-RNA der in Tab. 2 genannten Tumore und Normalgewebe, präpariert nach den unter 3.4.3.3 und 5.2.3.15.2 angeführten Methoden nach dem in Abschnitt 5.2.3.16 angegebenen Protokoll durchgeführt. Die Amplifikate wurden in 2%igen Agarosegelen aufgetrennt und nach EtBr-Färbung über ein UV-Licht-Videosystem dokumentiert (s. 5.2.3.3). Zur Qualitätskontrolle der isolierten PolyA<sup>+</sup>-RNA-Proben wurde parallel zu der Amplifikation von PST- und STX-Teilfragmenten ein Amplifikat mit human-spezifischen Primern für das Haushaltsgen  $\beta$ -Actin generiert. Die Resultate für die PST- bzw. STX-Analysen wurden nur berücksichtigt, wenn eine positive  $\beta$ -Actin-Amplifikation vorlag. Die Ergebnisse der RT-PCR-Analysen werden aufgrund des zu großen Umfangs an dieser Stelle nicht in Form einer Abbildung dargestellt. Ein zusammenfassender Überblick ist in Tab. 2 unter Abschnitt 3.4.3.5 und in Abschnitt 3.4.3.6 dargestellt.

## Ergebnisse

### 3.4.3.5 Tabellarische Auswertung zu den Expressionsanalysen in Tumoren und Normalgeweben

Nr.	Patient	Histologie (* <sup>1</sup> Graduierung)	* <sup>2</sup> Stage	* <sup>3</sup> Serum- NCAM (kU/L)	* <sup>4</sup> PSA- Expression	Entnahmeort	N-myc Amplifikation	RT-PCR		Northern Blot		Verlauf
								PST-mRNA	STX-mRNA	PST-mRNA	STX-mRNA	
1	w, 4J1M	Neuroblastom	3	10.6	nd	Retroperitoneum	nd	+	+	+	+	nach Chtx
2	m, 1J11M	Neuroblastom	1	151.3	nd	NN li	1	+	+	+	-	krankheitsfrei
3	w, 3J8M	Neuroblastom (3)	3	264.9	+++	Retroperitoneum	40	+	+	+	+	vor Chtx
4	w, 4M	Neuroblastom (3)	1	52.9	+++	NN re	1	+	+	+	+	krankheitsfrei
5	w, 1M	Neuroblastom (3)	1	51.5	++	NN re	1	+	+	+	+	krankheitsfrei
6	m, 6M	Neuroblastom (3)	1	221.7	+++	unbekannt	1	+	+	-	+	krankheitsfrei
7	m, 15T	Nebenniere	ns	52.6	-/+	NN li	nd	-	-	-	-	Tumor nb
8	m, 9J11M	GanglioNBL (1b)	1	15.0	-	Abdomen	1	+	+	+	+	krankheitsfrei
9	w, 1J1M	GanglioNBL (1a)	2b	128.5	+	Thorax	1	+	+	+	+	krankheitsfrei
10	w, 6M	Neuroblastom	1	nd	+	Thorax	nd	+	+	+	+	krankheitsfrei
11	m, 9J3M	Rhabdomyosarkom	ns	21.9	+++	Abdomen	ns	+	+	-	-	unbekannt
12	w, 1J5M	Neuroblastom	3	60.2	++	NN li	1	+	+	+	+	unter Therapie
13	w, 1J5M	Metastase NBL 12	nd	60.2	nd	Lymphknoten	1	+	+	+	+	unter Therapie
14	m, 9J10M	Lymphom	ns	28.8	-	Lymphknoten	ns	+	+	+	-	unbekannt
15	w, 9J3M	Niere	ns	30.0	-	Niere	ns	+	+	-	-	ns
16	m, 1T	Lunge (CCAM)	ns	nd	++	Oberlappen li	ns	+	+	+	-	unbekannt
17	w, 1J2M	Niere	ns	68.8	-	CE neben Wilms-Tumor	ns	+	+	-	-	unbekannt
18	m, 9M	Leber	ns	24.9	-	CE neben Hepatoblastom	ns	-	-	-	-	unbekannt
19	m, 9M	Hepatoblastom	ns	24.9	-	Leber	ns	+	+	-	-	unbekannt
20	w, 2M	Niere	ns	nd	-	Niere	ns	+	-	-	-	ns

Tab. 2: Daten der Neuroblastomstudie. **Blau:** Neuroblastom (NBL). **Grün:** Nicht-neuroblastom Tumor. **Rot:** Normalgewebe. \*<sup>1</sup>Neuroblastom-Graduierung nach [322]; Identisch schattierte Felder bezeichnen Proben vom selben Patienten. \*<sup>2</sup>Neuroblastom-"Staging" nach [321]. \*<sup>3</sup>Fetttdruck bezeichnet pathologische Serumspiegel (>60 kU/L). \*<sup>4</sup>Die PSA-Expression wurde durch die APAAP-Methode bestimmt (s. 3.4.3.2 u. 5.2.1.6.1): Immunreaktivität für den mAk 735 ausgedrückt als Verhältnis von gefärbten Zellen zur Gesamtzahl der Zellen: - = keine Färbung. + = einige (<1/3); ++ = viele (>1/3); +++ = die meisten (>2/3) der Zellen gefärbt. nd: nicht durchgeführt; nb: nicht bestätigt; ns: nicht sinnvoll; w: weiblich; m: männlich; T: Tage; M: Monate; J: Jahre; kU: Kilo-Units; NN: Nebenniere; li: links; re: rechts; CE: chirurgische Entnahme; CCAM: Kongenitale cystische adenomatoide Malformation. Chtx: Chemotherapie.

### 3.4.3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Expression der PSTs in soliden Tumoren

Die Tab. 2 in Abschnitt 3.4.3.5 vergleicht in den Spalten "RT-PCR" und "Northern Blot" die durch die beiden RNA-Analysemethoden gewonnenen Daten zur Expression von PST- und STX-mRNA in den untersuchten Geweben. Dabei zeigte sich für die Neuroblastomproben Nr. 1, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 12 und 13 eine exakte Übereinstimmung zwischen den durch Northern Blot-Technik gewonnenen Signalen und den mittels RT-PCR generierten Amplifikaten. Gleiches traf auf die Normalgewebe Nr. 7 (Nebenniere) und Nr. 18 (Leber) zu. Während die genannten Neuroblastome in Northern Blot und RT-PCR übereinstimmend beide PSTs parallel exprimierten, war in den beiden Normalgewebe keine der PSTs sichtbar.

Für acht der untersuchten Gewebe, die Neuroblastomproben Nr. 2 und Nr. 6, das Rhabdomyosarkom Nr. 11, das Lymphom Nr. 14, das Hepatoblastom Nr. 19 und für die Normalgewebe mit den Nummern 15, 17, 20 (Nieren) und 16 (Lunge) waren Abweichungen zwischen den Ergebnissen im Northern Blot und den über RT-PCR gewonnenen Daten zu beobachten. Als gemeinsames Merkmal der genannten Proben fiel auf, daß eine im Northern Blot nicht detektierbare Expression von PST- und/oder STX-mRNA erst durch den Einsatz der RT-PCR nachgewiesen werden konnte. Diese Differenzen sind auf die unterschiedliche Sensitivität von Northern Blot und RT-PCR zurückzuführen, deren Nachweisgrenzen sich um den Faktor  $10^2$ - $10^3$  zugunsten der RT-PCR unterscheiden. Ein positiver Nachweis der mRNAs der PSTs in der RT-PCR stellt daher nicht zwangsläufig einen Widerspruch zu einem negativen Northern Blot-Befund dar. Die Leberprobe Nr. 18 zeigte beispielsweise weder im Northern Blot noch in der RT-PCR ein Signal für eine der beiden mRNAs. Das vom selben Patienten stammende Hepatoblastom (Nr. 19) dagegen wurde in der RT-PCR sowohl für die PST- als auch für die STX-mRNA positiv befundet. Offensichtlich war es im Verlauf der Erkrankung auch bei diesem Tumor zu einer geringfügigen Reexpression beider PSTs-mRNAs gekommen, die zwar nicht im Northern Blot, wohl aber in der wesentlich sensitiveren RT-PCR nachweisbar war. Ähnliches läßt sich auch für das im Northern Blot komplett negative Rhabdomyosarkom Nr. 11 vermuten, welches aber in der RT-PCR positiv für beide PSTs-mRNAs war und ferner in der APAAP-Färbung (s. Abb. 34) ein deutliches PSA-Signal zeigte. In der Lungenprobe Nr. 16 konnte erst durch die RT-PCR ein Signal für die STX-mRNA detektiert werden, während das PST-Signal bereits im Northern Blot sichtbar war. Da in der APAAP-Färbung eine deutliche PSA-Färbung sichtbar war (s. Abb. 28 u. Abb. 29), zeigt dieser Befund, daß die Zellen dieses Gewebes hauptsächlich die PST exprimieren. Die

Annahme, daß die auf den ersten Blick divergierenden Expressionsbefunde bezüglich PST- und STX-mRNA auf die unterschiedliche Sensitivität der Nachweismethoden zurückgeht, wurde nicht zuletzt durch die Tatsache bekräftigt, daß in keinem der untersuchten Gewebe einem negativen RT-PCR-Ergebnis ein positiver Northern Blot-Befund gegenüberstand, sondern stets nur die umgekehrte Variante auftrat.

Die APAAP-Färbung der Nebenniere zeigt eine deutlich PSA-positive Zellschicht innerhalb des Gewebes (s. Abb. 26 u. Abb. 27), obwohl keine der PSTs in der Probe Nr. 7 nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise ist diese PSA-positive Zellpopulation im Verhältnis zur Gesamtprobe unterrepräsentiert. Eine zweite plausible Erklärung für dieses Ergebnis ist jedoch, daß die entsprechende Zellpopulation nicht in dem der RNA-Präparation zugrundeliegenden Probenanteil enthalten war.

Die Nierenproben Nr. 15, 17 und 20 schienen extrem niedrige Level an PST- und STX-mRNA zu exprimieren. Zwar konnten in der RT-PCR schwache Signale detektiert werden, in der APAAP-Färbung mit dem mAk 735 zeigten die Gewebe jedoch ausnahmslos keine PSA-Oberflächenexpression (s. Abb. 32 u. Abb. 33 als Beispiel), so daß die nachgewiesenen Mengen an PST- und STX-mRNA augenscheinlich nicht ausreichend für die Initiation einer nachweisbaren PSA-Expression waren.

Die in Tab. 2 angegebenen Werte für die Konzentration von polysialyliertem NCAM im Serum der Patienten in kU/L wurden von der Firma "Behring Diagnostics" (Marburg) in einem Chemilumineszenz-Immunoassay bestimmt [204]. Dieses System ähnelt einem "Fänger-ELISA" und benutzt zwei monoklonale Antikörper, den PSA-spezifischen mAk 735 als Fänger und den NCAM-spezifischen mAk BW SCLC-1 für den Nachweis von polysialyliertem NCAM. Dazu werden die Proben zunächst mit dem immobilisierten mAk 735 inkubiert. Nach Zugabe des direkt chemilumineszenz-markierten mAk BW SCLC-1 erfolgt die Detektion mit einem Chemilumineszenzmeßgerät. Die Resultate werden anhand von Standards mit bekannter Konzentration an polysialyliertem NCAM in Kilo-Units pro Liter ausgedrückt (für detailliertes Protokoll s. [196]). In einer Studie an Kindern mit Krankheitsbildern, die nicht tumor-assoziiert waren, wurde ein Schwellenwert von 60 kU/L ermittelt. Serumspiegel von polysialyliertem NCAM, die höher als dieser Wert liegen werden als pathologisch eingestuft.

## 4 DISKUSSION

Über die Regulation der PSA-Expression in Tumoren und während der normalen neuronalen Ontogenese waren zu Beginn dieser Arbeit nur wenige Daten bekannt. Mein Ziel war es daher, die Expressionsmuster der mRNAs der  $\alpha$ 2,8-Polysialyltransferasen PST und STX in verschiedenen onkogen transformierten und nativen Zellen sowie in Normalgeweben zu analysieren und zum Verständnis der Regulation dieser Gene beizutragen. Durch die Isolierung großer genomischer Fragmente aus den 5'-flankierenden Bereichen der beiden Schlüsselenzyme der eukaryontischen PSA-Synthese und durch die Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte konnten zahlreiche potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren ermittelt werden. Weiterhin gelang es durch mRNA-Expressionsanalysen an einer Reihe von primären Neuroblastomen die polysialylierte Form des NCAM als möglichen diagnostischen und prognostischen Monitor im Verlauf der Neuroblastom-Therapie zu bestätigen.

### 4.1 Bestimmung der Transkriptionsstarts der humanen PSTs

#### 4.1.1 Transkriptionsstart der humanen PST

Der Transkriptionsstart der humanen PST wurde durch zwei unabhängige Analysemethoden, das 5'-Race und die Primer Extension, übereinstimmend auf ein Guanin in Position –323 festgelegt (s. 3.1). Das mit beiden unabhängigen Methoden erreichte Ergebnis bestätigt, daß dieses Nukleotid als erstes transkribiert wird. Die ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Analyse des murinen PST-Gens zeigte das Vorhandensein von zwei Transkriptionsstartstellen in AtT20-Zellen [272]. Da bei der Existenz von mehr als einem humanem Transkriptionsstart in der 5'-Race-Analyse mehr als eine Bande auftreten müßte, kann ein zweiter Transkriptionsstart in humanem fetalem Gesamtgehirn ausgeschlossen werden (s. Abb. 6). Interessanterweise wurde auch im Gesamtgehirn von neugeborenen Mäusen (P1) nur eine Transkriptionsstartstelle gefunden [271]. Möglicherweise stellt die Existenz von mehreren Transkriptionsstartstellen in der Linie AtT20 eine zelltypspezifische Variation dar. Diskrepanzen zwischen murinem und humanem Transkriptionsstart bestehen aber nicht nur in der Anzahl, sondern auch in der exakten Position. Die von anderen

Experimentatoren ermittelten murinen Transkriptionsstarts liegen fünf respektive zehn Nukleotide weiter 5'-wärts als der im Rahmen dieser Arbeit ermittelte humane Transkriptionsstart (s. Abb. 15). Diese Beobachtung ist nicht ungewöhnlich, da sowohl Beispiele für unterschiedliche Transkriptionsstarts des gleichen Gens in verschiedenen Spezies bekannt sind, als auch Beispiele für eine strikte Konservierung des Transkriptionsstarts eines Gens zwischen eng verwandten Spezies [323].

### 4.1.2 Transkriptionsstart der humanen STX

Da der Transkriptionsstart der humanen PST mit Hilfe zweier unabhängiger Analysemethoden an übereinstimmender Position verlässlich bestimmt werden konnte, stellte sich die Frage, warum dieses Ergebnis im Fall der STX nicht erzielt werden konnte. Die Methoden zur Bestimmung des Transkriptionsstarts wurden parallel zur PST auch für die humane STX angewandt, führten jedoch lediglich zur Generierung eines 5'-RACE-Amplifikates, das bis -30 Nukleotide "upstream" des ATG-Startcodons reichte. Dieser Punkt kann nicht den Transkriptionsstart der huSTX darstellen, da seine Entfernung von der GC-Box zu groß ist (s. Abb. 16) und seine Lage zu stark vom bekannten Start des murinen Gens [270] abweicht.

Auch durch die Erweiterung des 5'-RACE-Systems um eine zusätzliche Amplifikationsrunde ("Nested"-PCR), der Einsatz von alternativen genspezifischen PCR-Primern und die Verwendung eines alternativen 5'-RACE-Kits (Gibco BRL) konnte kein längeres 5'-RACE-Amplifikat erzeugt werden. Der Grund für das Ausbleiben eines Resultates ist mit hoher Wahrscheinlichkeit der sehr hohe G+C-Gehalt in der 5'-UTR. Der G+C-Gehalt in dem 258 bp-Abschnitt zwischen den GC-Boxen und dem ATG-Startcodon, in dem der Transkriptionsstart positioniert sein sollte, liegt bei 81%. Dieser sehr hohe Wert reduzierte die *in vitro*-Funktionsfähigkeit der für 5'-RACE und Primer Extension eingesetzten reversen Transkriptase wahrscheinlich so drastisch, daß die Erststrangsynthese mit einer so hohen Abbruchhäufigkeit behaftet war, daß vollständige, d.h. bis zum Transkriptionsstart umgeschriebene Produkte nicht entstehen konnten [324]. Im Fall der huPST lag der G+C-Gehalt der Region zwischen der GC-Box und dem ATG-Initiationscodon (ca. 400 bp) mit 62% deutlich niedriger und erlaubte deswegen offensichtlich eine ausreichend effiziente reverse Transkription. Zur Überwindung der durch den hohen G+C-Gehalt im 5'-UTR der STX ausgelösten Schwierigkeiten bei der Bestimmung des Transkriptionsstarts erscheint die Anwendung einer Technik sinnvoll, bei der auf den Einsatz von Polymerasen verzichtet

werden kann. Zur Aufklärung des Transkriptionsstarts der huSTX wird deshalb momentan ein "RNase Protection Assay" innerhalb der Arbeitsgruppe etabliert.

## 4.2 Die Regulation von PST und STX

Alle bislang durchgeführten Studien zur PSA-Expression sprechen dafür, daß die Regulation der PSA-Expression auf der Ebene der Transkription der Polysialyltransferasen PST und STX erfolgt. *In vitro*-Modelle für neuronale Differenzierung in P19- und MNS-8-Zellen demonstrieren, daß nach Retinsäureinduktion das Erscheinen von PSA auf der Zelloberfläche mit der Hochregulierung der STX-mRNA einhergeht, während die Expression der PST-mRNA konstant bleibt [325]. Verschiedene Autoren beschreiben übereinstimmend eine enge Korrelation zwischen der PSA-Immunreaktivität und der mRNA-Expression von NCAM und den PSTs im Verlauf der Entwicklung des Nagergehirns [244],[231],[245],[246],[247]. Wenngleich die hier erwähnten Arbeiten in vielen Bereichen widersprüchlich sind (s. auch 4.3.1), so kristallisiert sich doch heraus, daß in frühen embryonalen Stadien PST und STX parallel exprimiert werden. Beide Transkripte sind ab Tag 8.5 der Embryonalentwicklung nachweisbar [326]. In späteren, postnatalen Stadien entwickeln sich ihre Expressionsmuster auseinander. Die STX-mRNA ist sehr hoch in embryonalem Gewebe exprimiert, wird aber im Verlauf der postnatalen Gehirnentwicklung sehr rasch herunterreguliert und ist im adulten Zustand kaum noch nachweisbar. Auch die PST-mRNA erreicht zum Zeitpunkt P1 ein Maximum und wird postnatal stark reduziert. Die im Verlauf der postnatalen Gehirnentwicklung auftretenden Konzentrationsänderungen sind jedoch deutlich schwächer ausgeprägt und die Expression bleibt in einigen Bereichen des adulten Gehirns erhalten.

Die bislang verfügbaren Daten zur genomischen Organisation der murinen Gene von PST und STX belegen einen homologen Aufbau bezüglich der Exon/Intron-Komposition, während die 5'-UTR-Bereiche nahezu keine Sequenzhomologien besitzen. Die Minimalpromotoren der murinen Gene, die ausreichend für eine Reporterexpression in PST, respektive STX-exprimierenden Zellen sind, weisen einen sehr hohen G+C-Gehalt und Bindungsstellen für den basalen Transkriptionsfaktor Sp1 auf, besitzen aber weder TATA- noch CAAT-Boxen. Bislang konnten in diesen Sequenzabschnitten noch keine strukturellen Merkmale beschrieben werden, die die Regulation der unterschiedlichen zeitlichen und räumlichen Expression von PST und STX verantworten könnten.

### **4.2.1 Potentielle Bindungsstellen in den 5'-Bereichen von PST und STX und Charakterisierung ihrer Minimalpromotoren**

In dieser Arbeit wurden die genomischen Sequenzen der 5-flankierenden Bereiche der humanen Gene für die PST (3.5 kb) und die STX (2.7 kb) als regulierende Abschnitte der Polysialyltransferasen-Expression isoliert und charakterisiert. Durch einen Homologievergleich mit den im Verlauf dieser Arbeit publizierten Mausequenzen [271],[270],[272] konnten spezifische Merkmale der potentiellen Promotorbereiche von PST und STX, wie das Vorhandensein von GC-Boxen und CpG-Inseln, identifiziert werden. Basierend auf dem Homologievergleich zwischen den Spezies gelang durch den Einsatz der "Transfac"-Analysensoftware [275] die Identifikation von potentiellen Bindungsstellen für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren in den 5'-Bereichen der PSTs (24 für die PST und 37 für die STX).

Für die Charakterisierung der minimalen Promotorregionen wurde ein Testsystem mit einer sekretierten Form der alkalischen Phosphatase als Reporter gen aufgebaut (s. 5.2.3.19). Mit Hilfe dieses Testsystems konnte der Minimalpromotor der PST auf ein Fragment von 439 bp mit potentiellen Bindungsstellen für die Faktoren SP1, GATA-1, NF-Y und CREB festgelegt werden (s. 3.2.5 und Abb. 17). Durch die Deletion dieser potentiellen Bindungsstellen sank die Aktivität des Reporterkonstruktes abhängig von der getesteten Zelllinie um den Faktor 2.9 bis 35 ab (s. 3.3).

Da SP1 und NF-Y, deren Bindung an die murine Promotorsequenz mittlerweile in "Gel Shift-Assays" gezeigt werden konnte [271], als ubiquitäre Transkriptionsfaktoren nicht alleine für die dynamische Regulation der PST-mRNA verantwortlich sein können, beeinflussen möglicherweise CREB und/oder GATA-1 über einen synergistischen Mechanismus mit SP1 und/oder NF-Y zumindest teilweise die gewebsspezifische Expression des Gens. Eine Kooperation von Sp1 und GATA-1 in der Genaktivierung konnte bereits für einige Gene demonstriert werden [286].

Im Fall der STX hatte die minimale Promotorregion, die ausreichend zur Expression des Reporters in endogen STX-exprimierenden Zellen war, eine Länge von 351 bp und beinhaltete potentielle Bindungsstellen für die Faktoren SP1 und MZF1 (s. 3.2.5 und Abb. 18). Das Fehlen dieser Bindungsstellen führte zu einem Rückgang der Reporter genaktivität um den Faktor 4.9 bis 16 in verschiedenen endogen STX-exprimierenden Zelllinien (s. 3.3), so daß eine Beteiligung der in dem deletierten Abschnitt bindenden Faktoren SP1 und MZF1 an der minimalen Transkriptionskontrolle naheliegend ist.

Es ist schwer vorstellbar, daß die dramatischen zeitlichen und gewebspezifischen Unterschiede im Expressionsniveau von PST- und STX-mRNA im Verlauf der postnatalen Gehirnentwicklung allein durch die in den Minimalpromotoren festgestellten unterschiedlichen Bindungsstellen regulatorischer Faktoren ausgelöst werden. Obwohl die 5'-flankierenden Bereiche von PST und STX keine ausgeprägte Sequenzhomologie zeigen, ist ihr struktureller Aufbau sehr ähnlich. Beide Gene weisen GC-Boxen mit den dazugehörigen Sp1-Bindungsstellen auf, haben einen singulären Transkriptionsstart und ihre Minimalpromotoren sind eingebettet in G+C-reiche Regionen und besitzen keine typische TATA-Box. Dieser Promotortypus wurde bei zahlreichen Haushaltsgenen gefunden, wird aber auch mit der neuron-spezifischen Expression von Genen in Zusammenhang gebracht, wie beispielsweise bei dem Gen für die neuron-spezifische Enolase [327], den Synapsinogenen I und II [328],[329], dem NGF-Rezeptorgen [330] und verschiedenen olfaktorischen, neuron-spezifischen Genen [331].

Ein gemeinsames Merkmal der Minimalpromotoren von PST und STX ist das Vorhandensein einer GC-Box. SP1 als ubiquitärer Regulator von GC-Boxen ist hoch exprimiert in allen fetalen Zellen, der Lunge und dem Thymus, aber niedrig in verschiedenen adulten Organen, wie z.B. der Leber oder der Niere [332]. Die STX ist besonders hoch exprimiert in fetalem Gehirn, Lunge und Niere, aber nicht oder nur sehr schwach detektierbar in adulter Leber und Niere. Daher könnte vermutet werden, daß die unterschiedlichen Expressionshöhen von PST und STX in diesen Organen zum Teil durch Unterschiede in der Sp1-Expression erklärbar sind. Sp1 kann an Serin- und Threoninresten phosphoryliert oder durch *N*-Acetylglucosamin modifiziert und dadurch in seiner Funktion beeinflußt werden. Weiterhin kann Sp1 auch als ein potenter Enhancer betrachtet werden, der fähig ist, über eine Multimerisierung und DNA-Loop-Bildung weit entfernte DNA-Sequenzen und daran bindende Faktoren in den Transkriptionsinitiationskomplex zu rekrutieren [333]. Sp1 kann ferner mit zahlreichen anderen Faktoren, u.a. mit Oct-1 und NF-kapB, die z. T. ebenfalls potentielle Bindungsstellen in den 5'-flankierenden Bereichen von PST- und STX-Promotor besitzen, wechselwirken. Der Sp1-Faktor stellt ein ideales Ziel für Mechanismen der Transkriptionsregulation dar und hat sehr wahrscheinlich maßgeblichen Anteil an der gemessenen Reporterogenaktivität der beiden Minimalpromotoren. Unterstützt wird diese These durch die Tatsache, daß eine erhöhte Promotoraktivität der getesteten Konstrukte pSEAP-Enh.PST1 und pSEAP-Enh.STX1 auch in der PST- und STX-negativen Zelllinie HeLa-229 gemessen werden konnte (s. Abb. 19). Diese Aktivitäten reduzierten sich jedoch auf ein in allen untersuchten Zelllinien

vergleichbares Maß, wenn die Sp1-Bindungsstellen in den Konstrukten fehlten (pSEAP-Enh.PST2 und pSEAP-Enh.STX2). Weiterhin konnte mittels "Footprint"-Analysen inzwischen demonstriert werden, daß die beiden Bindungsstellen im murinen Minimalpromotor tatsächlich durch Sp1 besetzt werden [270].

Die identifizierten minimalen Promotorregionen der PSTs scheinen jedoch über die Funktion des Sp1-Faktors hinaus essentielle transkriptionale Einheiten darzustellen, die auch genspezifisch angesteuert werden können. So bestand ein deutlicher Unterschied in der Expression des Reportergens zwischen endogen PST oder STX exprimierenden Zellen und Linien, die endogen PST- oder STX-negativ waren (s. 3.3.). Gelangten die Reporterkonstrukte durch transiente Transfektion in einen zellulären Kontext, der positiv für eine oder beide PSTs war, stellte der Minimalpromotor offensichtlich ein ausreichend spezifisches Steuerelement der Transkriptionsaktivierung dar, während vor einem PST- bzw. STX-negativen Hintergrund reprimierende Mechanismen griffen. Besonders deutlich wurde dieser Befund durch die Reporterexpression in der STX-negativen Zelllinie KG-1a<sup>+</sup> (s. Abb. 19). In dieser Zelllinie konnte durch Northern Blot und RT-PCR-Analyse eine endogene PST-, aber keine STX-Expression nachgewiesen werden. Die Minimalpromotoren der entsprechenden Reporterkonstrukte aktivierten oder reprimierten die Expression des Reportergens abhängig vom endogenen Kontext. So konnte keine Expression des STX-Reporters, wohl aber des PST-Reporters in der Linie KG-1a<sup>+</sup> gemessen werden.

Als ein zusammenfassendes Fazit der Reporterassays kristallisiert sich heraus, daß die ermittelten minimalen Promotorregionen von PST und STX zwar ausreichend für eine zelltypspezifische Expression sind, diese aber maßgeblich von der zellulären Situation im Hinblick auf die bereits vorhandene endogene Expression der PSTs abhängt. Es stellt sich damit zukünftig die Frage, in Form welcher Mechanismen und Faktoren sich dieser endogene zelluläre Hintergrund manifestiert und welche Einflüsse *in vivo*-Komponenten, wie Chromatinstruktur, chromosomale Lokalisation der Gene und zelluläre Signaltransduktionswege, die durch ein artifizielles Reportersystem nicht ausreichend abgebildet werden können [334], auf die Transkriptionsregulation von PST und STX nehmen.

In Anbetracht der zahlreichen weiteren identifizierten potentiellen Bindungsstellen außerhalb der minimalen Promotorregionen ist es wahrscheinlich, daß zumindest einige dieser Faktoren in der Wirkungsweise von Enhancern regulatorisch auf die Transkription von PST und STX Einfluß nehmen und so die abweichenden Regulationsmechanismen der PSTs verwirklichen. Dabei sind zahlreiche Szenarien denkbar, in denen es durch ein Zusammenspiel verschiedener

entweder reprimierend oder aktivierend wirkender Faktoren zu Effekten auf die Transkriptionsrate von PST und STX kommen könnte. Durch die Dynamik und Gewebsspezifität der Expression der mRNAs von PST und STX, z.B. im Verlauf der postnatalen Gehirnentwicklung, muß gefordert werden, daß sowohl aktivierende als auch reprimierende Mechanismen der Genregulation existieren und situativ auch ein vollständiges "Silencing" des Promotors gewährleistet sein muß. Diese Forderungen stehen im Einklang mit dem Befund, daß in den 5'-flankierenden Bereichen von PST und STX sowohl potentielle Bindungsstellen für Repressoren (deltaE, CDP CR) als auch Aktivatoren (C/EBP, CdxA, GATA-1, GATA-3, Lyf-1, Nkx-2, Sp1, NF-Y, NF-kapB) und bipotente Faktoren (CREB, MZF1, Oct-1, p300, YY1, AP1) gefunden wurden. Interessanterweise finden sich potentielle Bindungsstellen für die genannten Repressorproteine lediglich im 5'-flankierenden Bereich des STX-Promotors und nicht im vergleichbaren Abschnitt der PST. Es kann spekuliert werden, ob hier ein Zusammenhang mit dem starken Rückgang der mRNA-Expression der STX im Verlauf der postnatalen Gesamtgehirnentwicklung besteht (s. Abb. 20). Auffällig ist ferner die Häufung von MZF1-Bindungsstellen im Minimalpromotor der STX. Dem Faktor MZF1 wird ein reprimierendes Potential in Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs zugeschrieben und sein Bindungsmotiv überlappt partiell mit dem des aktivierenden Faktors Sp1 (s. Abb. 18). Eine kontrollierte Konkurrenz der beiden gegensätzlich wirkenden Faktoren um die Bindungsstellen stellt einen möglichen Mechanismus der STX-Genregulation dar.

Die Wahrscheinlichkeit einer Beteiligung von MZF1 an der Regulation der PSTs wird durch die Tatsache erhöht, daß verschiedene Autoren eine Induzierbarkeit durch Retinsäure für beide Gene gezeigt haben, wobei die Induktion des STX-Gens durch Retinsäure wesentlich stärker ist, als die des PST-Gens [325],[270],[335]. MZF1 stellt ein "Retinoic Acid Responsive Element" dar und wirkt nach Induktion stark aktivierend auf die Transkription [291]. Die Tatsache, daß die STX wesentlich stärker auf die Induktion mit Retinsäure anspricht als die PST, korreliert mit der Zahl von potentiellen MZF1-Bindungsstellen in den 5'-flankierenden Bereich der beiden Gene. Im 5'-Bereich der STX befinden sich acht potentielle MZF1-Bindungsmotive, drei davon innerhalb der minimalen Promotorregion, während im vergleichbaren Abschnitt des PST-Gens nur zwei dieser Stellen identifiziert werden konnten, von denen keine innerhalb des Minimalpromotors lag. In diesem Zusammenhang ist auch interessant, daß es bei der *in vitro*-Differenzierung der Neuroblastomlinie LAN-5 zu einem neuronalen Phänotyp durch Retinsäure zu einer starken Zunahme der polysialylierten 180 kDa NCAM-Isoform (s. 2.2 u. Abb. 2) kommt [336]. Diese

NCAM-Isoform ist ein Hauptsubstrat der STX (s. 2.4.1). Zwar konnte durch die Induktion auch eine Zunahme der 180 kDa NCAM-mRNA in der Zelllinie beobachtet werden, aber es ist vorstellbar, daß die starke Polysialylierung der 180 kDa Isoform durch parallel induzierte, ansteigende STX-Level gewährleistet wird. Obwohl die MZF1-vermittelte Retinsäure-Induzierbarkeit der STX noch kein eindeutiger Beweis für eine *in vivo*-Beteiligung des Faktors ist, machen die angeführten Daten eine wichtige Rolle von MZF1 in der Regulation des STX-Gens doch sehr wahrscheinlich.

Neben einigen ubiquitären Transkriptionsfaktoren (Sp1, Oct-1 und NF-Y) wurden im Rahmen dieser Arbeit in den 5'-flankierenden Sequenzen von PST und STX auch Bindungsstellen für Faktoren beschrieben, die in Zelldifferenzierungsprozesse involviert sind (GATA-1, GATA-3, MZF1, NFkapB, p300, AP1) oder Homöodomänen-Proteine darstellen (CdxA, Nkx-2, deltaE, CDP CR, Pbx-1). Obwohl für einige dieser Faktoren die humanen Homologe zum jetzigen Zeitpunkt nicht kloniert sind, steht dieser Befund in Einklang mit der Expression und den Funktionen von polysialyliertem NCAM in Prozessen wie der Zelldifferenzierung und Embryogenese (s. 2.2, 2.3 und 2.3.1). Da die Polysialylierung des NCAM vermutlich über die Expression der PSTs reguliert ist, erscheint die Steuerung der PSTs durch Transkriptionsfaktoren, die an embryonaler Entwicklung und neuronaler Differenzierung beteiligt sind, als logische Konsequenz.

Ein weiteres gemeinsames Merkmal der 5'-flankierenden Bereiche von PST und STX ist die Existenz von purin- und pyrimidin-reichen Regionen (s. Abb. 15 u. Abb. 16). Da diese Bereiche zwischen den Spezies stark konserviert sind, steht zu vermuten, daß sie eine wichtige Rolle in der Funktion der Promotorbereiche innehaben. Im Fall der PST wurden durch die "Transfac"-Analysensoftware keine potentiellen Bindungsstellen für Faktoren in den purin- und pyrimidin-reichen Abschnitten vorhergesagt, während bei den Vorhersagen für STX einige potentielle MZF1-Bindungsstellen in diesen Bereichen zu liegen kamen (s. Abb. 17 u. Abb. 18). Über purin- und pyrimidin-reiche Abschnitte in Promotorregionen ist bekannt, daß sie Bindungsorte von Proteinen sein können, die einzelsträngige DNA binden. Für die Aufklärung einer möglichen Funktion der Purin- und Pyrimidin-"Stretches" in der Regulation von PST und STX könnte die Bindung solcher Proteine in Zukunft durch "Gel Shift-Assays" mit Kernextrakten aus STX- und PST-exprimierenden Zelllinien überprüft werden.

Abschließend muß auf die Möglichkeit hingewiesen werden, daß auch Enhancer-Elemente weit "upstream" der innerhalb dieser Arbeit isolierten 5'-Sequenzen oder möglicherweise auch innerhalb des ersten Introns an der Genregulation von PST und STX beteiligt sein können.

## 4.3 PSTs-mRNA-Expression in Eukaryonten

### 4.3.1 Die Expression der PSTs im Verlauf der fetalen und postnatalen Gehirnentwicklung

Die Frage, welche der beiden Polysialyltransferasen, PST oder STX, für die Polysialylierung des NCAM zu welchem Zeitpunkt verantwortlich ist, ist nach wie vor ein viel diskutierter Streitpunkt. Erste vergleichende *in situ*-Hybridisierungsstudien demonstrierten eine parallele Expression von PST und STX in fast allen Regionen des Rattenhirns [246]. Im Kontrast dazu proklamierten andere Autoren die STX als das entscheidende Enzym der NCAM-Polysialylierung sowohl in der Differenzierung einer embryonalen Maus-Karzinomzelle [325] als auch im sich entwickelnden Maus-ZNS [337].

Northern Blot-Analysen von unterschiedlichen humanen und murinen Geweben [244],[245] und verschiedenen Regionen des sich entwickelnden Mausgehirns [337] demonstrierten erhebliche Divergenzen in den Expressionsleveln von PST und STX und die verantwortlichen Autoren leiteten daraus spezifische entwicklungsabhängige Funktionen für die beiden Polysialyltransferasen ab.

Mit Hilfe von Northern Blot-Analysen (s. Abb. 20 und Abb. 21) konnte im Rahmen dieser Arbeit eine differentielle Regulation und Verteilung von PST und STX im Verlauf der postnatalen Entwicklung des Rattengehirns gezeigt werden. In Übereinstimmung mit weiteren Studien [225],[338],[227],[337],[244] zeigten die Northern Blots einen Rückgang der PST- und STX-mRNA-Expression, der in Einklang mit der schnellen PSA-Abnahme im Verlauf ersten drei Wochen der postnatalen Rattengehirnentwicklung steht [150]. Ferner konnte beobachtet werden, daß nach der initialen Reduktion beider PSTs-mRNAs die Intensität des PST-Signals bis ins adulte Stadium konstant bleibt, während die Reduktion der STX-Expression weiter fortschreitet und die mRNA in adulten Tieren praktisch nicht mehr nachweisbar ist.

Die beobachtete divergierende Dynamik und Dauer der Herunterregulierung von postnataler PST- und STX-mRNA steht in Übereinstimmung zu einer neueren Studie von Ong *et al.* [245], die demonstriert, daß die abundante Expression der STX im Gehirn von neugeborenen Mäusen von einer vorherrschenden PST-Expression im adulten Gehirn abgelöst wird. Darüber hinaus konnte diese differentielle Regulation von PST- und STX-Expression auch bei einem Vergleich zwischen fetalem und adultem humanen Gehirn festgestellt werden [244].

Die im Rahmen dieser Arbeit herausgearbeiteten Differenzen in der PST- und STX-Expression konnten in Zusammenarbeit mit Dr. Herbert Hildebrandt von der Universität Stuttgart-Hohenheim durch Daten aus *in situ*-Hybridisierungsexperimenten erhärtet werden. Besondere Aufmerksamkeit wurde in diesen Analysen dem rostralen Migrationsweg und dem Hippocampus, zwei Gehirnregionen mit anhaltender PSA-Immunreaktivität gewidmet. In den untersuchten Gehirnregionen persistierten nur einige wenige STX-Signale im *Gyrus dentatus* des Hippocampus bis ins postnatale Stadium P21, während in einigen Zellen des Neocortex, im Hippocampus, in der subependymalen Zone und im *Bulbus olfactorius* eine anhaltende PST-Expression nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise konnte im Verlauf der postnatalen Entwicklung ausschließlich PST aber keine STX-Expression im rostralen Migrationsweg detektiert werden. Die Verteilung der PST korrespondiert nach dieser Beobachtung mit der Expression der PSA auf proliferierenden Zellen in der subventrikulären Zone. Diese Zellen migrieren in die subependymale Schicht des *Bulbus olfactorius*, um dort zu Körnerzellen und periglomerulären Zellen zu differenzieren [152],[145],[339],[340],[341]. Innerhalb der glomerulären Schicht des *Bulbus olfactorius* wurde eine relativ geringe Anzahl von PST-exprimierenden Zellen beobachtet. Dieser Befund stand in Übereinstimmung mit früheren Analysen, nach denen die PSA-Oberflächenfärbung in diesem Areal auf eine Subpopulation von periglomerulären Zellen beschränkt ist. Diese Zellpopulation besteht aus Neuronen, die im Begriff sind, synaptische Kontakte zu etablieren [152].

Beide Polysialyltransferasen wurden im postnatalen Cerebellum in den Reifungsstadien P2 und P11 festgestellt, verschwanden aber zusammen mit der PSA-Expression [123],[150] nach Beendigung der postnatalen Entwicklungsperiode. In Übereinstimmung mit einer früheren Studie [337] konnte eine starke STX-Expression während der Formierung der Purkinjzellschicht zum Zeitpunkt P2 gezeigt werden. Im Stadium P11, das durch die Differenzierung der Purkinjzellen gekennzeichnet ist, war dagegen die PST-Expression stärker ausgeprägt. Da für die Purkinjzellen der Maus eine konstante PSA-Immunreaktivität vom Zeitpunkt P0 bis zum Stadium P11 nachgewiesen wurde [123], scheint eine koordinierte Aktivität beider PSTs an der PSA-Synthese in diesem Zelltypus beteiligt zu sein.

Die innerhalb dieser Studie gefundenen Daten bezüglich Expressionsmuster und Regulation der STX-mRNA gehen konform mit einer Studie zur STX-Expression im Maus-ZNS [337]. Die in Kooperation mit Dr. Hildebrandt im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten [247] und die Studie von Kurosawa *et al.* [337] demonstrierten einstimmig eine abundante, aber rasch abfallende STX-Expression in frühen postnatalen Stadien im Neocortex, im *Cornu ammonis*,

im *Gyrus dentatus* des Hippocampus, der sich entwickelnden Purkinjzellschicht und den zentralen Nuclei des Cerebellums. In beiden Studien konnten, im Gegensatz zu der Arbeit von Phillips *et al.* [246], keine STX-Signale in den subependymalen Schichten und den Schichten des *Bulbus olfaktorius* gefunden werden. Im Widerspruch zu der vorliegenden Arbeit und zu den Ergebnissen von Kurosawa *et al.* [337], fanden Phillips *et al.* [246] eine bis ins adulte Stadium fortgesetzte STX-Expression in den Pyramidalzellen des Hippocampus und in den Purkinjzellen des Cerebellums. Im Bezug auf die anhaltende Expression der PST-mRNA im Cortex, der subependymalen Schicht des *Bulbus olfaktorius* und dem Hippocampus, stimmen die in dieser Arbeit gewonnenen Daten mit den Analysen von Wood *et al.* [231] und Phillips *et al.* [246] überein.

Ein Vergleich der PST-Signale im reifen Cerebellum macht bemerkenswerte Diskrepanzen zwischen allen drei Studien deutlich: Wood *et al.* [231] fanden starke PST-Signale in der gesamten Körnerzellschicht, Phillips *et al.* [246] beschrieben eine persistierende Expression in den Purkinjzellen, während in der vorliegenden Studie ein Verschwinden der PST unter ein nachweisbares Maß beobachtet wurde.

Ein Grund für diese Unterschiede mögen die abweichenden experimentellen Bedingungen in den verschiedenen Arbeitsgruppen sein, so ist z.B. denkbar, daß die Verwendung von RNA-Sonden unterschiedlicher Länge in den *in situ*-Hybridisierungen zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt hat. Wie auch von Kurosawa *et al.* [337] wurden in der vorliegenden Studie Sonden von mehr als 400 bp Länge benutzt (s. 5.2.3.18.1.4), was offensichtlich zu vergleichbaren Resultaten geführt hat. Die von Phillips *et al.* [246] verwendeten kürzeren Proben ( $\leq 200$  bp) und die Oligonukleotide, die von Wood *et al.* [231] benutzt wurden, erzeugten zwar stärkere Signale, waren aufgrund ihrer geringeren Länge möglicherweise aber auch unspezifischer als die längeren Sonden. Weiterhin ist denkbar, daß die unterschiedlichen Prozeduren zur Gewebepräparation und die abweichenden Protokolle zur Markierung und Detektion der Sonden für einige der beobachteten Widersprüche verantwortlich waren.

Zusammenfassend konnten mit der vorliegenden Studie [247] deutliche Differenzen im zeitlichen Verlauf und im gewebsspezifischen Expressionsmuster von PST und STX demonstriert werden, die eine voneinander unabhängige Regulation der beiden Polysialyltransferasen verlangen. STX und PST synthetisieren PSA-Ketten unterschiedlicher Länge und scheinen unterschiedliche Affinitäten für die NCAM-Hauptisoformen zu besitzen [243],[244]. Das Zusammenspiel von PST und STX in der Regulation der PSA-Synthese bleibt unbekannt, aber es scheint vorstellbar, daß die beiden PSTs durch ihre spezifischen

katalytischen Eigenschaften differente Rollen in der Biosynthese der PSA spielen und die Polysialylierung des NCAM im Verlauf der Gehirnentwicklung in unterschiedlichen funktionellen Zusammenhängen steht. Die STX wird während der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung bei weitem höher exprimiert als die PST. Dagegen ist die PST dominant im adulten, reifen Nervensystem und stellt damit sicherlich ein lohnenswertes Ziel für zukünftige Studien zur Funktion der PSA-Expression in der Plastizität adulter Gehirnareale dar.

### **4.4 Die Expression der PSTs in Zelllinien und Tumoren**

Ausgehend von der Hypothese, daß die Reexpression von polysialyliertem NCAM das maligne Wachstum von Tumoren fördert, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, eine möglichst große Zahl humaner Tumorzelllinien bzw. solider Tumoren mit unterschiedlichem klinischen Verhalten auf Anwesenheit von NCAM und PSA sowie auf die Expressionsmuster der STX- und PST-mRNAs zu untersuchen.

#### **4.4.1 Abweichende Expressionsraten der PSTs in Zelllinien**

Im Hinblick auf den Einfluß der Reexpression polysialylierter NCAM-Formen auf das Metastasierungspotential einiger neuroendokriner und lymphoider Tumorarten (s. 2.3.4) wurden in dieser Arbeit mit Hilfe von Northern Blot- und RT-PCR-Analysen die Verteilung von PST- und STX-mRNA in acht humanen Tumorzelllinien untersucht (s. Tab. 1) und mit der Expression von polysialyliertem NCAM verglichen. Die Expression von PSA-NCAM wurde dabei mittels Western Blot-Analysen und Durchflußzytometrie bestimmt (s. Abb. 22 u. Abb. 23). Mit Ausnahme der Zervixkarzinomlinie HeLa-229 exprimierten alle untersuchten Linien hohe Level von polysialyliertem NCAM. Während die myeloische Leukämie Linie KG-1a<sup>+</sup> ausschließlich die PST-mRNA exprimiert, wurde in den Linien SH-SY5Y, NB-11, IMR-32, H69, SK-NEP-1 und TE671 eine Koexpression beider PSTs gefunden. Korrespondierend zur fehlenden PSA-Oberflächenexpression war in den HeLa-229-Zellen keine PST- oder STX-mRNA nachweisbar.

Insgesamt konnte gezeigt werden, daß eine direkte Korrelation zwischen der PSA-Expression und dem Vorhandensein entweder der PST- oder beider Polysialyltransferasen-mRNAs besteht. Die exklusive Expression der STX-mRNA bei gleichzeitiger Abwesenheit eines PST-Signals wurde in keiner der analysierten Zelllinien beobachtet.

Dieser Befund steht in scheinbarem Widerspruch zu einer früheren Arbeit, in der ein stark PSA-positiver Subklon (NCI-H69/F3) der SCLC-Linie H69 mit dem Phänotyp PST<sup>-</sup>/STX<sup>+</sup> beschrieben wurde [229]. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde ein vergleichbarer, ebenfalls stark PSA-positiver Subklon derselben SCLC-Linie H69 (Subklon HTB 54.2) analysiert. Durch den Einsatz der RT-PCR konnte in dieser Linie eine Expression der PST-mRNA detektiert werden. Die bestehende Diskrepanz in der Expression der PSTs kann damit erklärt werden, daß die Expressionsanalyse des Subklons NCI-H69/F3 von Scheidegger *et al.* [229] ausschließlich mittels Northern Blot-Analysen durchgeführt wurde. Bei alleiniger Betrachtung des Northern Blots für den in dieser Arbeit untersuchten Subklon HTB 54.2 konnte übereinstimmend mit Scheidegger *et al.* ebenfalls kein PST-Signal identifiziert werden. Erst durch die wesentlich sensitivere RT-PCR gelang der Nachweis des PST-Signals. Offensichtlich exprimiert die SCLC-Zelllinie H69 unterschiedliche Raten an PST- und STX-mRNA. Die unterschiedlichen Sensitivitäten der beiden mRNA-Nachweismethoden, RT-PCR und Northern Blot, scheinen geeignet zu sein, quantitative Expressionsunterschiede zwischen den beiden mRNAs der PSTs aufzudecken. Die Expression der STX-mRNA in den beiden SCLC-Subklonen ist augenscheinlich wesentlich höher als der Level der PST-Expression, welche erst in der RT-PCR sichtbar wurde.

Auch in einigen anderen der untersuchten Linien ergeben sich Differenzen in den durch RT-PCR und Northern Blot festgestellten Signalen, die quantitative Expressionsunterschiede widerspiegeln könnten. So wurde in den Neuroblastomlinien SH-SY5Y und NB-11 ein PST-Signal nur in der RT-PCR beobachtet, was dafür spricht, daß diese Zellen die STX-mRNA auf deutlich höherem Niveau exprimieren, als die PST-mRNA. Im Fall der SH-SY5Y-Zellen konnte eine höhere STX-Expression indirekt durch *in situ*-Hybridisierungsexperimente in den Zellen bestätigt werden. In diesen Untersuchungen, durchgeführt von Dr. Herbert Hildebrandt, Universität Stuttgart-Hohenheim, wurde die Expression beider Transkripte der PSTs nachgewiesen [335]. Darüber hinaus ließ sich die Konzentration der eingesetzten STX-Sonde in der *in situ*-Hybridisierung bis zum Verlust des Signals wesentlich weiter reduzieren, als dies bei der PST der Fall war, obwohl die beiden Sonden über Titrationsreihen auf gleiche Signalstärke eingestellt waren. (s. 5.2.3.18.1.4 u. 5.2.3.18.1.5). Diese Beobachtung bestätigt, daß die SH-SY5Y-Zellen die STX-mRNA sehr viel höher exprimieren, als die PST-mRNA.

Ein übereinstimmendes Ergebnis bezüglich der Koexpression von PST und STX lieferten RT-PCR und Northern Blot in den Zelllinien IMR-32, TE671 und SK-NEP-1. In diesen Zellen waren die Expressionsunterschiede der PSTs offenbar zu gering, um durch einen Vergleich

der beiden RNA-Analysemethoden nachvollzogen zu werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Unterschiede in der Expressionshöhe von PST und STX in verschiedenen Zelllinien existieren. In einigen Zelllinien überwiegt die STX-Expression, in anderen die PST-Expression. Die exklusive Expression der PST wurde beobachtet, nie aber eine ausschließliche Expression der STX.

Diese Befunde erinnern an die unterschiedlich regulierten Expressionslevel der PSTs im Entwicklungsgeschehen (s. auch 2.3.1, 2.3.2, 3.4.1 u. 4.3.1). Die beobachtete Variabilität im PST- und STX-mRNA-Level der unterschiedlichen Tumorzellen spricht, wie die gewebsspezifischen und entwicklungsbedingten Differenzen, für eine divergente Rolle der beiden PSTs in der NCAM-Polysialylierung und zeigt eine abweichende Regulation der Enzyme auf Transkriptionsebene an.

In Anbetracht dieser Ergebnisse ist es vorstellbar, Fortschritte in der Funktionsanalyse der PSTs im Hinblick auf die Verantwortlichkeit der beiden Enzyme in der NCAM-Polysialylierung durch eine exakte Quantifizierung der PST- und STX-mRNAs zu erreichen. Die genaue Kenntnis der mRNA-Expressionshöhen verschiedener Zelllinien könnte, mit dem ebenfalls quantitativ ermittelten Grad der Polysialylierung der einzelnen NCAM-Hauptisoformen in denselben Zelllinien korreliert werden, um so die spezifischen PST- bzw. STX-Funktionen zu differenzieren.

### **4.4.2 Die Expression der PSTs in soliden Tumoren**

Gemäß der Zielsetzung (s. 2.6) der vorliegenden Arbeit wurden die Expressionsmuster der mRNAs von PST und STX in einem kindlichen Tumor, dem Neuroblastom, in Kooperation mit der Abteilung für Kinderchirurgie der Kinderklinik der MHH analysiert. Das Neuroblastom gehört zu der Gruppe von hochmalignen und metastasierenden Tumoren, die polysialyliertes NCAM exprimieren [198],[320] und bei denen erhöhte Serumspiegel für lösliches polysialyliertes NCAM gefunden werden. In Erweiterung von kürzlich publizierten Studien über die prognostische Bedeutung einer erhöhten Serumkonzentration von polysialyliertem NCAM im Verlauf der Neuroblastomerkrankung [196],[220] wurde die Verteilung der Polysialyltransferasen-mRNAs in 10 Neuroblastomproben (s. 3.4.3.1) mit Hilfe der Northern Blot-Analyse und der reversen Transkriptions-PCR untersucht. Als Kontrollen dienten dabei kindliche Normalgewebe (Lunge, Leber und Niere) sowie einige Proben von nicht-neuroblastom Tumoren (Rhabdomyosarkom, Lymphom und Hepatoblastom).

Alle bekannten Evidenzen sprechen derzeit für eine Regulation der Aktivität beider PSTs auf

Transkriptionsebene. Im Hinblick auf die pathophysiologischen Funktionen der PSA bei onkogener Transformation und Filiarisierung wurde innerhalb dieser Arbeit versucht, die Befunde zur Verteilung von PST- und STX-mRNA mit dem Grad der PSA-Oberflächenexpression auf den analysierten Neuroblastomproben sowie dem Serumwert für polysialyliertes NCAM zu korrelieren.

Zur direkten Darstellung der PSA-Expression auf der Oberfläche der Tumorzellen wurden immunhistochemische Färbungen (s. 5.2.1.6.1) anhand von Tumormaterial durchgeführt. Die Serumkonzentrationen von polysialyliertem NCAM wurden von der Firma "Behring Diagnostics" (Marburg) mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Immunoassays bestimmt.

Es wird angenommen, daß ein erhöhter PSA-NCAM-Wert im Patientenserum auf die Existenz einer Tumorerkrankung zurückgeht, der exakte Mechanismus der Freisetzung von polysialyliertem NCAM aus den Tumorzellen ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. Aus diesem Grund sollte durch die direkte Oberflächenfärbung des Tumorgewebes eine Möglichkeit geschaffen werden, Serum- und Oberflächen-PSA gegeneinander abzugrenzen.

Alle nachfolgend aufgeführten Angaben zu den analysierten Proben sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

### **4.4.2.1 Die Bedeutung der PSTs für die Serumkonzentration von polysialyliertem NCAM in der Neuroblastomerkkrankung**

In adulten Patienten werden Serumkonzentrationen oberhalb von 20 kU/L als pathologisch eingeschätzt [215],[218]. Im Kindesalter liegt der durchschnittliche Wert im gesunden Individuum deutlich höher [342]. Erst ab einem Schwellenwert von 60 kU/L wird von einer krankhaften Erhöhung des Serumspiegels ausgegangen [196] und oberhalb eines Levels von 200 kU/L beginnt der Bereich mit einer ungünstigen prognostischen Aussagekraft bezüglich der Neuroblastomerkkrankung [220],[343].

Der Mechanismus über den polysialylierte NCAM-Formen im Serum auftauchen, ist bis heute nicht exakt aufgeklärt worden. In den Arbeiten von Glüer *et al.* [342],[196],[220],[343] wird eine Beziehung zwischen dem Serumlevel und der durch APAAP-Färbung abgeschätzten Anzahl von PSA-positiven Zellen beschrieben, was für eine konstante Freisetzung des Moleküls von der Zelloberfläche spricht. PSA-NCAM wird auch von NK-Zellen und einer Subpopulation von T-Lymphozyten exprimiert [344]. Eine theoretische Möglichkeit ist, daß es als Reaktion auf die Tumorerkrankung zu Schwankungen in der Stärke dieser Zellpopulationen und damit in der Serumkonzentration von polysialyliertem NCAM kommt.

Dagegen spricht allerdings, daß es bei einigen PSA-negativen malignen und gutartigen Tumoren des Kindesalters nicht zu einer Erhöhung von löslichem PSA-NCAM im Serum kommt. Zusätzlich kann im Fall des Neuroblastoms bereits unmittelbar nach der chirurgischen Resektion des Primärtumors ein deutliches Absacken des Serumspiegels von polysialyliertem NCAM beobachtet werden und innerhalb von zehn Tagen erreicht die Konzentration in den meisten Fällen ein nicht-pathologisches Niveau. Vergleichbare Konzentrationsänderungen treten auch nach Therapiebeginn bei Patienten mit einem chemotherapie-sensitiven Neuroblastom auf. Die Abb. 37 verdeutlicht anhand der in dieser Arbeit untersuchten Neuroblastomproben Nr. 3, 6, und 9, daß sehr wahrscheinlich ein direkter Zusammenhang zwischen der Oberflächenexpression von PSA und der Konzentration von polysialyliertem NCAM besteht und die löslichen PSA-NCAM-Moleküle tatsächlich von den Zellen des Tumors freigesetzt werden.

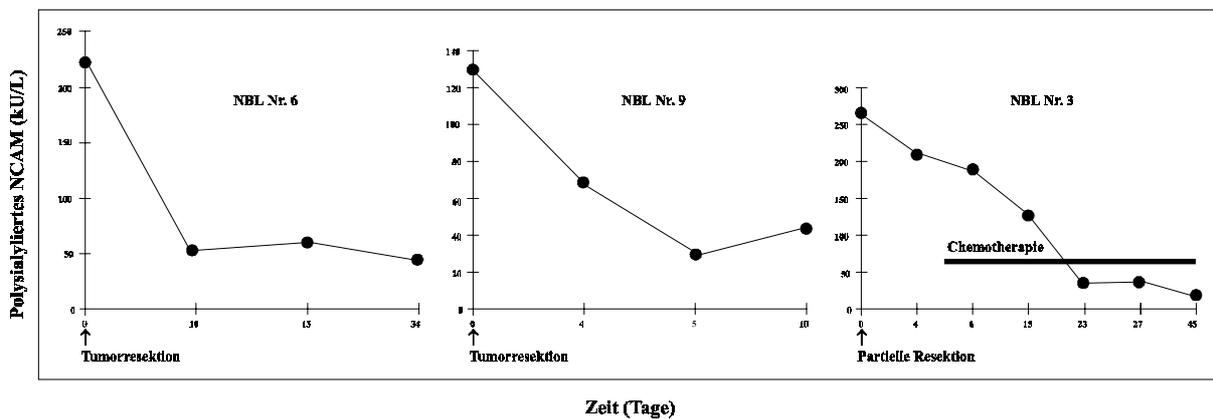
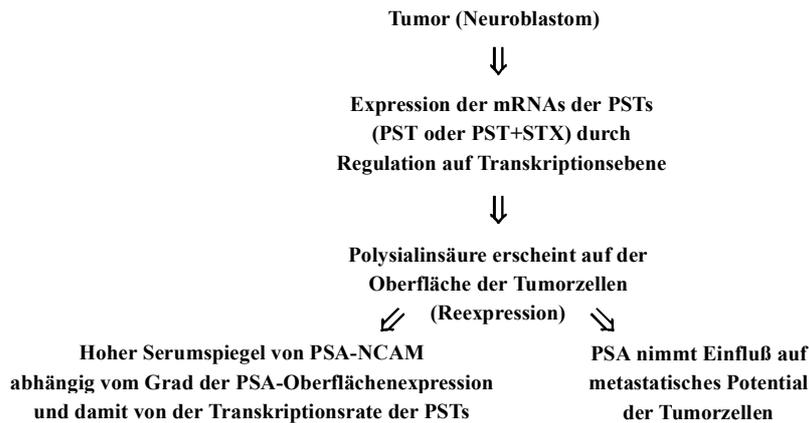


Abb. 37: Verlauf der Serumkonzentrationen von polysialyliertem NCAM während der Neuroblastom-Therapie [196]. Die Grafik wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Sylvia Glüer, MH Hannover. Die Nummern der Neuroblastomproben beziehen sich auf Tab. 2.

Durch die Daten, die im Rahmen dieser Arbeit gesammelt wurden, kann das folgende einfache Modell für eine Reaktionssequenz von der Expression der PSTs bis zum Auftauchen von PSA-NCAM im Serum allerdings nur teilweise bestätigt werden. Vielmehr erhöhen die Ergebnisse die Wahrscheinlichkeit, daß die Freisetzung von PSA-NCAM in das Serum von weiteren Mechanismen und Faktoren beeinflusst wird und das Ausmaß dieser Freisetzung nicht direkt an die Transkriptionsrate der mRNAs der PSTs gekoppelt zu sein scheint:



Veränderungen in der Serumkonzentration von polysialyliertem NCAM werden nicht nur durch Veränderungen in den Expressionsraten der PSTs ausgelöst. Das zeigt sich an der Tatsache, daß sowohl in Proben mit hohem Spiegel, als auch in Proben mit niedrigem Serumwert die Expression der mRNAs der PSTs gefunden werden konnte. Vielmehr scheint die Konzentration von polysialyliertem NCAM die Gesamtanzahl von vitalen, PSA-positiven Tumorzellen zu reflektieren. In den nachfolgenden Abschnitten wird auf die Zusammenhänge zwischen der Expression der PSTs, dem PSA-NCAM-Serumwert und der PSA-Oberflächenfärbung am Beispiel einzelner Proben detaillierter eingegangen.

#### **4.4.2.2 Quantitative Differenzen in den Expressionsraten der mRNAs von PST und STX in Neuroblastomen, nicht-neuroblastom Tumoren und Normalgeweben**

Im Bezug auf die Verteilung von PST und STX in den untersuchten Geweben zeigten alle Neuroblastomproben eine Koexpression der beiden mRNAs. Durch die unterschiedliche Sensitivität von Northern Blot und RT-PCR konnten deutliche quantitative Unterschiede in der Expressionshöhe der mRNAs von PST und STX in zwei der untersuchten Neuroblastome (Nr. 2 u. Nr. 6), dem Rhabdomyosarkom Nr. 11, dem Lymphom Nr. 14, dem Hepatoblastom Nr. 19 und den Normalgewebe mit den Nummern 15, 17, 20 (Nieren) und 16 (Lunge) ausgemacht werden.

### 4.4.2.2.1 Die Expression der PSTs in Neuroblastomen

Als embryonale Tumoren haben das Neuroblastom und das Rhabdomyosarkom die Persistenz unreifer Vorläuferzellen der Embryogenese und damit die Expression von polysialyliertem NCAM gemeinsam. Neuroblasten sind die embryonalen Stammzellen des autonomen Nervensystems und differenzieren nach ihrer Auswanderung aus der Neuralleiste zu Ganglienzellen. Im Falle einer ausbleibenden Reifung persistieren die undifferenzierten Neuroblasten innerhalb des sympathischen Nervensystems und kennzeichnen somit das Neuroblastom als malignen Tumor.

Die in dieser Arbeit untersuchten Neuroblastome zeigten einer starke und regelmäßige Expression des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls, deren Ausmaß unabhängig vom Stadium der Erkrankung war (Ergebnisse nicht dargestellt). Im Gegensatz dazu waren die Signale für die PSA dahingehend graduiert, daß ihre Intensität mit zunehmender Differenzierung der Zellen, ausgedrückt durch die histologische Graduierung (s. 3.4.3.1 u. [322]), abnahm (s. Tab. 2). Es scheint so zu sein, daß die Polysialylierung des NCAM als Spiegel einer zellulären Unreife im Verlauf der Ausdifferenzierung unter den Einfluß von Kontrollmechanismen gerät und folglich herunterreguliert wird.

Der Differenzierungsgrad eines Neuroblastoms, scheint sich auf die Serumkonzentration von polysialyliertem NCAM auszuwirken. In Übereinstimmung mit Glüer *et al.* [343] wurden in der vorliegenden Arbeit in der Tendenz höhere Serumkonzentrationen in undifferenzierten Neuroblastomen, als in stärker differenzierten Ganglioneuroblastomen gefunden. Die Ganglioneuroblastome scheinen erst mit fortschreitendem Krankheitsstadium zur Expression von PSA-NCAM überzugehen. So wurde in der Ganglioneuroblastomprobe Nr. 9, die in das Stadium 2b eingestuft wurde, neben der Oberflächenexpression von PSA auch ein moderat erhöhter Serumspiegel gefunden. Dagegen zeigte die Probe Nr. 8, die in das Stadium 1 eingeordnet wurde, keine PSA auf der Oberfläche und normale Serumlevel.

Eine Beziehung zwischen der Expression der Polysialyltransferasen auf der einen Seite und dem über die APAAP-Färbung bestimmten Grad der PSA-Expression bzw. der Serumkonzentration von PSA-NCAM auf der anderen Seite ist auf den ersten Blick nicht eindeutig zu erkennen. So weisen Neuroblastomproben, die von Patienten mit einem pathologischen Serumspiegel stammen (Nr. 2, 3, 6, 9, 12 und 13), ebenso die Expression von Polysialyltransferasen auf, wie Neuroblastompatienten mit einem Serumwert im Normalbereich (Nr. 1, 4, 5, 8). Weiterhin exprimiert die Neuroblastomprobe Nr. 8 beide Polysialyltransferasen, obwohl in der Immunhistochemie keine PSA-Expression auf der

Oberfläche der Tumorzellen gefunden wurde. In den Neuroblastomproben Nr. 4 und 5 konnte zwar eine starke PSA-Oberflächenfärbung nachgewiesen werden, die Serumspiegel für PSA-NCAM lagen jedoch im normalen Bereich, obwohl beide Primärtumoren eine starke Expression der PSTs demonstrierten.

Die Neuroblastomproben Nr. 1 und Nr. 3 geben ein weiteres Beispiel dafür, daß zwischen der Expression der PSTs und dem Serumspiegel von PSA-NCAM kein direkter Zusammenhang bestehen muß. Die beiden Proben stammen vom selben Patienten und wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen. In der vor Beginn der Chemotherapie entnommenen Probe Nr. 3 wurde die Expression beider PSTs detektiert und ein prognostisch ungünstiger Serumspiegel oberhalb von 200 kU/L gemessen. Zusätzlich konnte durch die APAAP-Färbung eine starke PSA-Oberflächenexpression auf den Tumorzellen gezeigt werden (s. Abb. 26). Nach partieller Resektion des Tumors und eingeleiteter Chemotherapie kam es zu einem imposanten Rückgang der Konzentration von polysialyliertem NCAM im Serum des Patienten auf ein normales Niveau innerhalb von 45 Tagen (s. Abb. 37). Nach drei Monaten wurde erneute Tumormaterial entnommen (Probe Nr. 1) und es zeigte sich, daß die Expression beider Polysialyltransferasen unvermindert nachweisbar war, obwohl der Serumwert für PSA-NCAM zum Zeitpunkt der Entnahme mit 15 kU/L auf unverändert nicht-pathologischem Niveau bestimmt wurde.

#### **4.4.2.2.2 Die Expression der PSTs in Normalgeweben**

Alle analysierten Normalgewebe zeigten normale Serumspiegel von polysialyliertem NCAM (bis auf Nr. 17, s. 4.4.2.2.2.1) und waren in der immunhistochemischen APAAP-Färbung negativ für die Oberflächenexpression von PSA (mit Ausnahme von Nr. 16, s. 4.4.2.2.2.2).

##### **4.4.2.2.2.1 Nieren**

Die Niere leitet sich vom embryonalen Mesoderm ab und ist dennoch ein vorwiegend epitheliales Organ. Polysialyliertes NCAM taucht bereits sehr früh in der renalen Ontogenese auf [345]. Mit der Ausbildung der ersten tubulären Strukturen in polarisierter Organisation wird die Expression deutlich schwächer und verschwindet in späteren Stadien völlig [100],[346]. Übereinstimmend dazu wurde in Northern Blot-Analysen gefunden, daß die humane fetale Niere beide PSTs exprimiert, während im adulten Stadium weder PST- noch STX-mRNA zu finden ist [244]. Gemäß dieser Expressionsverläufe von PSA und den PSTs

konnte in dem ausdifferenzierten Parenchym der in dieser Arbeit untersuchten Nierenproben keine PSA-Expression (s. Abb. 32) und in den Northern Blots keine Transkripte der PSTs nachgewiesen werden (s. Abb. 35 u. Abb. 36). Dennoch exprimierten die Nierenproben Nr. 15 und 17 sehr niedrige mRNA-Level beider PSTs und die Probe Nr. 20 die PST-mRNA. Da die gefundenen mRNA-Expressionsraten in den Nierenproben nachweislich nicht ausreichend für die Synthese detektierbarer PSA-Mengen waren, könnten die nachgewiesenen Mengen an PST- und STX-mRNA als Hintergrund der zellulären Transkriptionsaktivität interpretiert werden, daß nur mit Hilfe der RT-PCR, nicht aber im Northern Blot detektiert werden konnte. Im Fall der Probe Nr. 17 lag der chirurgische Entnahmeort direkt neben einem Wilms-Tumor. Diese Tumorart exprimiert polysialyliertes NCAM und es wurde auch ein leicht erhöhter Serumspiegel im Patientenserum gemessen. Es ist denkbar, daß die Normalgewebeprobe mit Tumorzellen kontaminiert war und auf diesem Weg die RT-PCR-Signale für die PSTs zustande kamen.

#### 4.4.2.2.2 Lunge

In der Lungenprobe Nr. 16 konnte erst durch die RT-PCR ein Signal für die STX-mRNA detektiert werden, während das PST-Signal bereits im Northern Blot sichtbar war. Da in der APAAP-Färbung eine prägnante PSA-Färbung demonstriert werden konnte (s. Abb. 28 u. Abb. 29), war davon auszugehen, daß die Zellen dieses Gewebes eine wesentlich höhere Expressionsrate für die PST-mRNA besitzen als für die STX-mRNA. Eine vergleichbare Verteilung der Expression der beiden PSTs wurde für murines adultes Lungengewebe beschrieben [326]. Die Expression hoher PST-Level in adultem Lungengewebe wird auch die Klonierung der Maus-PST aus einer Lungen-cDNA-Bibliothek bestätigt [228]. Die Befunde zur Expression der PSTs und der PSA stehen in Einklang mit früheren Arbeiten, in denen die Expression beider PSTs in humanem fetalem Lungengewebe konnte [244] und das Vorhandensein von PSA [93] demonstriert werden konnte. Einschränkend muß auch bemerkt werden, daß die Lungenprobe Nr. 16 nur insoweit als Normalgewebe bezeichnet werden darf, als daß keine Tumorerkrankung des Patienten vorlag. Die analysierte Probe stellte eine kongenitale cystische adenomatoide Malformation (CCAM), also eine Fehlbildung des Lungengewebes dar.

### 4.4.2.2.3 Die Expression der PSTs in nicht-neuroblastom Tumoren

#### 4.4.2.2.3.1 Rhabdomyosarkom

Die Histogenese der quergestreiften Muskulatur vollzieht sich über eine Sequenz von Einzelschritten, welche durch Fusion primärer und nachfolgend sekundärer Myoblasten zu Myotubuli und deren Ausreifung zu Muskelfasern gekennzeichnet sind. Diese Prozesse sind, wie auch die Ausbildung neuromuskulärer Verbindungen an die Anwesenheit von NCAM gebunden. Das Rhabdomyosarkom zeigt viele Merkmale des embryonalen Muskels, wie die Existenz unreifer Vorstufen in Form von Rhabdomyoblasten und die Expression von polysialyliertem NCAM in vitalem Tumorgewebe [203]. Das Rhabdomyosarkom Nr. 11 war positiv für beide PSTs-mRNAs in der RT-PCR und zeigte ferner eine deutliche PSA-Oberflächenfärbung in der Immunhistochemie (s. Abb. 34), obwohl sich der Serumspiegel im Normalbereich bewegte.

#### 4.4.2.2.3.2 Hepatoblastom

In der Leberprobe Nr. 18 konnte weder im Northern Blot noch in der RT-PCR ein Signal für eine der beiden mRNAs der PSTs nachgewiesen werden. Das vom selben Patienten stammende Hepatoblastom (Nr. 19) dagegen wurde in der RT-PCR sowohl für die PST- als auch für die STX-mRNA positiv befundet. Im Verlauf der Erkrankung muß es bei diesem Tumor zu einer meßbaren Reexpression beider PSTs-mRNAs gekommen sein, die zwar nicht im Northern Blot, wohl aber in der wesentlich sensitiveren RT-PCR nachweisbar war. Es ist bekannt, daß einige Zellpopulationen in Hepatoblastomen abhängig vom Differenzierungsgrad PSA-NCAM exprimieren [347]. Obwohl im Gewebeschnitt keine Oberflächenexpression von PSA auf der Hepatoblastomzellen gezeigt werden konnte, ist denkbar, daß die RT-PCR-Signale durch Zellen dieses Typs zurückgehen.

### 4.4.2.3 Die N-*myc*-Amplifikation

Ein verlässlicher und weit verbreiteter prognostischer Marker in der Neuroblastomerkrankung ist die Amplifikation des N-*myc*-Gens in den Tumorzellen [321]. Die N-*myc*-Amplifikation im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels Southern Blot-Analysen am Institut für Pädiatrie der Universität Gießen von Dr. H. Christiansen und Dr. F. Lampert untersucht. Von den analysierten Proben wurde eine N-*myc*-Amplifikation in dem Neuroblastom Nr. 3 gefunden,

welches den höchsten Serumwert für polysialyliertes NCAM zeigte. Dies steht in Einklang mit der Studie von Glüer *et al.* [196], nach der eine N-*myc*-Amplifikation immer mit sehr hohen Serumspiegeln verbunden ist. Allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit in einigen Neuroblastomproben, in denen keine Amplifikation gefunden wurden ebenfalls hohe Serumkonzentrationen gemessen (Nr. 2, 6 und 9), so daß nicht von einer gegenseitigen Abhängigkeit der beiden Parameter gesprochen werden kann. Die Verlässlichkeit der N-*myc*-Amplifikation bezüglich einer prognostischen Aussage erreicht die Bestimmung der PSA-NCAM-Serumlevel offenbar nicht und die bislang gewonnenen Daten lassen keine Rückschlüsse auf einen Zusammenhang zwischen der Expression einer oder beider Polysialyltransferase(n) und der N-*myc* Amplifikation als Maß für das Metastasierungspotential eines Tumoren zu.

#### 4.4.2.4 Die APAAP-Methodik zur Bestimmung des PSA-Expression

Der Vorteil der Immunhistochemie an Gewebeschnitten liegt in der Möglichkeit, Antigene mit hoher Sensitivität und Spezifität detektieren und unterschiedlichen histologischen Strukturen zuordnen zu können (Tumorzellen, Normalgewebe, Metastasen, Nekrosebezirke). Die Beurteilung der Anzahl positiver Zellen ist jedoch in einem heterogenen Gewebeschnitt mit Hilfe der Lichtmikroskopie nur schwer objektivierbar. Ebenso sind Einflüsse durch variierende Zelldichte, Signalstärke und Intensität der Hintergrundfärbung zu bedenken. Die Schwankungen in diesen Parametern von Präparat zu Präparat erschweren eine sichere Kategorisierung der Gewebeschnitte hinsichtlich der Zahl PSA-exprimierender Zellen. Desweiteren ist bei der Betrachtung histologischer Schnitte zu beachten, daß diese lediglich Momentaufnahmen dynamischer Prozesse darstellen, die innerhalb eines Gewebeareals durchaus einen heterogenen Charakter besitzen können.

Für die Durchführung der APAAP-Färbungen und die Bestimmung der mRNA-Expression der PSTs mußten natürlicherweise unterschiedliche Teilstücke eines Gewebes verwendet werden. Deshalb ist vorstellbar, daß die in einem Gewebeausschnitt durch die APAAP-Färbung detektierte PSA-Expression nicht automatisch einen Nachweis der Polysialyltransferase(n)-mRNA nach sich ziehen muß. Beispielsweise zeigt die APAAP-Färbung der Nebenniere Nr. 7 eine deutlich PSA-positive Subpopulation innerhalb des Gewebes (s. Abb. 26 u. Abb. 27), obwohl keine Expression der mRNAs von PST oder STX im Gesamtgewebe nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise war die PSA-positive Population im Verhältnis zum vollständigen Probengewebe so stark unterrepräsentiert, daß

selbst in der RT-PCR das Signal nicht detektiert werden konnte. Eine plausible Erklärung für dieses Ergebnis ist jedoch, daß die PSA-positive Randzellschicht zwar in dem Gewebestück, welches für die APAAP-Färbung verwendet wurde, nicht aber in dem der RNA-Präparation zugrundeliegenden Probenanteil enthalten war.

### **4.4.2.5 Komplexe Hybridisierungsmuster der PSTs in den Northern Blot-Analysen**

Während im humanen Gesamtgehirn für die PST ein Hybridisierungssignal mit einem Molekulargewichten von 6.8 kb auftrat (s. Abb. 21), zeigten einige der untersuchten humanen Tumorzelllinien (KG-1a<sup>+</sup>, TE671, IMR-32; s. Abb. 24) reproduzierbar komplexe mRNA-Expressionsmuster, bestehend aus mindestens 5 Banden mit Molekulargewichten zwischen 6.8 und 1.5 kb. Zwar finden einige Autoren in humanen Normalgeweben sporadisch ein kleineres PST-Transkript, das vergleichbar zu der 2.1 kb Bande im Rattengesamtgehirn ist (s. Abb. 20), doch ein derartig komplexes PST-Hybridisierungsmuster konnte bisher in keinem humanen Normalgewebe beobachtet werden. Ebenso wenig zeigten die bislang untersuchten Maus- und Rattennormalgewebe sowie Maus- und Hamsterzelllinien diese Komplexität. Durch die Northern Blot-Analysen in humanen Neuroblastomproben konnte demonstriert werden, daß dieses Phänomen für die PST nicht nur in humanen Tumorzelllinien, sondern auch in soliden Primärtumoren auftritt. Die Northern Blots ergaben im Fall der Neuroblastome Nr. 1 und Nr. 2 ein PST-Hybridisierungsmuster, das nahezu identisch zu dem in humanen Zelllinien gefundenen Muster zu sein scheint (vergleiche Abb. 24 u. Abb. 35).

Für die STX konnte in einigen mittels Northern Blot analysierten Proben ebenfalls ein komplexes Bandenmuster aus mindestens 4 Banden mit Molekulargewichten zwischen 6.3 kb und 1.0 kb detektiert werden. Diese Komplexität trat in den humanen Tumorzelllinien SH-SY5Y und TE671 (s. Abb. 24), in den Neuroblastomproben Nr. 1, 3, 4 und 5, (s. Abb. 36) aber auch in fetalem humanem Gesamtgehirn (s. Abb. 21) auf, so daß es sich im Gegensatz zur PST nicht um eine echte tumorspezifische Heterogenität zu handeln scheint. Allerdings wurde ein derart komplexes STX-Hybridisierungsmuster in Normalgeweben bisher von keinem anderen Autor beschrieben und vergleichende Analysen in Primärtumoren fehlen bislang völlig. Über die mögliche Bedeutung der gefundenen komplexen Transkriptmuster von PST und STX, etwa in der physiologischen Regulation der Polysialyltransferasen oder in der Biologie von Neuroblastomen bzw. primären Tumorzellen sind auf der Grundlage der heutigen Erkenntnislage keine Aussagen möglich. Bei der Aufklärung der Rolle der PSTs in

der Reexpression von polysialyliertem NCAM auf malignen Tumoren sollten die beobachteten komplexen Signalmuster aber keinesfalls außer acht gelassen werden.

### 4.4.2.6 Ausblick

Um Aussagen über mögliche Korrelationen zwischen der Expression der Polysialyltransferasen PST und STX und der Diagnose bzw. dem Verlauf einer neuroendokrinen Tumorerkrankung treffen zu können, ist sicherlich die Analyse weiterer Neuroblastome und auch weiterer Tumorspezies, wie z.B. von Rhabdomyosarkomen und Wilms-Tumoren, notwendig. Die im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methoden zur Bestimmung der mRNA-Level waren in der Rückschau wenig geeignet, um feine Abstufungen der Expression von PST und STX innerhalb einer Probe oder zwischen verschiedenen Proben darzustellen. Die Northern Blot-Analysen waren für die Detektion sehr niedriger "message"-Level nicht sensitiv genug und damit unbrauchbar für exakte quantitative Aussagen. Die in dieser Arbeit angewandte RT-PCR war zwar in der Lage, auch niedrigste mRNA-Level verlässlich nachzuweisen, verwischte jedoch gleichzeitig bestehende Unterschiede in der Expressionshöhe. Für eine weitere Aufklärung der biologischen Rolle der PSTs in der Freisetzung von löslichem PSA-NCAM müssen deshalb quantitative Methoden, wie z. B. eine kompetitive quantitative RT-PCR oder ein "RNase Protection Assay", etabliert und eingesetzt werden.

Auch der Einsatz von *in situ*-Hybridisierungssonden zum direkten Nachweis der mRNAs der PSTs im Tumorgewebe könnte ein Weg sein, um PSA-exprimierende Gewebeareale besser mit solchen zu vergleichen, die die PST- bzw. STX-Transkripte exprimieren. Da die Bestimmung der mRNA-Konzentration jedoch nicht mit der Menge des Translationsproduktes korrelieren muß, ist zusätzlich auch der Einsatz spezifischer Antikörper zur Erfassung der aktiven Enzymkonzentration vorstellbar. Im Hinblick auf dieses Ziel werden derzeit monoklonale Antikörper gegen PST und STX innerhalb unserer Arbeitsgruppe generiert.

## 5 MATERIAL UND METHODEN

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen zur PSTs-Expression im Rattenhirn mit Hilfe von Northern Blots und *in situ*-Hybridisierungen (s. 3.4.1.1 u. Abb. 20) wurden weibliche und männliche Wistar-Ratten in strikter Übereinstimmung mit den deutschen Richtlinien des *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* in Kollaboration mit Dr. Herbert Hildebrandt am Institut für Zoologie der Universität Stuttgart-Hohenheim gehalten. Zur Präparation der Rattenhirne wurden die Tiere mit 80% CO<sub>2</sub>/20% O<sub>2</sub> anästhesiert und anschließend dekapitiert. Die schnell entnommenen Gehirne wurden entweder sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren oder in "Tissue Tec" (Miles Inc.) eingelegt und bei -80°C aufbewahrt. Um individuelle Unterschiede auszuschließen wurden für jedes der untersuchten Stadien Gehirne verschiedener Tiere aus drei unterschiedlichen Würfen gesammelt.

#### 5.1.2 Gewebeproben und Gefrierschnitte

Alle Proben von soliden Tumoren stammten aus der Kinderchirurgie der MHH. Im Rahmen einer chirurgischer Resektion oder Biopsie wurde nach Entnahme von repräsentativem Material für die konventionelle histologische Befundung verbliebenes Gewebe möglichst aus der Mitte des Tumors in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Gefrierschnitte (4-6 µm Stärke) wurden bei -25°C an einem Kryostaten (Frigocut 2700, Reichert-Jung) in der Konsekutivtechnik angefertigt, auf mit Poly-L-Lysine (Sigma) beschichtete Objektträger aufgebracht und bei rt über Nacht getrocknet. Bis zur Aceton-Fixierung, die erst unmittelbar vor der APAAP-Färbung (s. 5.2.1.6) durchgeführt wurde, wurden die Präparate bei -80°C gelagert.

#### 5.1.3 Zelllinien

<b>TE671</b>	ATCC-Nr.: CRL-7774 Humane Rhabdomyosarkomlinie [348],[349],[350]
<b>KG-1a<sup>+</sup></b>	ATCC-Nr.: CCL 246.1 Humane, PSA-positive Sublinie der akut myeloischen Leukämie Linie KG-1a [351] (Hergestellt von Dr. R. Gerardy-Schahn).
<b>H69 (HTB 54.2)</b>	ATCC-Nr.: HTB-119 Humaner, PSA-positiver Subklon der kleinzelligen Bronchialkarzinomlinie H69 [352] (Hergestellt Dr. R. Gerardy-Schahn).

<b>IMR-32</b>	ATCC-Nr.: CCL-127 Humane Neuroblastomlinie [353]
<b>SH-SY5Y</b>	ATCC-Nr.: CRL-2266 Humane Neuroblastomlinie [354] Dreifach subklonierte Linie der Neuroblastomlinie SK-N-SH (ATCC HTB-11)
<b>SK-NEP-1</b>	ATCC-Nr.: HTB-48 Humane Wilms-Tumorlinie [355]
<b>NB-11</b>	Humane Neuroblastomlinie Die Zelllinie wurde in der Kinderklinik der MHH aus einem Primärtumor etabliert.
<b>HeLa-229</b>	ATCC Nr.: CCL-2.1 Humane Zervixkarzinomlinie [356]

### 5.1.4 Bakterienstämme

*E. coli* DH5 $\alpha$ : Genotyp: F<sup>-</sup>  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ (*lacZY-A-arg-F*)U169, *recA1*, *endA1*,  
*hsdR17*(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>), *supE44*,  $\lambda$ <sup>-</sup>, *thi-1*, *gyrA*, *relA1*

### 5.1.5 Plasmide und Vektoren

pBluescript SK(-)	Stratagene
pSEAP2-Control	Clontech
pSEAP2-Enhancer	Clontech
pGEM <sup>®</sup> -T-Vector Systems	Promega
pAd10SacII	RZPD Berlin. Klonierungsvektor für P1-Phageninserts.
pBS <sub>m</sub> STX	Zur Verfügung gestellt von Dr. S. Tsuji, RIKEN, Japan. Codierende Sequenz der murinen STX-cDNA im Vektor pBluescript SK(-).
pRc/CMV-N39N22	Codierende Sequenz der murinen 180 kDa NCAM-Isoform-cDNA im Vektor pRc/CMV (Invitrogen).
pAH24	Codierende Sequenz der Hamster PST-cDNA im Vektor pBluescript SK(-).

### 5.1.6 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden im Rahmen dieser Arbeit als Sonden bei Hybridisierungen von Blots, für Sequenzierungen und PCR-Analysen eingesetzt. Die Oligonukleotide wurden aus experimentell ermittelten oder publizierten DNA-Sequenzen abgeleitet und als Auftragssynthese von den Firmen Pharmacia Biotech oder MWG Biotech bezogen. Vorhandene Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Human Clontech GenomeWalker™ Kit:

AP1 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

AP2 5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3'

Clontech Marathon-Ready™ cDNA Kit:

AP1 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

AP2 5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'

RT-Primer für humanes  $\beta$ -Actin 5'-AACCGACTGCTGTCACCTTCACCGTAA-3'

PCR-Primer 1 für humanes  $\beta$ -Actin 5'-TGACGGGGTCACCCCACTGTGCCCAT-3'

PCR-Primer 2 für humanes  $\beta$ -Actin 5'-AGTCATAGTCCGCCTAGAAGCATTGTC-3'

CB4 5'-TCTCAGAGATCGAAGAAG-3'

CB33 5'-TCCGTCATTGAGACTTATTCAT-3'

CB36 5'-TGGGTTCTGGTTCTGATCCAG-3'

CB39 5'-CACATTTAATGTTTTGAATTCT-3'

CB44 5'-TGCTTTACACACTTTCCTGT-3'

CB54 5'-GACTTATTGTGCAGATCGTCCACCTCT-3'

CB55 5'-CTTGGGTGCCCGAGAAAGTCCTGGTT-3'

CB59 5'-ATTTGGAACTCCTCACGCAGAAGTCA-3'

CB60 5'-CTCCAATCCCCTTAACTTCATTGCG-3'

CB61 5'-TACATCTTCGATCGAGACAGCA-3'

CB63 5'-TGCTTCAGGATAAGCTCGTTGA-3'

CB73 5'-GCCTGTCAAGCACATAGTGTATGACATC-3'

CB79 5'-TCAAAGCTGACAAGGAAGTAAGCCAAGC-3'

CB80 5'-AGGAGTATGCGCAACTCCAGAGAGTAAT-3'

CB98 5'-GCGCCGCCTCCCTGGGGCTCAGGTTTCTTT-3'

CB100 5'-TAGAATTCCTTGGGTGCCCGAGAAAGTCCTGGTTGCCC-3'

CB101 5'-TAAAGCTTGCACAGAGCAGGCAGAGCCGGGGACGTTAC-3'

CB102 5'-TAAAGCTTCCAGCTGCAGAAGCTGCCGCCACCTCCAAT-3'

CB103 5'-TAGAATTCGGTGGGTTTCGCGCCCGCCAGGACCCAAGCG-3'

CB104 5'-TAAAGCTTAAGCAAAGGCTAGCGCCTGGACGCTGGAGT-3'

CB105 5'-TAAAGCTTGACTCGTCCGGAGCGCAGGGTGTCTGCCCA-3'

### 5.1.7 Antikörper

<b>Anti-DIG-AP</b>	Fab-Fragmente, 750 U/mL, in: 50 mM Triethanolamin-Puffer, 3 mM NaCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 0.1 mM ZnCl <sub>2</sub> , 1% BSA; pH 7.6
<b>MB2</b>	anti-NCAM mAk (Maus IgG1). Erkennt ein Epitop in der 3. Ig-ähnlichen Domäne des NCAMs [357]. Hergestellt von Dr. M. Husmann, Mainz.
<b>KD11</b>	anti-NCAM mAk (Maus IgG1). Erkennt den C-Terminus der Isoformen NCAM-140 und NCAM-180 [357]. Hergestellt von Dr. M. Husmann, Mainz.
<b>123C3</b>	anti-NCAM mAk (Maus IgG1). Erkennt ein Epitop in der ersten FNIII-Domäne des humanen NCAM [358],[357]. Zur Verfügung gestellt von Dr. R. Michalides, Amsterdam.
<b>735</b>	anti-PSA mAk (Maus IgG2a). Erkennt $\alpha$ 2,8-verknüpfte Neu5Ac ab einer Kettenlänge von acht Resten [359],[130]. Zur Verfügung gestellt von den Behring Werken, Marburg.

### 5.1.8 Chemikalien

Agarose (Electrophoresis Grade)	Gibco BRL
Ampicillin	Bayer
ATP	Amersham Pharmacia
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Hefeextrakt	Difco
Bacto-Trypton	Difco
BCIP	Roth
Blockierungsreagenz	Boehringer
BSA (Fraktion V)	Boehringer
CSPD Ready To Use <sup>®</sup>	Boehringer
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma
dNTPs (je 100 mM ATP, CTP, GTP, TTP)	Amersham Pharmacia
Methylenblau	Sigma
NBT	Fluka
Phenol	Roth
RNasin	Promega
Spermidin	Sigma
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Serva
Triethylamin	Sigma
tRNA (aus Bäckerhefe)	Boehringer

Alle weiteren Chemikalien wurden in p.A. Qualität von der Firma Merck bezogen.

### 5.1.9 Enzyme

Alkalische Phosphatase	EC 3.1.3.1	Boehringer
DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment	EC 2.7.7.7	Amersham Pharmacia
Polynukleotidkinase	EC 2.7.1.78	Amersham Pharmacia
Proteinase K	EC 3.4.21.14	Boehringer
Restriktionsendonukleasen		Amersham Pharmacia New England Biolabs
RNase A	EC 3.1.27.5	Boehringer
RNase freie DNase I	EC 3.1.21.1	Promega
RNase H	EC 3.1.26.4	Gibco BRL
SuperscriptII™ Reverse Transkriptase	EC 2.7.7.49	Gibco BRL
T3-RNA-Polymerase	EC 2.7.7.6	Boehringer
T7-RNA-Polymerase	EC 2.7.7.6	Boehringer
T4-DNA-Ligase	EC 6.5.1.1	Gibco BRL
T4-Polynukleotidkinase	EC 3.1.21.1	Boehringer
Taq DNA Polymerase	EC 2.7.7.7	Sigma
Terminale Transferase	EC 2.7.7.31	Gibco BRL

### 5.1.10 Molekulargewichtsstandards

0.24-9.5 kb RNA Ladder	Gibco BRL
1 kb DNA Ladder	Gibco BRL
λ-DNA/HindIII-Fragments	Gibco BRL
SDS-PAGE Molecular Weight Standards	BioRad

### 5.1.11 Kits

Human Internal Screening Kit, Ambion  
Human GenomeWalker™ Kit, Clontech Laboratories, Inc.  
Advantage® Genomic PCR Kit, Clontech Laboratories, Inc.  
Advantage® cDNA PCR Kit, Clontech Laboratories, Inc.  
Marathon-Ready™ cDNA Amplification Kit, Clontech Laboratories, Inc.  
T<sub>7</sub>-Sequencing Kit, Amersham Pharmacia Biotech  
Great EscAPE™ SEAP Reporter System 2-Kit, Clontech Laboratories, Inc.  
Great EscAPE™ SEAP Chemiluminescence Detection Kit, Clontech Laboratories, Inc.  
QuickPrep® *Micro* mRNA Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech  
DIG Oligonucleotide Tailing Kit, Boehringer Mannheim  
DIG Luminescent Detection Kit, Boehringer Mannheim

GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech  
High Pure™ Plasmid Isolation Kit, Boehringer Mannheim  
QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen  
Plasmid Kit (Midi u. Maxi), Qiagen  
Plasmid Maxi Kit, Qiagen  
5'-RACE-Kit, Gibco BRL  
pGEM®-T-Vector Systems, Promega  
PCR DIG Probe Synthesis Kit, Boehringer Mannheim

### 5.1.12 Sonstige Materialien

Filterpapier 3MM	Whatman
Hyperfilm MP	Amersham
Millex-GV Filter (0.22 µm, steril)	Millipore
Nitrocellulose 0.1 µm	Schleicher&Schüll
Qiabran Nylonmembran	Qiagen
Transfektionsreagenz Lipofectamine	Gibco
Transfektionsreagenz Effectene	Qiagen
Human Fetal Brain PolyA <sup>+</sup> -RNA	Clontech (Katalog#(1997):6525-1)

### 5.1.13 Standardpuffer und Medien

Die nachfolgenden Puffer und Lösungen wurden häufiger verwendet und werden in ihrer Zusammensetzung an den entsprechenden Stellen des Methodenteils nicht mehr beschrieben. Die Sterilisation erfolgte bei Bedarf durch Autoklavieren bei 121°C für 20 min. Außer bei Tris-haltigen Puffern, wurde allen Lösungen, die für das Arbeiten mit RNA bestimmt waren, 0.1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) zugesetzt. Diese DEPC-haltigen Lösungen wurden nach einer Inkubationszeit von 16 h bei rt zweifach autoklaviert.

APAAP-Färbelösung (nicht autoklavieren):

Lösung A	2.5 mg Naphtol-As-Biphosphat
	50 µL Dimethylformamid
Lösung B	5.2 mg Natriumnitrit
	125 µL New-Fuchsin-Lösung (4 %)
	125 µL H <sub>2</sub> O
Färbelösung	50 µL Lösung A
	250 µL Lösung B
	20 µL 1 M Levamisol
	ad 10 mL mit Tris-Puffer 2

## Material und Methoden

---

"High SDS"-Hybridisierungslösung	7 % SDS 50 % deionisiertes Formamid 5 x SSC 2 % Blockierungsreagenz 50 mM Natriumphosphat pH 7.0 0.1 % N-lauroylsarcosin
H <sub>2</sub> O	Ampuwa (Fresenius), 2 mL Ampullen
Standard-Natriumhybridisierungslösung	6 x SSC 5 x Denhardts-Lösung 0.3 M Natriumphosphat pH 6.8 0.1 % SDS 100 µg/mL frisch denaturierte Fischsperm-DNA
Maleinsäure-Puffer	0.1 M Maleinsäure 0.15 M NaCl Einstellen mit NaOH-Plätzchen auf pH 7.5
Wasch-Puffer für DIG-Detektion	Maleinsäure-Puffer, 0.3 % Tween-20
Tris-Puffer 1 (für APAAP-Färbung)	50 mM Tris-HCl, pH 7.4 0.2 M NaCl 0.02 % Natriumazid
Tris-Puffer 2 (für APAAP-Färbung)	2.5 mM Tris-HCl, pH 9.2 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM ZnCl <sub>2</sub>
Blockierungslösung für DIG-Detektion	1 % Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer
Alkalische Phosphatase-Puffer für DIG-Detektion	0.1 M Tris-HCl, pH 9.5 0.1 M NaCl
LB-Medium	1 % Bacto-Trypton 0.5 % Bacto-Hefeextrakt 1 % NaCl pH 7.5

## Material und Methoden

---

LB-Agar-Platten	LB-Medium 1.5 % Bacto-Agar
5 x GEBS	50 mM EDTA pH 8.0 20 % Glycerol 0.5 % Sarkosyl 0.25 % Bromphenolblau
Laemmli-Probenpuffer	250 mM Tris-HCl pH 6.8 20 % Glycerin 5 % SDS 5 % $\beta$ -Mercaptoethanol 0.1 % Bromphenolblau
RNA-Auftragspuffer	50 % Formamid 2.2 M Formaldehyd 10 mM EDTA 20 % Glycerol 0.2 % Bromphenolblau 50 $\mu$ g/mL Ethidiumbromid
RNA-Laufpuffer	20 mM MOPS pH 7.0 8 mM Natriumacetat 5 mM EDTA pH 8.0
50 x Denhardt's	1 % Ficoll 400 1 % Polyvinylpyrrolidon 1 % BSA
PBS	10 mM Natriumphosphat pH 7.4 150 mM NaCl
PBS-EDTA	PBS 2 mM EDTA
Lysispuffer	50 mM Tris-HCl pH 8.0 1 mM $MgCl_2$ 1 % NP-40 1 mM PMSF 100 U/mL Aprotinin

## Material und Methoden

---

20 x SSC	3 M NaCl 0.3 M Natriumcitrat pH 7.0
TAE	40 mM Tris-Acetat pH 8.1 1 mM EDTA
TBE	100 mM Tris-HCl pH 8.0 100 mM Borsäure 2.5 mM EDTA
TBS	20 mM Tris-HCl pH 7.4 150 mM NaCl
Denaturierungslösung	0.5 M NaOH 1.5 M NaCl
Natrium-Phosphatpuffer	1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Einstellen mit 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> auf pH 6.8
Neutralisierungslösung	1 M Tris-HCl pH 7.4 1.5 M NaCl
Prewash-Lösung	5 x SSC 0.5 % SDS 1 mM EDTA pH 8.0
TAE	40 mM Tris-Acetat pH 8.1 1 mM EDTA pH 8.0
T/E-Puffer 10/1	10 mM Tris-HCl pH 8.0 1 mM EDTA pH 8.0

### 5.1.14 Software für IT

Corel DRAW, Version 7.373

Corel PHOTO-PAINT, Version 7.373

Lasergene DNASTar: EditSeq

Lasergene DNASTar: MegAlign

Microsoft Word für Windows 95, Version 7.0a

Reference Manager Professional Edition, Version 8.01

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 5.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Alle Zellen wurden bei 37°C in Gegenwart von 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. SH-SY5Y-Zellen wurden in DMEM (10% FCS, 2 mM Glutamin), H69-Zellen in RPMI (5% FCS, 2 mM Glutamin) und alle übrigen Zelllinien in DMEM (5% FCS, 2 mM Glutamin) kultiviert. Allen Medien wurde Penicillin (500 U/mL) und Streptomycin (500 µg/mL) zugesetzt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert (alle 3 bis 4 Tage). Das Ablösen adhärenter Zellen erfolgte durch Inkubation mit PBS-EDTA.

#### 5.2.1.2 Auftauen von Zellen

Nach der Entnahme aus dem Tank mit flüssigem Stickstoff wurden die Zellen sofort in einem Wasserbad bei 37°C unter leichtem Schütteln aufgetaut (1-2 min) und anschließend tropfenweise mit 20 Volumen des entsprechenden Mediums (10% FCS) verdünnt. Nach Zentrifugation (200 x g/10 min) wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen (Greiner) überführt.

#### 5.2.1.3 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit PBS/EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst (falls adhärent) und durch Zentrifugation (200 x g/10 min) sedimentiert. Das Pellet wurde in Einfriermedium (DMEM, 20% FCS und 10% DMSO) aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und bei -70°C eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

#### 5.2.1.4 Transiente Transfektion

##### 5.2.1.4.1 Lipofectamine [360]

Die transiente Transfektion von Zellen für Promotoraktivitätstests erfolgte in 6-well Platten (Greiner, Durchmesser 35mm/well). 18 h vor Transfektionsbeginn wurden die Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  pro well ausgesät, so daß sie zu Transfektionsbeginn eine Konfluenz von ca. 70% erreicht hatten. Die Zellen wurden zweimal mit PBS und einmal mit OptiMEM gewaschen und für 7 Stunden mit 1 mL Transfektionsgemisch inkubiert. Zur Herstellung von 1 mL Transfektionsgemisch wurden 1 µg DNA und 6 µL Lipofectamine (beides in je 100 µL OptiMEM vorverdünnt) in einem Polystyrolröhrchen gemischt, für 30 min bei rt inkubiert und mit 800 µL OptiMEM verdünnt. Die Transfektion wurde durch Zugabe von 2 mL Medium mit 10 % FCS gestoppt. 24 h nach Transfektionsbeginn erfolgte ein Medienwechsel, wonach die Zellen für SEAP-Reporterassays weitere 48-72 h kultiviert wurden.

### 5.2.1.4.2 Effectene [361]

Das Transfektionsreagenz Effectene (Qiagen) wurde zur Transfektion der Suspensionszelllinie KG-1a<sup>+</sup> in 6-well Platten (Greiner, Durchmesser 35mm/well). eingesetzt. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion gesplittet und am Tag der Transfektion in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen pro well ausgesät. Für die Transfektion der Zellen wurde 1 µg der jeweiligen Plasmid-DNA eingesetzt. Die Transfektionsprozedur wurde exakt nach dem Protokoll des Herstellers für die transiente Transfektion von Suspensionszellen durchgeführt. Im Anschluß wurden die Zellen für SEAP-Reportergenassays 48-72 h kultiviert.

### 5.2.1.5 Durchflußzytometrie

Die Oberflächenexpression von polysialyliertem NCAM wurde bestimmt durch die parallele Inkubation der entsprechenden Zellen mit NCAM-spezifischen mAks und dem PSA-spezifischen mAk 735, gefolgt durch die Färbung mit einem sekundären Ratte Anti-Maus Kappa Phycoerythrin-Konjugat (Becton Dickinson). Die Antikörperfärbungen für die Durchflußzytometrie wurden in 96-well Mikrotiterplatten mit  $2.5 \times 10^5$  Zellen pro Färbung vorgenommen. Alle Inkubations- und Zentrifugationsschritte erfolgten auf Eis bzw. bei 4°C. Die Zellen wurden mit PBS-EDTA abgelöst, zweimal mit je 150 µL FACS-Medium (FM: PBS, 1% BSA) gewaschen, in 20 µL humanen Immunglobulinen (5 mg/mL in FM) resuspendiert und für 20 min mit 20 µL Primärantikörper-Lösung (mAk MB2 1:100, mAk 735 1:300 verdünnt in FM) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 150 µL FM wurden die Zellen für 20 min mit 20 µL Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit FM wurden die Zellen in 200 µL FM aufgenommen. Die Messung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte an einem FACScan Durchflußzytometer der Firma Becton Dickinson im Institut für Klinische Immunologie der MH Hannover.

### 5.2.1.6 Immunhistochemie / APAAP-Methode

#### 5.2.1.6.1 APAAP-Färbung

Die Immunfärbung von Gefrierschnitten (s. 5.1.2) erfolgte mit der Alkalischen Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase Reaktion (modifiziert nach [362]). Die Fixierung der Gefrierschnitte wurde für 10 min in -20°C kaltem Aceton unmittelbar vor der Färbung durchgeführt. Die Präparate wurden anschließend luftgetrocknet und mit einem PAP-Pen (SCI-Sciences Services) markiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte für 15 min mit 50 µL deaktiviertem Kaninchen-Non-Immuserum (1:10-Verdünnung in PBS, 0.5% BSA; Zentrales Tierlabor der MHH) überschichtet und anschließend für 1 h mit 50 µL einer 1:700-Verdünnung des Primärantikörpers (Anti-PSA spezifischer mAk 735, 3µg/mL; s. 2.5 u. 5.1.7) schüttelinkubiert. Um der Austrocknung der Präparate vorzubeugen, wurden alle Ak-Inkubationsschritte in einer "feuchten Kammer" durchgeführt. Die Schnitte wurden gründlich mit Tris-Puffer 1 gewaschen, daraufhin für 1 h mit 50 µL Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Maus, 1:500 in PBS, 0.5% BSA; Dako) überschichtet und erneut gewaschen. Nach der Inkubation mit dem APAAP-Komplex (1:100 in PBS, 0.5% BSA; Dako) für 30 min wurde ausgiebig gewaschen und zur Signalverstärkung die Inkubation mit dem zweiten Antikörper und alle

nachfolgenden Schritte wiederholt (je 30 min). Im Anschluß an die zweite APAAP-Komplex-Behandlung wurde mit Tris-Puffer 2 gewaschen. Die Präparate wurden zur Darstellung der Antigen-Antikörperbindung für 30 min mit 50 µL APAAP-Färbelösung in der Dunkelheit inkubiert. Nachdem reichlich mit H<sub>2</sub>O gespült worden war, erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun-Lösung (Merck) für 1 min. Im Anschluß wurden die Objektträger für 5 min in H<sub>2</sub>O geschwenkt, über Nacht getrocknet und am darauffolgenden Tag mit Glyceringelantine eingedeckt.

### 5.2.1.6.2 Auswertung und Darstellung

Die Färbung, Auswertung und fotografische Dokumentation der Präparate wurde in der Kinderklinik der MHH an einem Durchlichtmikroskop (Aristoplan; Leitz) mit Fotoaufsatz (Orthoplan E; Leitz) unter Verwendung von Kunstlichtdiafilmen (Ektachrom, 64 ASA Lichtempfindlichkeit; Kodak) vorgenommen. Positive Signale stellen sich mit der APAAP-Technik abhängig vom Bindungsort des verwendeten Primärantikörpers als rote Farbsignale von entweder Cytoplasma, Zellmembran oder Filamentstrukturen dar, während die Zellkerne dunkelblau gegengefärbt sind. Die Spezifität der Färbung mit dem Antikörper 735 gegen PSA wurde durch Vorbehandlung jeweils eines von zwei parallelen Schnitten pro Tumor mit EndoN<sub>E</sub> (s. 2.5) überprüft. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37°C. Danach wurden die Präparate gründlich in Tris-Puffer 1 gespült und auf identische Weise wie die nicht vorbehandelten Schnitte gefärbt. Als zusätzliche Negativkontrollen wurde eine Pufferkontrolle mit Tris Puffer 1 ohne Primärantikörper und eine Kontrolle mit irrelevanten Antikörpern (Anti-Neurofilament-AK bei nicht-neuralen Zellen und anti-Desmin-Ak bei Zellen neuronalen Ursprungs) durchgeführt.

## 5.2.2 Biochemische Methoden

### 5.2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) [363]

Proteine wurden in SDS-Polyacrylamidgelen (0.8 mm) bestehend aus einem 3%igen Sammelgel (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% SDS, 3% Polyacrylamid) und einem 7%igen oder 8%igen Trenngel (375 mM Tris-HCl, pH 8.8, 0.1% SDS, 7 bzw. 8% Polyacrylamid) aufgetrennt. Für diese Gele wurde eine Acrylamid-Stammlösung bestehend aus 30% Acrylamid und 0.8% N,N'-Methylendiacylamid verwendet. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0.1% TEMED und 0.1% Ammoniumpersulfat gestartet. Die Proben wurden vor dem Auftrag 1:2 mit Laemmli-Puffer versetzt und für 3 min gekocht oder für 20 min auf 60°C erhitzt, wenn die Proben hitzelabile PSA-haltige Proteine enthielten. Die Auftrennung erfolgte zunächst bei 8 V/cm und nach Erreichen des Trenngels bei 20 V/cm in Elektrophoresepuffer (50 mM Tris, 380 mM Glycin, 0.1% SDS). Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele auf Nitrocellulose geblottet (s. 5.2.2.2).

### 5.2.2.2 Western Blot

#### 5.2.2.2.1 "Semi-dry"-Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose [364]

In der SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden mit Hilfe einer "Fastblot B 33"-Blotkammer (Biometra) bei einer Stromstärke von 2 mA/cm<sup>2</sup> für 1.5 h auf Nitrocellulose übertragen. Als Pufferreservoir wurden über und unter dem Gel je drei Lagen mit Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin) getränktes 3MM-Filterpapier (Whatman) verwendet. Zur Überprüfung des Transfers und zur Darstellung der Molekulargewichtsmarker wurde die Nitrocellulose für 5 min in Ponceau S-Lösung (0.2% w/v Ponceau S in 3% TCA) gefärbt und unter fließendem Wasser entfärbt.

#### 5.2.2.2.2 Spezifische Färbung mit Antikörpern [365]

Nitrocellulosemembranen wurden für 30 min bei rt oder über Nacht bei 4°C in MM-TBS (2% Magermilch in TBS) abgesättigt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (5 mg/mL bei gereinigten mAks) erfolgte für 1 h. Anschließend wurden die Membranen dreimal für je 5 min in TBS gewaschen und für 30 min mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus-Ig-Alkalische-Phosphatase-Konjugat, 1:3000 in MM-TBS) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS und einmaligem Waschen mit AP-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) wurden die Membranen mit BCIP und NBT (165 bzw. 330 mg/mL in AP-Puffer) gefärbt. Die Farbreaktion wurde durch Spülen mit destilliertem H<sub>2</sub>O gestoppt.

### 5.2.3 Molekularbiologische Methoden [366],[367]

#### 5.2.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion [368]

Zur Extraktion von Proteinen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen wurde der mit H<sub>2</sub>O auf 100 µL aufgefüllten Nukleinsäurelösung ein gleicher Volumenteil eines eiskalten Phenol/ Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) zugesetzt. Nach gründlichem Mischen durch Vortexen wurde zur Unterstützung der Phasentrennung 3 min bei 15000 x g zentrifugiert. Die obere, wäßrige Phase wurde in ein neues Gefäß pipettiert. Da eventuell verschleppte Phenolreste nachfolgende Enzymaktivitäten hemmen, konnte mit Chloroform/ Isoamylalkohol 24:1 nach gleichem Schema nachextrahiert werden.

#### 5.2.3.2 Ethanol- und Isopropanolpräzipitation von Nukleinsäuren [369]

Natriumacetatfällung:

Die Nukleinsäurelösung wurde mit  $\frac{1}{10}$  des Volumens Natriumacetat (3 M, pH 5.2) und dem 2.5-fachen Volumen eiskaltem 96%igen Ethanol versetzt und für 30 min bei -70°C gefällt. Bei Konzentrationen im Nanogrammbereich wurde zur effizienteren Präzipitation vor der Alkohol-Zugabe 1 µL Glykogenlösung als Träger zugesetzt. Anschließend wurde bei 15000 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet einmal mit 1 mL eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen (15 min, 4°C, 15000 x g). Nach dem Dekantieren der Waschlösung wurde das Pellet unter Vakuum getrocknet und in TE10/1 oder H<sub>2</sub>O gelöst.

Lithiumchloridfällung:

Diese Fällung wurde zur Abtrennung nicht inkorporierter Nukleotide beim "Labeling" von Oligonukleotiden mit DIG-dUTP eingesetzt. Die markierten Sonden wurden mit  $\frac{1}{10}$  des Volumens 4 M LiCl und dem 2.5-fachen Volumen eiskaltem 96%igen Ethanol versetzt und für 30 min bei  $-70^{\circ}\text{C}$  präzipitiert. Nach Zentrifugation bei  $13000\times g$  für 15-45 min wurde das Pellet mit  $100\ \mu\text{L}$  eiskaltem 70%igem Ethanol 15 min gewaschen, anschließend 5 min unter Vakuum getrocknet und zuletzt in einem geeigneten Volumen  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst.

### 5.2.3.3 Agarosegelelektrophorese

#### 5.2.3.3.1 DNA

Die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen linearisierten Bestandteile eines DNA-Gemischs ist umgekehrt proportional dem dekadischen Logarithmus ihrer Molekulargewichte. Je nach Fragmentgröße der zu trennenden DNA wurden die Trenneigenschaften des Gels über die Agarosekonzentration variiert. Die Proben wurden 1:0.2 in 5 x GEBS verdünnt und in horizontalen Gelen mit Agarosekonzentrationen zwischen 0.5% und 2.5% mit 1 x TBE als Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm aufgetrennt. Nach Färbung des Gels für 10-45 min in einem Ethidiumbromidbad (50 mg/mL) wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente durch UV-Aktivierung (302 nm) des interkalierten Farbstoffs visualisiert und mit dem Easy Enhanced Analysis System der Firma Herolab (Easy RH-3, Videokamera 429K) dokumentiert.

#### 5.2.3.3.2 RNA

Die PolyA<sup>+</sup>-RNA (1-5  $\mu\text{g}$ ) wurde in 1%igen denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen (1 x RNA-Laufpuffer, 0.5 M Formaldehyd) aufgetrennt. Die RNA-Proben wurden vor dem Auftrag im identischen Volumen RNA-Auftragspuffer für 5 min bei  $70^{\circ}\text{C}$  denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 3.5 V/cm.

### 5.2.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen [370]

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsspaltung oder zur Aufreinigung von PCR-Fragmenten wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt, durch Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht visualisiert und die entsprechende Bande ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA erfolgte unter Verwendung des "GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit" der Firma Pharmacia nach Angaben des Herstellers.

### 5.2.3.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren [371]

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen erfolgte durch Aufnahme von UV-Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von 230-320 nm in einer Quarzglasmikroküvette. Die Berechnung der Konzentration wurde nach folgenden, für eine Schichtdicke von 1 cm geltenden Richtwerten durchgeführt:

1. Doppelstrang-DNA:  $c = E_{260\text{ nm}} \times 50 \text{ } \mu\text{g/mL}$

3. Ribonukleinsäuren:  $c = E_{260\text{ nm}} \times 40 \text{ } \mu\text{g/mL}$

Die Reinheit der Nukleinsäurelösung wurde anhand des  $E_{260}/E_{280}$ -Quotienten ermittelt. Für reine Nukleinsäurelösungen sollte er zwischen 1.8 und 2.0 betragen.

### 5.2.3.6 Restriktionsspaltung von DNA

Die enzymatische Hydrolyse von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen, Plasmid- oder Phagen-DNA wurde routinemäßig in 10-100  $\mu\text{l}$ -Reaktionsansätzen unter den vom Hersteller New England Biolabs für das jeweilige Restriktionsenzym empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Die Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen erfolgte durch Inkubation des Ansatzes für 15 min bei 80°C.

### 5.2.3.7 Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA

Zur CIP-Behandlung von Vektoren mit kohäsiven 5'-Enden wurde 1 U alkalische Phosphatase (aus Kälbermagen, Boehringer) pro  $\mu\text{g}$  linearisierter Plasmid-DNA eingesetzt und der Ansatz in dem vom Hersteller gelieferten Puffer 1 h bei 37°C inkubiert. Um das Insert in der nachfolgenden Ligation vor enzymatischer Restaktivität zu schützen wurde die alkalischer Phosphatase durch Zugabe von 5 mM EDTA pH 8.0 und 0.5% SDS für 10 min bei 75°C inaktiviert. Abschließend wurde die DNA phenolisiert und mit Ethanol präzipitiert.

### 5.2.3.8 Ligation [372]

Unter ATP-Hydrolyse stellen Ligasen Phosphodiesterbindungen zwischen dsDNA-Fragmenten her. Voraussetzung hierfür sind überhängende, komplementäre Einzelstrangenden (sticky ends) oder stumpfe Enden (blunt ends) der beteiligten dsDNA. Zusätzlich muß einer der beiden Reaktionspartner am 5'-Ende phosphoryliert sein. Für die Ligation wurden Passagier- und Vektor-DNA routinemäßig in einem molaren Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Die DNA-Konzentrationen in den Ligationsreaktionen betragen zwischen 2-5  $\mu\text{g/ml}$  und wurden in einem Endvolumen von 20  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Für die Ligation von DNA-Enden mit stumpfen oder überhängenden Enden wurde der "Rapid DNA Ligation Kit" der Firma Boehringer eingesetzt. Die TA-Klonierung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des pGEM<sup>®</sup>-T-Vector Systems der Firma Promega. Bei der Anwendung beider Ligationssysteme wurde exakt nach den Protokollvorgaben des jeweiligen Herstellers gearbeitet.

### 5.2.3.9 Transformation von *E. coli*-Zellen

#### 5.2.3.9.1 CaCl<sub>2</sub>-Methode

Für jeden Transformationsansatz wurden 100 µL kompetente Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1-10 ng DNA wurde kurz gevortext und 20 min auf Eis inkubiert. Zur erleichterten DNA-Aufnahme wurde für 5 min ein Hitzeschock bei 37°C durchgeführt und anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 µL LB wurde den Zellen bei 37°C 30 min Zeit zur Ausprägung der Resistenz gegeben, bevor 10 und 100 µL Aliquots auf LB-Amp-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.

#### 5.2.3.9.2 Elektroporation [373]

40 µL kompetente Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit der Plasmid-DNA versetzt und 2 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde dann in eine bei -20°C vorgekühlte Elektroporationskuvette (BioRad, 0.2 cm Elektrodenabstand) gegeben, die Kuvette gründlich mit einem Kleenex getrocknet, in den Schlitten des Elektroporationsgerätes eingesetzt und der Spannungspuls ausgelöst. Die am "Gene Pulser" und "Gene Controller" (BioRad) eingestellten Parameter 2.5 kV, 25 µF, 200 Ω waren dabei so gewählt, daß es bei korrektem Verlauf zu einer Pulslänge ( $\tau$ ) von ca. 4 msek kommen sollte. Die Probe wurde anschließend sofort mit 1 mL SOC-Medium (bei 37°C vorgewärmt) versetzt und zur Resistenzexpression 30 min bei 200 upm und 37°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in 100 µL SOC-Medium aufgenommen und bei Verwendung eines geeigneten Vektors auf LB-Amp-IPTG-Xgal-Agar (ermöglicht Blau-Weiß-Selektion) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag konnten die rekombinanten Transformanten anhand ihrer weißen Farbe identifiziert und Einzelkolonien gepickt werden.

#### 5.2.3.9.3 Herstellung kompetenter Bakterien

##### 5.2.3.9.3.1 Kompetente Bakterien für die CaCl<sub>2</sub>-Methode

Alle verwendeten Lösungen, Pipetten und Gefäße wurden auf Eis vorgekühlt. Aus einer 5 mL-Vorkultur (mit einer Einzelkolonie des Stammes DH5α beimpftes LB-Amp-Medium) wurden 100 mL LB-AMP-Bouillon 1%ig angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37°C und 200 upm bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0.4 inkubiert. Das Wachstum wurde auf Eis gestoppt, je 20 mL Suspension auf vier 30 mL Corex-Röhrchen verteilt und die Zellen 10 min bei 4°C und 12000 x g sedimentiert (Beckmann-Zentrifuge, Rotor JS 13.1). Nach Resuspension der Pellets in je 10 mL MgCl<sub>2</sub> wurde erneut zentrifugiert, die Sedimente wurden in je 10 mL 50 mM CaCl<sub>2</sub> gewaschen und in je 1 mL 50 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Die in einem Reagenzglas vereinigten Bakterien wurden 20 min auf Eis inkubiert, mit 400 µL Glycerin 87% (v/v) versetzt und abschließend in 200 µL-Aliquots bei -70°C eingefroren.

##### 5.2.3.9.3.2 Kompetente Bakterien für die Elektroporation

Die Kompetenzinduktion erfolgte über die Ankonzentrierung der Bakterien bei gleichzeitiger, schrittweiser Erniedrigung des Salzgehaltes des Mediums. Alle verwendeten Lösungen, Pipetten und Gefäße wurden auf Eis

vorgekühlt. Aus einer 20 mL-Vorkultur (mit einer Einzelkolonie des Stammes DH5 $\alpha$  beimpftes LB-Amp-Medium) wurden 1 L LB-AMP-Bouillon 1%ig angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37°C und 200 upm bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0.5 inkubiert. Das Wachstum wurde 10-15 min auf Eis gestoppt, je 350 mL Suspension auf zwei 500 mL Zentrifugenbecher verteilt und die Zellen 15 min bei 4°C und 2800x g sedimentiert (Beckmann-Zentrifuge, Rotor JA 10). Nach Resuspension der Pellets in je 250 mL 1 mM Hepes pH 7.0 wurde erneut zentrifugiert, die Sedimente wurden in je 200 mL Hepes gewaschen und in je 20 mL 10 %igem Glycerin (v/v) resuspendiert. Die vereinigten Bakterien wurden wiederum pelletiert und schließlich in 2.5 mL Glycerin aufgenommen. Zuletzt wurden die Zellen in 200  $\mu$ L-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

### 5.2.3.10 Isolierung von Plasmid-DNA [374]

Kleinere Mengen an Plasmid-DNA (bis 12  $\mu$ g) wurden mit dem "High Pure™ Plasmid Isolation Kit" der Firma Boehringer Mannheim exakt nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für Plasmid-Präparationen in größerem Maßstab wurde die Plasmid Kits (Midi Kit bis 150  $\mu$ g und Maxi Kit bis 1 mg DNA) der Firma Qiagen nach Herstellerprotokoll verwendet.

### 5.2.3.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [375]

Die PCR ist eine Technik, die es ermöglicht, aus geringsten DNA-Mengen definierte DNA-Abschnitte *in vitro* zu vervielfältigen. DNA-abhängige DNA-Polymerasen benötigen als Startpunkt für die Synthese des zur Matrize komplementären Stranges kurze, doppelsträngige Sequenzbereiche. Solche doppelsträngigen Bereiche werden durch die Verwendung synthetischer Oligonukleotide ("Primer") in einem DNA-Gemisch erzeugt. Für die PCR verwendet man zwei Primer, die jeweils zu einem der beiden Stränge der Matrizen-DNA komplementär sind und die gewünschte Sequenz (Amplikon) einschließen (Sense- und Antisenseprimer). Ein PCR-Zyklus beinhaltet die temperaturgesteuerte Reaktionsfolge von Denaturierung, Annealing und Extension. Während des Annealing bilden sich Hybride zwischen den denaturierten Einzelsträngen des Amplikons und den spezifischen Primern aus. Diese doppelsträngigen DNA-Bereiche dienen einer hitzestabilen, DNA-abhängigen DNA-Polymerase als Startpunkte für die Synthese des komplementären Stranges (Extension).

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Protokolle wurden durch Variation der Primerkonzentration, der Annealingtemperatur und der Zykluszahlen optimiert. Alle Reaktionen wurden im "GeneAmp System 2400" der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Nachfolgend sind die Bedingungen einer Standard-PCR-Reaktion aufgeführt. Abweichungen von diesem Protokoll sind an den entsprechenden Stellen innerhalb dieser Arbeit gesondert vermerkt.

#### PCR-Standardansatz, 50 $\mu$ L Reaktionsvolumen:

1-100	ng	DNA-Probe
1.5	$\mu$ L	Primer 1 (10 $\mu$ M)
1.5	$\mu$ L	Primer 2 (10 $\mu$ M)
5	$\mu$ L	10 x PCR-Puffer (Sigma, enthält 15 mM MgCl <sub>2</sub> )
5	$\mu$ L	10 x Nukleotid-Mix (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
0,25	$\mu$ L	<i>Taq</i> -Polymerase (Sigma, 5 U/ $\mu$ L)
H <sub>2</sub> O ad 50 $\mu$ L		



schließlich an einen speziellen Adapter ligiert (s. Abb. 39). Die PCR-Amplifikation wurde im Anschluß mit dem gegen diesen Adapter gerichteten Adapter Primer 1 und den genspezifischen Primern CB54, respektive CB73 mit dem GeneAmp Systems 2400 der Firma Perkin Elmer vorgenommen.

### Marathon cDNA Adapter:

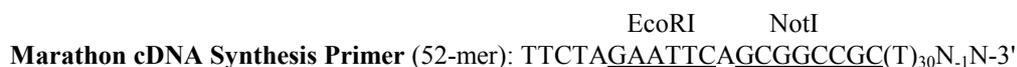
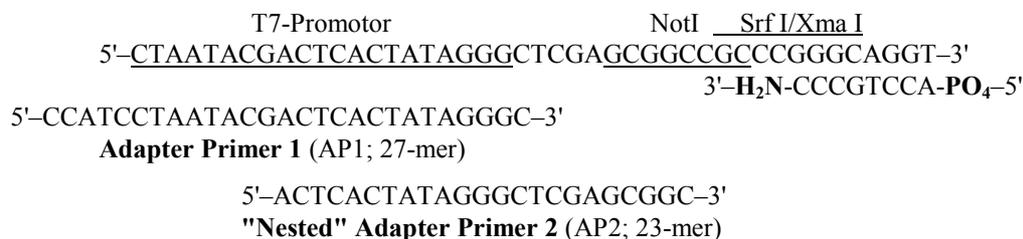


Abb. 39: Darstellung des Marathon cDNA Adapters mit den Bindungsstellen für die Adapter Primer 1 und 2. Die Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen. Mit dem Marathon cDNA Synthesis Primer wurde die reverse Transkription der verwendeten cDNA-Bibliothek (humanes fetales Gesamtgehirn) vorgenommen. N<sub>1</sub>= G, A oder C. N= G, A, T, oder C.

### 5.2.3.14 Primer Extension [377],[378]

Die Primer Extension-Methode wurde in einer nicht-radioaktiven Variante unter Einsatz des Digoxigenin-Systems durchgeführt. Für die Hybridisierung wurden 1 µL des Primers (10 µM) (humane PST: CB98; s. 5.1.6) und 1 µg PolyA<sup>+</sup>-RNA (1 µg/µL) aus humanem fetalem Gesamtgehirn (Clontech) mit 10 µL H<sub>2</sub>O versetzt, 3 min bei 94°C denaturiert, nach Inkubation auf Eis (1 min) kurz anzentrifugiert (4°C) und im Anschluß mit 4 µL 5 x First Strand Buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>; Gibco BRL), 2 µL 0.1 M DTT und 1 µL 4 x 10 mM dNTP versetzt. Das Annealing des Primers erfolgte für 45 min bei 70°C. Der Ansatz wurde dann 1 min auf Eis inkubiert, anzentrifugiert (4°C), 2 min bei 42°C äquillibriert und schließlich mit 1 µL Superscript II (Gibco BRL, 200 U/µL) versetzt. Die reverse Transkription erfolgte für 30 min bei 42°C. Nach einer Hitzeinaktivierung für 15 min bei 70°C wurde kurz anzentrifugiert (rt), das Gemisch für 2 min bei 55°C äquillibriert, 1 µL RNase H (2 U/µL) zugegeben und für 15 min bei 55°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit H<sub>2</sub>O auf 100 µL aufgefüllt und anschließend mit Natriumacetat (s. 5.2.3.2) und 1 µL Glykogen als Träger präzipitiert. Das Pellet wurde nicht mit 70% EtOH gewaschen, sondern sofort im Vakuum getrocknet und anschließend mit 5 µL Auftragspuffer (80% Formamid (v/v), 0.1% Xylencyanol (v/v), 0.1% Bromphenolblau (v/v), 2 mM EDTA) versetzt. Der Gelauftrag der Proben erfolgte auf ein 6%iges denaturierendes Polyacrylamid-Harnstoffgel (s. 5.2.3.20) parallel zu einer Sequenzreaktion, die mit dem Primer CB98 und dem Promotorfinderfragment 1 (PF1, s. Abb. 12) als Template durchgeführt worden war und als Größenstandard diente (s. Abb. 9). Der Gellauf wurde für 2 h bei den unter Abschnitt 5.2.3.20 angegebenen Bedingungen absolviert. Im Anschluß wurden die aufgetrennten Fragmente durch Elektrophoretik (0.8 mA/cm<sup>2</sup> für 30 min, Transferpuffer 1 x TBE; sonst s. 5.2.2.2.1) auf eine Nylonmembran transferiert., mit einer digoxigenin-markierten "Riboprobe"-Sonde aus dem 5'-Bereich der humanen PST hybridisiert und chemilumineszenzdetektiert (s. 5.2.3.18.2).

### 5.2.3.15 RNA-Präparationen

#### 5.2.3.15.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryonten Zelllinien [379]

Für die Gewinnung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zelllinien wurden ca.  $5 \times 10^7$  Zellen nach dem Waschen in 10 mL PBS in 7.5 mL GCN-Lösung (4 M Guanidiniumisothiocyanat, 25 mM Natriumacetat pH 5.5, 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol) lysiert und durch Ultraturrax-Behandlung (Modell T25, 15 sek, 24000 upm) homogenisiert. Das Zellhomogenat wurde über ein CsCl-Kissen (5 mL 96% CsCl in 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA) geschichtet und 18 h bei  $150000 \times g$  ( $16^\circ\text{C}$ , SW40-Rotor, Beckman) ultrazentrifugiert. Im Anschluß wurde das RNA-Pellet in 400  $\mu\text{L}$  TE gelöst und nach photometrischer Konzentrationsbestimmung zur Aufreinigung von PolyA<sup>+</sup>-RNA eingesetzt. Wenn keine PolyA<sup>+</sup>-RNA-Präparation vorgesehen war wurde mit einem Volumen Chloroform/Butanol (4:1) extrahiert und die RNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natriumacetat pH 5.2 und dem 2.5-fachen Volumen. EtOH abs. aus der wäßrigen Phase präzipitiert (2h/ $-70^\circ\text{C}$ ). Nach Zentrifugation (30 min,  $14500 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 5.2.3.15.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebeproben

Für die Gewinnung von Gesamt-RNA aus Geweben wurden die bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagerten Proben in eingefrorenem Zustand gewogen und anschließend sofort in  $4^\circ\text{C}$  kalte GCN-Lösung (4 M Guanidiniumisothiocyanat, 25 mM Natriumacetat pH 5.5, 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol) überführt (150-200 mg Gewebe pro 7.5 mL GCN). Die Gewebestücke wurde für 2 x 30 sek in der GCN-Lösung homogenisiert (Ultraturrax, Modell T25, 24000 upm). Inhomogene Gewebeteile wurde nach der Überführung der Lösung in Falcon-Röhrchen (Greiner) für 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  und 4000 upm sedimentiert, das überstehende Homogenat über ein CsCl-Kissen (5 mL 96% CsCl in 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA) geschichtet und 18 h bei  $150000 \times g$  ( $16^\circ\text{C}$ , SW40-Rotor, Beckman) ultrazentrifugiert. Die weitere Behandlung erfolgte nach der unter 5.2.3.15.1 angegebenen Vorgehensweise.

#### 5.2.3.15.3 Isolierung von Poly(A)<sup>+</sup>-RNA

Die Isolierung von PolyA<sup>+</sup>-RNA erfolgte affinitätschromatographisch über Oligo(dT)-Cellulose unter Einsatz des QuickPrep<sup>®</sup> *Micro* mRNA Purification Kit (Pharmacia). Zunächst wurde die durch CsCl-Dichtegradientenultrazentrifugation isolierte Gesamt-RNA mit dem 2-fachen Volumen an Elutionspuffer versetzt (maximal 300 mg Gesamt-RNA pro Säule). Alle folgenden Bindungs-, Wasch- und Elutionsschritte erfolgten dann exakt nach Herstellerprotokoll. Zur Ankonzentrierung wurde die eluierte PolyA<sup>+</sup>-RNA mit Natriumacetat und Glykogen als Träger präzipitiert und nach Aufnahme in 20  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O photometrisch in Qualität und Quantität überprüft.



### 5.2.3.17 Hybridisierung

Im folgenden Abschnitt sind die Konditionen für die Hybridisierung von Northern Blots, Southern Blots, Dot Blots und P1-Phagenfiltern zusammengefaßt. Abhängig von der Art der verwendeten Sonden wurden die Hybridisierungen in verschiedenen Lösungen und bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt:

Hybridisierungen mit DIG-dUTP getailten Oligonukleotidsonden:

Standard-Natriumhybridisierungslösung versetzt mit 100 µL Poly(A) (10 mg/mL, Boehringer) pro 10 mL Prähybridisierungslösung. Hybridisierungstemperatur: 37°C

Hybridisierungen mit digoxigenin-markierten Riboprobes oder PCR-Sonden:

"High SDS"-Hybridisierungslösung ("Church-Buffer")

Hybridisierungstemperatur:

PCR-Produkte: 42°C

Riboprobes (Northern Blot): 65°C

Aufbau des Hybridisierungssystems:

Hybridisierungsröhren: Acrylglas (300 x 40 mm oder 240 x 30 mm, Bachhofer) oder 50 mL Falcontubes

Die zu hybridisierenden Filter wurden in eine Hybridisierungsröhre eingebracht und nach Zugabe von 2.5 mL (Falcon), 5-7.5 mL (kleine Röhre) bzw. 10-12.5 mL (große Röhre), minimal aber 1 mL Hybridisierungslösung pro 20 cm<sup>2</sup> Filterfläche, bei 37°C – 65°C für 30 min –120 min in einem Hybridisierungssofen prähybridisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der DIG-dUTP markierten Sonde(n) und die Hybridisierung für 24 h bei unveränderter Temperatur. Nach 24 h wurden die Filter gewaschen, dabei gingen einem stringenten zwei moderate Waschschrte bei rt voraus:

1. Wäsche: Die Hybridisierungslösung wurde abgegossen, die Hybridisierungsröhre mit mindestens 20 mL 2 x SSC aufgefüllt und nach dem Wiederverschließen kurz geschüttelt.

2. Wäsche: Nach dem Abgießen der ersten Waschlösung wurden die Membranen in eine Glasschale mit 2 x SSC/0.1% SDS überführt und unter Schütteln 2 x 15 min gespült.

3. Wäsche: Der letzte Waschschrte erfolgte für 2 x 20 min in einer Glasschale unter stringenten Bedingungen im Schüttelwasserbad. Die jeweiligen Waschttemperaturen und -lösungen des letzten stringenten Schrittes waren abhängig von der verwendeten Sonde:

DIG-dUTP getailten Oligonukleotide: 68°C 2 x SSC/0.1% SDS

PCR-Produkte: 65°C 0.5 x SSC/0.1% SDS

Riboprobes (Northern Blot): 68°C 0.1 x SSC/0.1% SDS

Die Detektion der hybridisierten und gewaschenen Filter wurde nach dem "Luminescent Detection Kit" von Boehringer durchgeführt (s. 5.2.3.18.2).

#### 5.2.3.17.1 Northern Blot [380]

1-5 µg PolyA<sup>+</sup>-RNA wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 5.2.3.3.2) und das Gel anschließend für 20 min in 20 x SSC äquillibriert. Die Übertragung der Nukleinsäuren auf eine vorher kurz zunächst in H<sub>2</sub>O und anschließend in 20 x SSC gespülte Nylonmembran erfolgte durch vertikalen Kapillartransfer von oben nach unten für 16 h mit 20 x SSC als Transferpuffer.

Aufbau der Transferpyramide (Filterpapiere: Whatman 3 MM in Gelgröße):

3 in 20 x SSC getränkte Filterpapiere

Agarosegel (Taschen nach unten zeigend)

Nylonmembran (in Gelgröße)

1 in 20 x SSC getränktes Filterpapiere (Whatman 3 MM)

2 trockene Filterpapiere

Papiertücher, ca. 3 cm

Auf der noch feuchten Nylonmembran wurde die RNA durch UV-Bestrahlung kovalent fixiert ("Stratalinker", Stratagene, Stufe: "Autocrosslink").

### 5.2.3.17.2 Southern Blot [381]

Die DNA wurde nach Restriktion mit Endonukleasen in 0.5%igen–2%igen TBE-Agarosegelen aufgetrennt. Zur Fragmentierung von DNA-Molekülen über 10 kb wurde das Gel 10 min in 250 mM HCl inkubiert und anschließend für je 30 min in Denaturierungslösung respektive Neutralisierungslösung gespült. Der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran erfolgte mit 20 x SSC als Transferpuffer für 16 h analog zu der in Abschnitt 5.2.3.17.1 beschriebenen Technik. Die Transferpyramide wurde zusätzlich mit einem 1 kg-Gewicht beschwert. Auf der noch feuchten Nylonmembran wurde die DNA durch UV-Bestrahlung kovalent fixiert ("Stratalinker", Stratagene, Stufe: "Autocrosslink").

### 5.2.3.17.3 Methylenblaufärbung von Markern

Die Methylenblaufärbung wurde zur Visualisierung nicht-markierter DNA- oder RNA-Molekulargewichtsmarker eingesetzt. Dazu wurde die Markerspür von der Nylonmembran abgetrennt, für 5 min in die Färbelösung (0.5% Methylenblau, 0.3 M Natriumacetat pH 5.2) eingelegt und anschließend in H<sub>2</sub>O entfärbt.

### 5.2.3.17.4 Rehybridisierung von "gesstripten" Nylonmembranen [382]

Auf Nylonmembranen fixierte Nukleinsäuren können mehrmals hintereinander mit verschiedenen Sonden hybridisiert werden. Dazu ist es notwendig die Sonde der vorhergehenden Hybridisierung durch z.B. durch Alkali-Behandlung von ihrer Zielsequenz zu entfernen ("Stripping"). Voraussetzung ist jedoch, daß die Membranen während der Hybridisierung und der anschließenden Detektion niemals vollständig austrocknen, da dieses zu einer irreversiblen Bindung der Hybride an die Nylonoberfläche führt. Durch das Einschweißen der Membranen in Plastikfolie konnte gewährleistet werden, daß sie immer einer ausreichenden Restfeuchtigkeit ausgesetzt waren. Es wurden verschiedene "Stripping"-Protokolle angewandt:

Für Hybridisierungen mit DIG-dUTP getailten Oligonukleotiden oder PCR-Sonden:

- Membran in sterilem H<sub>2</sub>O waschen
- 2 x 15 min in 0.2 M NaOH, 0.1% SDS bei 37°C inkubieren
- Kurz in 2 x SSC spülen

"Hot-SDS"-Methode für Hybridisierungen mit "Riboprobe"-Sonden, die durch hohen DIG-Einbau sehr starke Signale liefern oder für sehr häufige Rehybridisierungen (bis zu 4 x):

- 100 mL 0.1% SDS kurz aufkochen und über die Membranen gießen
- 10 min auf einem Schüttler spülen
- 5 min in Wasch-Puffer für die DIG-Detektion spülen

Die "gestriipten" Membranen konnten anschließend sofort in die Prähybridisierung eingesetzt oder in 2 x SSC bei -20°C aufbewahrt werden.

### 5.2.3.18 Digoxigenin-System [383]

Das Digoxigenin-System stellt eine nicht-radioaktive Alternative zur Markierung von DNA-, RNA-, oder Oligonukleotidsonden dar. Das methodische Prinzip beruht auf der Möglichkeit chemisch modifizierte, auf Nylonmembranen immobilisierte Uridin-Nukleotide nach ihrem enzymatischen Einbau in Nucleinsäuren durch einen Enzym-Immunoassay mit Chemilumineszenz nachzuweisen. Das Digoxigenin-Molekül (DIG), ein Hapten mit Steroid-Grundgerüst ist über einen 11 Atome langen Spacerarm mit Uridin-Nukleotiden verbunden. Für den Einbau von DIG-dUTP in Nucleinsäure-Proben kann auf für radioaktive Markierungen etablierte Standardprotokolle ("Random Prime", "nick translation", PCR, 3'- oder 5'-Endmarkierung, *in vitro*-Transkription) zurückgegriffen werden, da die in diesen Methoden eingesetzten Polymerasen DIG-dUTP als Substrat akzeptieren. Nach der Hybridisierung der DIG-markierten Sonden an die membrangebundenen Ziel-Nucleinsäuren werden die Hybride unter Verwendung hochaffiner Antikörper-Konjugate (Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat, Fab-Fragmente) detektiert. Die enzymatische Dephosphorylierung des Chemilumineszenz-Reagens CSPD® [3-(4-methoxy Spiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-yl Phenylphosphat, Dinatriumsalz] führt zu einem metastabilen Phenolat-Anion, welches zerfällt und Licht mit einem Maximum bei 477 nm emittiert. Dieser Umstand erlaubt den Nachweis der Hybridmoleküle auf konventionellen Röntgenfilmen.

#### 5.2.3.18.1 Markierung von Hybridisierungssonden

##### 5.2.3.18.1.1 Tailing von Oligonukleotiden mit terminaler Transferase

In dieser Arbeit wurde der "DIG Oligonucleotide Tailing Kit" von Boehringer Mannheim verwendet. In dem hier beschriebenen Standard-Ansatz, mit 100 pmol 3'-OH-Enden (entsprechend 1 µg eines 30mers) wird nahezu die gesamte Menge an eingesetztem Oligonukleotid (Länge 14-100 bp) in die getailte Form überführt. Für die Markierungsreaktion wurden folgende Komponenten auf Eis gemischt:

4 µL 5 x Reaktionspuffer	1 M Kaliumkacodylat, 125 mM Tris-HCl pH 6.6, 1.25 mg / mL BSA
4 µL CoCl <sub>2</sub> -Lösung	25 mM CoCl <sub>2</sub>
100 pmol / µL Oligonukleotid	Endkonzentration im Ansatz: 5 µM
1 µL DIG-dUTP-Lösung	1 mM in H <sub>2</sub> O
1 µL dATP-Lösung	10 mM in Tris-Puffer, pH 7.5
1 µL Terminale Transferase	50 U/µL
H <sub>2</sub> O	ad 20 µL

Nach der Inkubation bei 37°C für 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µL Stop-Lösung (0.2 M EDTA pH 8.0) beendet und anschließend eine Lithiumchloridfällung durchgeführt. Die getailten Oligonukleotide wurden zuletzt in 40 µL H<sub>2</sub>O gelöst. Bei vollständiger Überführung der gesamten Menge des eingesetzten Oligonukleotids in die getailte Form sollte die Endkonzentration des gelabelten Oligonukleotids 2.5 pmol/µL betragen.

### 5.2.3.18.1.2 Generierung digoxigenin-markierter PCR-Amplifikate

Die Herstellung von hochsensitiven, digoxigenin-markierten PCR-Sonden wurde mit dem "PCR DIG Probe Synthesis Kit" exakt nach den Angaben des Herstellers Boehringer Mannheim durchgeführt. Die PCR-Parameter wurden ebenfalls aus dem Protokoll des Herstellers übernommen. Die Annealingtemperatur betrug bei allen Amplifikationen 58°C. Das Verhältnis von dTTP zu DIG-dUTP wurde auf 2:1 eingestellt. Nach der Amplifikation erfolgte eine Aufreinigung der markierten Produkte durch Auftrennung des 100 µL PCR-Ansatzes (pro Sonde) in einem Agarosegel geeigneter Konzentration (s. 5.2.3.3.1). Nach der Rückgewinnung wurden (s. 5.2.3.4) die Sonden in 30 µL H<sub>2</sub>O eluiert. Für Hybridisierungen wurden die Sonden 1:7500 in High SDS-Puffer verdünnt.

### 5.2.3.18.1.3 Digoxigenin-Markierung von RNA-Sonden (Riboprobes)

Zur Herstellung von "sense" und "antisense" RNA-Sonden von PST, STX und NCAM wurden 2 µg des jeweiligen Plasmids (s.u.) mit einem der folgenden Restriktionsenzym linearisiert und nach Gelaufreinigung (s. 5.2.3.4) phenolisiert (s. 5.2.3.1), präzipitiert (s. 5.2.3.2) und anschließend mit einer der nachfolgend genannten RNA-Polymerasen *in vitro*-transkribiert:

<u>Sonde</u>	<u>Enzym</u>	<u>RNA-PolymerasePlasmid</u>	
PST "antisense"	HindIII	T3	pAH24
PST "sense"	XbaI	T7	pAH24
STX "antisense"	HindIII	T7	pBS <sub>m</sub> STX
STX "sense"	KpnI	T3	pBS <sub>m</sub> STX
NCAM "antisense"	HindIII	T3	pRc/CMV-N39N22

#### Reaktionsansatz:

Die in DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O gelöste DNA, 2 µL 10 x Transkriptionspuffer (Boehringer), 40 U RNA-Polymerase und 2 µL NTP/DIG-UTP-Mix (10 mM ATP, CTP, GTP; 6.5 mM UTP; 3.5 mM DIG-UTP) wurden mit DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O auf 20 µL aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert und das DNA-Template anschließend durch Zugabe von 2 µL RNase-freier DNase I (10U/µL) entfernt (15 min/37°C). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µL 0.5 M EDTA (pH 8.0) gestoppt und die *in vitro*-transkribierte RNA mit präzipitiert. Die pelletierte Sonde wurde einmal mit 70% EtOH gewaschen, bei 37°C getrocknet und schließlich in 100 µL H<sub>2</sub>O (DEPC-behandelt) resuspendiert. Für Northern Blot-Analysen wurden die Sonden 1:5000 in High SDS-Puffer verdünnt.

### 5.2.3.18.1.4 RNA-Sonden für die *in situ*-Hybridisierung

Für die *in situ*-Hybridisierung von verschiedenen postnatalen Stadien des Rattenhirns (s. 3.4.1.1 u. 4.3.1) wurden Aliquots der unter Abschnitt 5.2.3.18.1.3 hergestellten digoxigenin-markierten RNA-Sonden exakt nach dem Protokoll von Springer *et al.* [384] durch eine partielle alkalische Hydrolyse für 30 min in Abschnitte mit einer mittleren Länge von 400 Nukleotiden fragmentiert. Nach Ethanolpräzipitation der Fragmente wurden die Sonden in *in situ*-Hybridisierungspuffer (Amersham) mit 50% Formamid resuspendiert und Dr. Hildebrandt von der Universität Stuttgart-Hohenheim für die Durchführung der *in situ*-Experimente zur Verfügung gestellt.

### 5.2.3.18.1.5 Markierungseffizienz

Um sicherzustellen, daß die durchgeführten Markierungsreaktionen erfolgreich verlaufen waren und einen näherungsweisen Eindruck von der Labelingeffizienz zu bekommen wurde folgendes Dot-Blot-Verfahren durchgeführt: Eichreihen von kommerziell erworbenen digoxigenin-markierten Kontrollstandards (Boehringer, RNA oder DNA) wurden parallel zu Verdünnungsstufen der zu testenden Sonde auf eine Nylonmembran pipettiert. Nach Fixierung der Nukleinsäuren durch "UV-Crosslinking" wurden die Filter einer direkten (ohne vorherige Hybridisierung) Chemilumineszenzdetektion unterzogen (s. 5.2.3.18.2). Durch den Vergleich der letzten signalgebenden Verdünnungsstufen der Eichreihe des Standards und der Verdünnungsreihe der Probe konnte die Labelingeffizienz abgeschätzt werden.

### 5.2.3.18.2 Chemilumineszenzdetektion

Die Nachweisreaktionen wurden mit dem "DIG Luminescent Detection Kit" von Boehringer Mannheim durchgeführt. Nach der Hybridisierung und den entsprechenden Waschschritten (s. 5.2.3.17) wurde der Nachweis nach dem vom Hersteller angegebenen Detektionsprotokoll in Glasschalen oder sterilen Plastischalen (Northern Blot) bei rt unter Schütteln durchgeführt. Die Verdünnung des Nachweisantikörpers lag bei 1:20000. Bei der Detektion von Northern Blots wurden die Blockierungs- und Waschschriffe in Abweichung zum Herstellerprotokoll verdoppelt. Abschließend erfolgte die Exposition des Lichtsignals auf einen Röntgenfilm für 2-300 min bei rt. Nach der Entwicklung des Röntgenfilms wurden die Membranen für weitere Rehybridisierungen feucht bei 4°C aufbewahrt.

### 5.2.3.19 Reportergenassay

Die Reportergenassays wurden mit dem Great EscAPe™ SEAP Reporter System 2-Kit der Firma Clontech durchgeführt (Katalog # (1998): K2042-1; User Manual#: PT3057-1) Die Detektion von Chemilumineszenzsignalen aus dem Zellkulturüberstand transient transfizierter Zellen wurde mit dem Great EscAPe™ SEAP Chemiluminescence Detection Kit der Firma Clontech exakt nach den Angaben des Herstellers vorgenommen (Katalog # (1998): K2042-1; User Manual#: PT3057-1). Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte mit dem "Microplate Scintillation & Luminescence Counter" der Firma Packard, Modell "TopCount" mit dem Standard Lumineszenz-Meßprogramm (Integrationszeit 1 min). Alle auf Promotoraktivität getesteten Fragmente aus den 5'-flankierenden Bereichen von PST und STX wurden in den Vektor pSEAP2-Enhancer kloniert. Als Positivkontrolle wurde der Vektor pSEAP2-Control (mit SV40-Promotor) verwendet.

### 5.2.3.20 Sequenzierung [385]

Die Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA erfolgte nach der Didesoxymethode unter Verwendung des "T<sub>7</sub>-Sequencing Kit" der Firma Pharmacia. Hierfür wurden 2 µg Plasmid-DNA (in 8 µL TE) durch Zugabe von 2 µL 2 M NaOH denaturiert (10 min, rt). Nach Zugabe von 3 µL 3 M NaOAc (pH 5.2), 7 µL H<sub>2</sub>O und 60 µL EtOH wurde die DNA gefällt, das Präzipitat mit 70% EtOH gewaschen und die getrocknete DNA in 10 µL H<sub>2</sub>O gelöst. Nach Zugabe von 2 µL Annealing-Puffer und 10 pmol des Sequenzierprimers wurde die DNA für 20 min bei 37°C und anschließend für 10 min bei rt inkubiert. Die Markierungs- und Terminationsreaktion wurde unter Verwendung des oben genannten Sequenzierungs-Kits nach den Angaben des Herstellers mit 2.5 µCi α-<sup>35</sup>S-dATP je Reaktionsansatz durchgeführt. Die Produkte der Sequenzierungsreaktionen wurden in 8%igen Acrylamid-Harnstoff-Gelen aufgetrennt (7.6% Acrylamid, 0.4% N,N'-Methylen-diacrylamid, 7 M Harnstoff in TBE-Puffer, der auch als Laufpuffer diente). Die Elektrophorese erfolgte in einer S2-Sequenzgel-Kammer der Firma Gibco BRL (0.4 mm x 31 cm x 38.5 cm Gele). Nach 30 min Vorlauf (80 Watt) wurden die hitze-denaturierten Proben aufgetragen (3 µL je Spur) und bei einer konstanten Leistung von 70 Watt aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend für 20 min fixiert (5% Methanol, 5% Essigsäure), auf Filterpapier gezogen, unter Vakuum bei 80°C getrocknet und über Nacht exponiert.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Kelm S, Schauer R: Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int.Rev.Cytol.* 1997; 175:137-240: 137-240.
2. Schauer R, de Freese A, Gollub M, et al: Functional and biosynthetic aspects of sialic acid diversity. *Indian J.Biochem.Biophys.* 1997; 34: 131-141.
3. Rougon G: Structure, metabolism and cell biology of polysialic acids. *Eur.J.Cell Biol.* 1993; 61: 197-207.
4. Troy FA: Polysialylation: from bacteria to brains. *Glycobiology.* 1992; 2: 5-23.
5. Higa HH, Varki A: Acetyl-coenzyme A:polysialic acid O-acetyltransferase from K1-positive *Escherichia coli*. The enzyme responsible for the O-acetyl plus phenotype and for O-acetyl form variation. *J.Biol.Chem.* 1988; 263: 8872-8878.
6. Iwasaki M, Inoue S, Troy FA: A new sialic acid analogue, 9-O-acetyl-deaminated neuraminic acid, and alpha -2,8-linked O-acetylated poly(N-glycolylneuraminyl) chains in a novel polysialoglycoprotein from salmon eggs. *J.Biol.Chem.* 1990; 265: 2596-2602.
7. Reglero A, Rodriguez-Aparicio LB, Luengo JM: Polysialic acids. *Int.J Biochem* 1993; 25: 1517-1527.
8. Jann K, Jann B: Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance. *Can.J.Microbiol.* 1992; 38: 705-710.
9. Bhattacharjee AK, Jennings HJ, Kenny CP, Martin A, Smith IP: Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C with carbon 13 nuclear magnetic resonance. *J.Biol.Chem.* 1975; 250: 1926-1932.
10. Adlam C, Knight JM, Mugridge A, Williams JM, Lindon JC: Production of colominic acid by *Pasteurella haemolytica* serotype A2 organisms. *FEMS Microbiol.Lett.* 1987; 42: 23-25.
11. Jennings HJ, Katzenellenbogen E, Lugowski C, Michon F, Roy R, Kasper DL: Structure, conformation and immunology of sialic acid-containing polysaccharides of human pathogenic bacteria. *Pure Appl.Chem* 1984; 56: 893-905.
12. Frosch M, Muller A: Phospholipid substitution of capsular polysaccharides and mechanisms of capsule formation in *Neisseria meningitidis*. *Mol.Microbiol.* 1993; 8: 483-493.
13. Rohr TE, Troy FA: Structure and biosynthesis of surface polymers containing polysialic acid in *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 1980; 255: 2332-2342.
14. Pelkonen S, Hayrinen J, Finne J: Polyacrylamide gel electrophoresis of the capsular polysaccharides of *Escherichia coli* K1 and other bacteria. *J.Bacteriol.* 1988; 170: 2646-2653.
15. Bhattacharjee AK, Jennings HJ, Kenny CP, Martin A, Smith IC: Structural determination of the polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups Y, W-135, and BO1. *Can.J.Biochem.* 1976; 54: 1-8.
16. Egan W, Liu TY, Dorow D, et al: Structural studies on the sialic acid polysaccharide antigen of *Escherichia coli* strain Bos-12. *Biochemistry* 1977; 16: 3687-3692.
17. Inoue S, Iwasaki M: Isolation of a novel glycoprotein from the eggs of rainbow trout: occurrence of disialosyl groups on all carbohydrate chains. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1978; 83: 1018-1023.
18. Nomoto H, Iwasaki M, Endo T, Inoue S, Inoue Y, Matsumura G: Structures of carbohydrate units isolated from trout egg polysialoglycoproteins: short-cored units with oligosialosyl groups. *Arch.Biochem.Biophys.* 1982; 218: 335-341.
19. Inoue S, Kitajima K, Inoue Y, Kudo S: Localization of polysialoglycoprotein as a major glycoprotein component in cortical alveoli of the unfertilized eggs of *Salmo gairdneri*. *Dev.Biol.* 1987; 123: 442-454.
20. Iwasaki M, Inoue S: Structures of the carbohydrate units of polysialoglycoproteins isolated from the eggs of four species of salmonid fish. *Glycoconj.J* 1985; 2: 209-228.
21. Inoue S, Kanamori A, Kitajima K, Inoue Y: KDN-glycoprotein: a novel deaminated neuraminic acid-rich glycoprotein isolated from vitelline envelope of rainbow trout eggs. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1988; 153: 172-176.
22. Kanamori A, Inoue S, Iwasaki M, et al: Deaminated neuraminic acid-rich glycoprotein of rainbow trout egg vitelline envelope. Occurrence of a novel alpha-2,8-linked oligo(deaminated neuraminic acid) structure in O-linked glycan chains. *J.Biol.Chem.* 1990; 265: 21811-21819.
23. Tezuka T, Taguchi T, Kanamori A, et al: Identification and structural determination of the KDN-containing N-linked glycan chains consisting of bi- and triantennary complex-type units of KDN-glycoprotein previously isolated from rainbow trout vitelline envelopes. *Biochemistry* 1994; 33: 6495-6502.
24. Inoue S, Iwasaki M, Kanamori A, Jerda T, Kitajima K, Inoue Y: Structure and function of poly(KDN)-GP and poly(Sia)-GP: two distinct types of glycoprotein isolated from the vitelline envelope and ovarian fluid of salmonid fish. *Glycoconj.J* 1991; 8: 233
25. Sato C, Kitajima K, Tazawa I, Inoue Y, Inoue S, Troy FA: Structural diversity in the alpha 2-->8-linked polysialic acid chains in salmonid fish egg glycoproteins. Occurrence of poly(Neu5Ac), poly(Neu5Gc), poly(Neu5Ac, Neu5Gc),

- poly(KDN), and their partially acetylated forms. *J.Biol.Chem.* 1993; 268: 23675-23684.
26. Inoue S, Iwasaki M: Characterization of a new type of glycoprotein saccharides containing polysialosyl sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 93: 162-165.
  27. Inoue S, Inoue Y: Fertilization (activation)-induced 200- to 9-kDa depolymerization of polysialoglycoprotein, a distinct component of cortical alveoli of rainbow trout eggs. *J.Biol.Chem.* 1986; 261: 5256-5261.
  28. Kitazume S, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y, Troy FA: Developmental expression of trout egg polysialoglycoproteins and the prerequisite alpha 2,6-, and alpha 2,8-sialyl and alpha 2,8- polysialyltransferase activities required for their synthesis during oogenesis. *J.Biol.Chem.* 1994; 269: 10330-10340.
  29. Rutishauser U, Acheson A, Hall AK, Mann DM, Sunshine J: The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science* 1988; 240: 53-57.
  30. Muhlenhoff M, Eckhardt M, Gerardy-Schahn R: Polysialic acid: three-dimensional structure, biosynthesis and function. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 1998; 8: 558-564.
  31. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM: Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 1987; 236: 799-806.
  32. Brummendorf T, Rathjen FG: Axonal glycoproteins with immunoglobulin- and fibronectin type III- related domains in vertebrates: structural features, binding activities, and signal transduction. *J.Neurochem.* 1993; 61: 1207-1219.
  33. Edelman GM, Crossin KL: Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. *Annu.Rev.Biochem.* 1991; 60:155-90: 155-190.
  34. Owens GC, Edelman GM, Cunningham BA: Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene: alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1987; 84: 294-298.
  35. Prediger EA, Hoffman S, Edelman GM, Cunningham BA: Four exons encode a 93-base-pair insert in three neural cell adhesion molecule mRNAs specific for chicken heart and skeletal muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1988; 85: 9616-9620.
  36. Barbas JA, Chaix JC, Steinmetz M, Goridis C: Differential splicing and alternative polyadenylation generates distinct NCAM transcripts and proteins in the mouse. *EMBO J* 1988; 7: 625-632.
  37. Santoni MJ, Barthels D, Barbas JA, et al: Analysis of cDNA clones that code for the transmembrane forms of the mouse neural cell adhesion molecule (NCAM) and are generated by alternative RNA splicing. *Nucleic.Acids.Res* 1987; 15: 8621-8641.
  38. Hirn M, Ghandour MS, Deagostini-Bazin H, Goridis C: Molecular heterogeneity and structural evolution during cerebellar ontogeny detected by monoclonal antibody of the mouse cell surface antigen BSP-2. *Brain Res.* 1983; 265: 87-100.
  39. Lyles JM, Linnemann D, Bock E: Biosynthesis of the D2-cell adhesion molecule: post-translational modifications, intracellular transport, and developmental changes. *J.Cell Biol.* 1984; 99: 2082-2091.
  40. Hemperly JJ, Edelman GM, Cunningham BA: cDNA clones of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) lacking a membrane-spanning region consistent with evidence for membrane attachment via a phosphatidylinositol intermediate. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1986; 83: 9822-9826.
  41. He HT, Finne J, Goridis C: Biosynthesis, membrane association, and release of N-CAM-120, a phosphatidylinositol-linked form of the neural cell adhesion molecule. *J.Cell Biol.* 1987; 105: 2489-2500.
  42. Dickson G, Gower HJ, Barton CH, et al: Human muscle neural cell adhesion molecule (N-CAM): identification of a muscle-specific sequence in the extracellular domain. *Cell* 1987; 50: 1119-1130.
  43. Small SJ, Haines SL, Akeson RA: Polypeptide variation in an N-CAM extracellular immunoglobulin-like fold is developmentally regulated through alternative splicing. *Neuron* 1988; 1: 1007-1017.
  44. Small SJ, Akeson R: Expression of the unique NCAM VASE exon is independently regulated in distinct tissues during development. *J Cell Biol.* 1990; 111: 2089-2096.
  45. Thompson J, Dickson G, Moore SE, et al: Alternative splicing of the neural cell adhesion molecule gene generates variant extracellular domain structure in skeletal muscle and brain. *Genes Dev.* 1989; 3: 348-357.
  46. Reyes AA, Small SJ, Akeson R: At least 27 alternatively spliced forms of the neural cell adhesion molecule mRNA are expressed during rat heart development. *Mol.Cell Biol.* 1991; 11: 1654-1661.
  47. Santoni MJ, Barthels D, Vopper G, Boned A, Goridis C, Wille W: Differential exon usage involving an unusual splicing mechanism generates at least eight types of NCAM cDNA in mouse brain. *EMBO J* 1989; 8: 385-392.
  48. Pollerberg GE, Burrige K, Krebs KE, Goodman SR, Schachner M: The 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM is involved in a cell-cell contacts and cytoskeleton-membrane interactions. *Cell Tissue Res.* 1987; 250: 227-236.
  49. Andersson AM, Olsen M, Zhernosekov D, et al: Age-related changes in expression of the neural cell adhesion molecule in skeletal muscle: a comparative study of newborn, adult and aged rats. *Biochem.J.* 1993; 290: 641-648.
  50. Gaardsvoll H, Krog L, Zhernosekov D, et al: Age-related changes in expression of neural cell adhesion molecule (NCAM) in heart: a comparative study of newborn, adult and aged rats. *Eur.J.Cell Biol.* 1993; 61: 100-107.

51. Yoshimi T, Mimura N, Aimoto S, Asano A: Transitional expression of neural cell adhesion molecule isoforms during chicken embryonic myogenesis. *Cell Struct.Funct.* 1993; 18: 1-11.
52. Lyons GE, Moore R, Yahara O, Buckingham ME, Walsh FS: Expression of NCAM isoforms during skeletal myogenesis in the mouse embryo. *Dev.Dyn.* 1992; 194: 94-104.
53. Hamshere M, Dickson G, Eperon I: The muscle specific domain of mouse N-CAM: structure and alternative splicing patterns. *Nucleic.Acids.Res* 1991; 19: 4709-4716.
54. Gower HJ, Barton CH, Elsom VL, et al: Alternative splicing generates a secreted form of N-CAM in muscle and brain. *Cell* 1988; 55: 955-964.
55. Gennarini G, Rougon G, Deagostini-Bazin H, Hirn M, Goridis C: Studies on the transmembrane disposition of the neural cell adhesion molecule N-CAM. A monoclonal antibody recognizing a cytoplasmic domain and evidence for the presence of phosphoserine residues. *Eur.J.Biochem.* 1984; 142: 57-64.
56. Sorkin BC, Hoffman S, Edelman GM, Cunningham BA: Sulfation and phosphorylation of the neural cell adhesion molecule, N- CAM. *Science* 1984; 225: 1476-1478.
57. Walsh FS, Parekh RB, Moore SE, et al: Tissue specific O-linked glycosylation of the neural cell adhesion molecule (N-CAM). *Development* 1989; 105: 803-811.
58. Small SJ, Shull GE, Santoni MJ, Akeson R: Identification of a cDNA clone that contains the complete coding sequence for a 140-kD rat NCAM polypeptide. *J Cell Biol.* 1987; 105: 2335-2345.
59. Nybroe O, Albrechtsen M, Dahlin J, et al: Biosynthesis of the neural cell adhesion molecule: characterization of polypeptide C. *J Cell Biol.* 1985; 101: 2310-2315.
60. Abo T, Balch CM: A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J Immunol.* 1981; 127: 1024-1029.
61. Ong E, Yeh JC, Ding Y, Hindsgaul O, Fukuda M: Expression cloning of a human sulfotransferase that directs the synthesis of the HNK-1 glycan on the neural cell adhesion molecule and glycolipids. *J.Biol.Chem.* 1998; 273: 5190-5195.
62. Chou DK, Ilyas AA, Evans JE, Costello C, Quarles RH, Jungalwala FB: Structure of sulfated glucuronyl glycolipids in the nervous system reacting with HNK-1 antibody and some IgM paraproteins in neuropathy. *J Biol.Chem* 1986; 261: 11717-11725.
63. Krog L, Bock E: Glycosylation of neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *APMIS Suppl.* 1992; 27:53-70: 53-70.
64. Keilhauer G, Faissner A, Schachner M: Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies. *Nature* 1985; 316: 728-730.
65. Riopelle RJ, McGarry RC, Roder JC: Adhesion properties of a neuronal epitope recognized by the monoclonal antibody HNK-1. *Brain Res* 1986; 367: 20-25.
66. Cole GJ, Schachner M: Localization of the L2 monoclonal antibody binding site on chicken neural cell adhesion molecule (NCAM) and evidence for its role in NCAM- mediated cell adhesion. *Neurosci.Lett.* 1987; 78: 227-232.
67. Kruse J, Mailhammer R, Wernecke H, et al: Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1. *Nature* 1984; 311: 153-155.
68. Hoffman S, Edelman GM: Kinetics of homophilic binding by embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1983; 80: 5762-5766.
69. Edelman GM, Murray BA, Mege RM, Cunningham BA, Gallin WJ: Cellular expression of liver and neural cell adhesion molecules after transfection with their cDNAs results in specific cell-cell binding. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1987; 84: 8502-8506.
70. Pizzey JA, Rowett LH, Barton CH, Dickson G, Walsh FS: Intercellular adhesion mediated by human muscle neural cell adhesion molecule: effects of alternative exon use. *J Cell Biol.* 1989; 109: 3465-3476.
71. Hall AK, Nelson R, Rutishauser U: Binding properties of detergent-solubilized NCAM. *J.Cell Biol.* 1990; 110: 817-824.
72. Daniloff JK, Moore V, Oliver EH: Activity of neural cell adhesion molecule (N-CAM) components: a review. *Cytobios* 1994; 79: 97-106.
73. Frei T, von Bohlen u, Wille W, Schachner M: Different extracellular domains of the neural cell adhesion molecule (N- CAM) are involved in different functions. *J.Cell Biol.* 1992; 118: 177-194.
74. Cole GJ, Akeson R: Identification of a heparin binding domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM using synthetic peptides. *Neuron* 1989; 2: 1157-1165.
75. Reyes AA, Akeson R, Brezina L, Cole GJ: Structural requirements for neural cell adhesion molecule-heparin interaction. *Cell Regul.* 1990; 1: 567-576.
76. Rao Y, Wu XF, Garipey J, Rutishauser U, Siu CH: Identification of a peptide sequence involved in homophilic binding in the neural cell adhesion molecule NCAM. *J.Cell Biol.* 1992; 118: 937-949.
77. Rao Y, Wu XF, Yip P, Garipey J, Siu CH: Structural characterization of a homophilic binding site in the neural cell adhesion molecule. *J.Biol.Chem.* 1993; 268: 20630-20638.
78. Rao Y, Zhao X, Siu CH: Mechanism of homophilic binding mediated by the neural cell adhesion molecule NCAM.

- Evidence for isologous interaction. *J.Biol.Chem.* 1994; 269: 27540-27548.
79. Doherty P, Moolenaar CE, Ashton SV, Michalides RJ, Walsh FS: The VASE exon downregulates the neurite growth-promoting activity of NCAM 140. *Nature* 1992; 356: 791-793.
  80. Saffell JL, Walsh FS, Doherty P: Expression of NCAM containing VASE in neurons can account for a developmental loss in their neurite outgrowth response to NCAM in a cellular substratum. *J.Cell Biol.* 1994; 125: 427-436.
  81. Lahrtz F, Horstkorte R, Cremer H, Schachner M, Montag D: VASE-encoded peptide modifies NCAM- and L1-mediated neurite outgrowth. *J.Neurosci.Res.* 1997; 50: 62-68.
  82. Chen A, Haines S, Maxson K, Akeson RA: VASE exon expression alters NCAM-mediated cell-cell interactions. *J Neurosci.Res* 1994; 38: 483-492.
  83. Liu L, Haines S, Shew R, Akeson RA: Axon growth is enhanced by NCAM lacking the VASE exon when expressed in either the growth substrate or the growing axon. *J.Neurosci.Res.* 1993; 35: 327-345.
  84. Horstkorte R, Schachner M, Magyar JP, Vorherr T, Schmitz B: The fourth immunoglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth. *J Cell Biol.* 1993; 121: 1409-1421.
  85. Kadmon G, Kowitz A, Altevogt P, Schachner M: Functional cooperation between the neural adhesion molecules L1 and N-CAM is carbohydrate dependent. *J Cell Biol.* 1990; 110: 209-218.
  86. Kadmon G, Kowitz A, Altevogt P, Schachner M: The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J Cell Biol.* 1990; 110: 193-208.
  87. Livingston BD, Jacobs JL, Glick MC, Troy FA: Extended polysialic acid chains (n greater than 55) in glycoproteins from human neuroblastoma cells. *J.Biol.Chem.* 1988; 263: 9443-9448.
  88. Finne J: Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain. *J.Biol.Chem.* 1982; 257: 11966-11970.
  89. Finne J, Finne U, Deagostini-Bazin H, Goridis C: Occurrence of alpha 2-8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1983; 112: 482-487.
  90. Crossin KL, Edelman GM, Cunningham BA: Mapping of three carbohydrate attachment sites in embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule. *J.Cell Biol.* 1984; 99: 1848-1855.
  91. Nelson RW, Bates PA, Rutishauser U: Protein determinants for specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *J.Biol.Chem.* 1995; 270: 17171-17179.
  92. Arce V, Gristina R, Buttiglione M, Cremer H, Gennarini G, Rougon G: Use of chimeric F3-NCAM molecules to explore the properties of VASE exon in modulating polysialylation and neurite outgrowth. *Cell Adhes.Commun.* 1996; 3: 541-554.
  93. Crossin KL, Chuong CM, Edelman GM: Expression sequences of cell adhesion molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1985; 82: 6942-6946.
  94. Cunningham BA: Cell adhesion molecules as morphoregulators. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1995; 7: 628-633.
  95. Thiery JP, Duband JL, Rutishauser U, Edelman GM: Cell adhesion molecules in early chicken embryogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1982; 79: 6737-6741.
  96. Duband JL, Dufour S, Hatta K, Takeichi M, Edelman GM, Thiery JP: Adhesion molecules during somitogenesis in the avian embryo. *J.Cell Biol.* 1987; 104: 1361-1374.
  97. Kintner CR, Melton DA: Expression of Xenopus N-CAM RNA in ectoderm is an early response to neural induction. *Development* 1987; 99: 311-325.
  98. Levi G, Crossin KL, Edelman GM: Expression sequences and distribution of two primary cell adhesion molecules during embryonic development of *Xenopus laevis*. *J.Cell Biol.* 1987; 105: 2359-2372.
  99. Keane RW, Mehta PP, Rose B, Honig LS, Loewenstein WR, Rutishauser U: Neural differentiation, NCAM-mediated adhesion, and gap junctional communication in neuroectoderm. A study in vitro. *J.Cell Biol.* 1988; 106: 1307-1319.
  100. Klein G, Langegger M, Goridis C, Ekblom P: Neural cell adhesion molecules during embryonic induction and development of the kidney. *Development* 1988; 102: 749-761.
  101. Bally-Cuif L, Goridis C, Santoni MJ: The mouse NCAM gene displays a biphasic expression pattern during neural tube development. *Development* 1993; 117: 543-552.
  102. Doherty P, Barton CH, Dickson G, et al: Neuronal process outgrowth of human sensory neurons on monolayers of cells transfected with cDNAs for five human N-CAM isoforms. *J.Cell Biol.* 1989; 109: 789-798.
  103. Walsh FS, Doherty P: Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 1997; 13:425-56: 425-456.
  104. Walsh FS, Meiri K, Doherty P: Cell signalling and CAM-mediated neurite outgrowth. *Soc.Gen.Physiol.Ser.* 1997; 52:221-6: 221-226.
  105. Thanos S, Bonhoeffer F, Rutishauser U: Fiber-fiber interaction and tectal cues influence the development of the chicken retinotectal projection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1984; 81: 1906-1910.
  106. Hoffman S, Friedlander DR, Chuong CM, Grumet M, Edelman GM: Differential contributions of Ng-CAM and N-CAM to cell adhesion in different neural regions. *J.Cell Biol.* 1986; 103: 145-158.

107. Dickson G, Peck D, Moore SE, Barton CH, Walsh FS: Enhanced myogenesis in NCAM-transfected mouse myoblasts. *Nature* 1990; 344: 348-351.
108. Knudsen KA, McElwee SA, Myers L: A role for the neural cell adhesion molecule, NCAM, in myoblast interaction during myogenesis. *Dev.Biol.* 1990; 138: 159-168.
109. Rieger F, Grumet M, Edelman GM: N-CAM at the vertebrate neuromuscular junction. *J.Cell Biol.* 1985; 101: 285-293.
110. Schuch U, Lohse MJ, Schachner M: Neural cell adhesion molecules influence second messenger systems. *Neuron* 1989; 3: 13-20.
111. Doherty P, Ashton SV, Moore SE, Walsh FS: Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell* 1991; 67: 21-33.
112. Regan CM: Regulation of neural cell adhesion molecule sialylation state. *Int.J.Biochem.* 1991; 23: 513-523.
113. Rutishauser U: Polysialic acid and the regulation of cell interactions. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1996; 8: 679-684.
114. Rutishauser U, Landmesser L: Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends.Neurosci.* 1996; 19: 422-427.
115. Sadoul R, Hirn M, Deagostini-Bazin H, Rougon G, Goridis C: Adult and embryonic mouse neural cell adhesion molecules have different binding properties. *Nature* 1983; 304: 347-349.
116. Rutishauser U, Jessell TM: Cell adhesion molecules in vertebrate neural development. *Physiol.Rev.* 1988; 68: 819-857.
117. Hoffman S, Edelman GM: The mechanism of binding of neural cell adhesion molecules. *Adv.Exp.Med.Biol.* 1984; 181:147-60: 147-160.
118. Yang P, Major D, Rutishauser U: Role of charge and hydration in effects of polysialic acid on molecular interactions on and between cell membranes. *J.Biol.Chem.* 1994; 269: 23039-23044.
119. Acheson A, Sunshine JL, Rutishauser U: NCAM polysialic acid can regulate both cell-cell and cell-substrate interactions. *J.Cell Biol.* 1991; 114: 143-153.
120. Rutishauser U: NCAM and its polysialic acid moiety: a mechanism for pull/push regulation of cell interactions during development? *Dev.Suppl.* 1992; :99-104: 99-104.
121. Rutishauser U: Polysialic acid at the cell surface: biophysics in service of cell interactions and tissue plasticity. *J.Cell Biochem.* 1998; 70: 304-312.
122. Yang P, Yin X, Rutishauser U: Intercellular space is affected by the polysialic acid content of NCAM. *J.Cell Biol.* 1992; 116: 1487-1496.
123. Hekmat A, Bitter-Suermann D, Schachner M: Immunocytochemical localization of the highly polysialylated form of the neural cell adhesion molecule during development of the murine cerebellar cortex. *J.Comp.Neurol.* 1990; 291: 457-467.
124. Boisseau S, Nedelec J, Poirier V, Rougon G, Simonneau M: Analysis of high PSA N-CAM expression during mammalian spinal cord and peripheral nervous system development. *Development* 1991; 112: 69-82.
125. Lackie PM, Zuber C, Roth J: Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is widely expressed during organogenesis in mesodermal and endodermal derivatives. *Differentiation.* 1994; 57: 119-131.
126. Lackie PM, Zuber C, Roth J: Expression of polysialylated N-CAM during rat heart development. *Differentiation.* 1991; 47: 85-98.
127. Bartsch U, Kirchhoff F, Schachner M: Highly sialylated N-CAM is expressed in adult mouse optic nerve and retina. *J Neurocytol.* 1990; 19: 550-565.
128. Yamagata M, Herman JP, Sanes JR: Lamina-specific expression of adhesion molecules in developing chick optic tectum. *J.Neurosci.* 1995; 15: 4556-4571.
129. Chuong CM, Edelman GM: Alterations in neural cell adhesion molecules during development of different regions of the nervous system. *J.Neurosci.* 1984; 4: 2354-2368.
130. Finne J, Bitter-Suermann D, Goridis C, Finne U: An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues. *J.Immunol.* 1987; 138: 4402-4407.
131. Sunshine J, Balak K, Rutishauser U, Jacobson M: Changes in neural cell adhesion molecule (NCAM) structure during vertebrate neural development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1987; 84: 5986-5990.
132. Doherty P, Cohen J, Walsh FS: Neurite outgrowth in response to transfected N-CAM changes during development and is modulated by polysialic acid. *Neuron* 1990; 5: 209-219.
133. Zhang H, Miller RH, Rutishauser U: Polysialic acid is required for optimal growth of axons on a neuronal substrate. *J.Neurosci.* 1992; 12: 3107-3114.
134. Muller D, Stoppini L, Wang C, Kiss JZ: A role for polysialylated neural cell adhesion molecule in lesion- induced sprouting in hippocampal organotypic cultures. *Neuroscience* 1994; 61: 441-445.
135. Walsh FS, Doherty P: Cell adhesion molecules and neuronal regeneration. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1996; 8: 707-713.
136. Kiss JZ, Rougon G: Cell biology of polysialic acid. *Curr.Opin.Neurobiol.* 1997; 7: 640-646.

137. Bellairs R, Lear P, Yamada KM, Rutishauser U, Lash JW: Posterior extension of the chick nephric (Wolffian) duct: the role of fibronectin and NCAM polysialic acid. *Dev.Dyn.* 1995; 202: 333-342.
138. Fredette B, Rutishauser U, Landmesser L: Regulation and activity-dependence of N-cadherin, NCAM isoforms, and polysialic acid on chick myotubes during development. *J.Cell Biol.* 1993; 123: 1867-1888.
139. Tang J, Rutishauser U, Landmesser L: Polysialic acid regulates growth cone behavior during sorting of motor axons in the plexus region. *Neuron* 1994; 13: 405-414.
140. Honig MG, Rutishauser US: Changes in the segmental pattern of sensory neuron projections in the chick hindlimb under conditions of altered cell adhesion molecule function. *Dev.Biol.* 1996; 175: 325-337.
141. Landmesser L, Dahm L, Tang JC, Rutishauser U: Polysialic acid as a regulator of intramuscular nerve branching during embryonic development. *Neuron* 1990; 4: 655-667.
142. Tang J, Landmesser L, Rutishauser U: Polysialic acid influences specific pathfinding by avian motoneurons. *Neuron* 1992; 8: 1031-1044.
143. Yin X, Watanabe M, Rutishauser U: Effect of polysialic acid on the behavior of retinal ganglion cell axons during growth into the optic tract and tectum. *Development* 1995; 121: 3439-3446.
144. Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A: Chain migration of neuronal precursors. *Science* 1996; 271: 978-981.
145. Rousselot P, Lois C, Alvarez-Buylla A: Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice. *J Comp.Neurol.* 1995; 351: 51-61.
146. Hu H, Tomasiewicz H, Magnuson T, Rutishauser U: The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron* 1996; 16: 735-743.
147. Wang C, Rougon G, Kiss JZ: Requirement of polysialic acid for the migration of the O-2A glial progenitor cell from neurohypophyseal explants. *J.Neurosci.* 1994; 14: 4446-4457.
148. Yoshida K, Tobet SA, Crandall JE, Jimenez TP, Schwarting GA: The migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the developing rat is associated with a transient, caudal projection of the vomeronasal nerve. *J Neurosci.* 1995; 15: 7769-7777.
149. Schwanzel-Fukuda M, Crossin KL, Pfaff DW, Bouloux PM, Hardelin JP, Petit C: Migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in early human embryos. *J Comp.Neurol.* 1996; 366: 547-557.
150. Seki T, Arai Y: Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci.Res.* 1993; 17: 265-290.
151. Miragall F, Kadmon G, Schachner M: Expression of L1 and N-CAM cell adhesion molecules during development of the mouse olfactory system. *Dev.Biol.* 1989; 135: 272-286.
152. Bonfanti L, Theodosis DT: Expression of polysialylated neural cell adhesion molecule by proliferating cells in the subependymal layer of the adult rat, in its rostral extension and in the olfactory bulb. *Neuroscience* 1994; 62: 291-305.
153. Bonfanti L, Olive S, Poulain DA, Theodosis DT: Mapping of the distribution of polysialylated neural cell adhesion molecule throughout the central nervous system of the adult rat: an immunohistochemical study. *Neuroscience* 1992; 49: 419-436.
154. Theodosis DT, Bonfanti L, Olive S, Rougon G, Poulain DA: Adhesion molecules and structural plasticity of the adult hypothalamo- neurohypophysial system. *Psychoneuroendocrinology.* 1994; 19: 455-462.
155. Theodosis DT, Rougon G, Poulain DA: Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: polysialylated neural cell adhesion molecule in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1991; 88: 5494-5498.
156. Theodosis DT, El Majdoubi M, Pierre K, Poulain DA: Factors governing activity-dependent structural plasticity of the hypothalamoneurohypophysial system. *Cell Mol.Neurobiol.* 1998; 18: 285-298.
157. Glass JD, Lee W, Shen H, Watanabe M: Expression of immunoreactive polysialylated neural cell adhesion molecule in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroendocrinology.* 1994; 60: 87-95.
158. Shen H, Watanabe M, Tomasiewicz H, Rutishauser U, Magnuson T, Glass JD: Role of neural cell adhesion molecule and polysialic acid in mouse circadian clock function. *J.Neurosci.* 1997; 17: 5221-5229.
159. Goodman CS, Shatz CJ: Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 1993; 72 Suppl:77-98: 77-98.
160. Doherty P, Fazeli MS, Walsh FS: The neural cell adhesion molecule and synaptic plasticity. *J.Neurobiol.* 1995; 26: 437-446.
161. Fields RD, Itoh K: Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends.Neurosci.* 1996; 19: 473-480.
162. Martin KC, Kandel ER: Cell adhesion molecules, CREB, and the formation of new synaptic connections. *Neuron* 1996; 17: 567-570.
163. Kiss JZ, Wang C, Olive S, et al: Activity-dependent mobilization of the adhesion molecule polysialic NCAM to the cell surface of neurons and endocrine cells. *EMBO J.* 1994; 13: 5284-5292.
164. Kiss JZ, Wang C, Rougon G: Nerve-dependent expression of high polysialic acid neural cell adhesion molecule in

- neurohypophysial astrocytes of adult rats. *Neuroscience* 1993; 53: 213-221.
165. Garcia-Segura LM, Canas B, Parducz A, et al: Estradiol promotion of changes in the morphology of astroglia growing in culture depends on the expression of polysialic acid of neural membranes. *Glia* 1995; 13: 209-216.
  166. Kiss JZ: A role of adhesion molecules in neuroglial plasticity. *Mol.Cell Endocrinol.* 1998; 140: 89-94.
  167. Muller D, Wang C, Skibo G, et al: PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron* 1996; 17: 413-422.
  168. Becker CG, Artola A, Gerardy-Schahn R, Becker T, Welzl H, Schachner M: The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J.Neurosci.Res.* 1996; 45: 143-152.
  169. Lüthi A, Laurent JP, Figurov A, Muller D, Schachner M: Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature* 1994; 372: 777-779.
  170. Ronn LC, Bock E, Linnemann D, Jahnsen H: NCAM-antibodies modulate induction of long-term potentiation in rat hippocampal CA1. *Brain Res.* 1995; 677: 145-151.
  171. Edwards FA: LTP--a structural model to explain the inconsistencies. *Trends.Neurosci.* 1995; 18: 250-255.
  172. Stevens CF: A million dollar question: does LTP = memory? *Neuron* 1998; 20: 1-2.
  173. Buchs PA, Muller D: Induction of long-term potentiation is associated with major ultrastructural changes of activated synapses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1996; 93: 8040-8045.
  174. Regan CM, Fox GB: Polysialylation as a regulator of neural plasticity in rodent learning and aging. *Neurochem.Res.* 1995; 20: 593-598.
  175. Fox GB, O'Connell AW, Murphy KJ, Regan CM: Memory consolidation induces a transient and time-dependent increase in the frequency of neural cell adhesion molecule polysialylated cells in the adult rat hippocampus. *J.Neurochem.* 1995; 65: 2796-2799.
  176. Arami S, Jucker M, Schachner M, Welzl H: The effect of continuous intraventricular infusion of L1 and NCAM antibodies on spatial learning in rats. *Behav.Brain Res.* 1996; 81: 81-87.
  177. Murphy KJ, O'Connell AW, Regan CM: Repetitive and transient increases in hippocampal neural cell adhesion molecule polysialylation state following multitrial spatial training. *J.Neurochem.* 1996; 67: 1268-1274.
  178. Odumeru O, Murphy KJ, O'Connell AW, Regan CM, Shiotani T: Influence of nefiracetam on NGF-induced neurogenesis and neural cell adhesion molecule polysialic acid expression: in vivo and in vitro comparisons. *Behav.Brain Res.* 1997; 83: 173-178.
  179. Dey PM, Polunas MA, Philbert MA, Reuhl KR: Altered expression of polysialylated NCAM in mouse hippocampus following trimethyltin administration. *Neurotoxicology.* 1997; 18: 633-643.
  180. Solomonio RO, McCabe BJ, Horn G: Neural cell adhesion molecules, learning, and memory in the domestic chick. *Behav.Neurosci.* 1998; 112: 646-655.
  181. Skibo GG, Davies HA, Rusakov DA, Stewart MG, Schachner M: Increased immunogold labelling of neural cell adhesion molecule isoforms in synaptic active zones of the chick striatum 5-6 hours after one-trial passive avoidance training. *Neuroscience* 1998; 82: 1-5.
  182. Cremer H, Lange R, Christoph A, et al: Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 1994; 367: 455-459.
  183. Tomasiewicz H, Ono K, Yee D, et al: Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron* 1993; 11: 1163-1174.
  184. O'Connell AW, Fox GB, Barry T, et al: Spatial learning activates neural cell adhesion molecule polysialylation in a corticohippocampal pathway within the medial temporal lobe. *J.Neurochem.* 1997; 68: 2538-2546.
  185. Treloar H, Tomasiewicz H, Magnuson T, Key B: The central pathway of primary olfactory axons is abnormal in mice lacking the N-CAM-180 isoform. *J.Neurobiol.* 1997; 32: 643-658.
  186. Cremer H, Chazal G, Goridis C, Represa A: NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Mol.Cell Neurosci.* 1997; 8: 323-335.
  187. Ono K, Tomasiewicz H, Magnuson T, Rutishauser U: N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron* 1994; 13: 595-609.
  188. Seki T, Rutishauser U: Removal of polysialic acid-neural cell adhesion molecule induces aberrant mossy fiber innervation and ectopic synaptogenesis in the hippocampus. *J.Neurosci.* 1998; 18: 3757-3766.
  189. Linnemann D, Raz A, Bock E: Differential expression of cell adhesion molecules in variants of K1735 melanoma cells differing in metastatic capacity. *Int.J.Cancer* 1989; 43: 709-712.
  190. Edvardsen K, Pedersen PH, Bjerkvig R, et al: Transfection of glioma cells with the neural-cell adhesion molecule NCAM: effect on glioma-cell invasion and growth in vivo. *Int.J.Cancer* 1994; 58: 116-122.
  191. Brackenbury R, Greenberg ME, Edelman GM: Phenotypic changes and loss of N-CAM-mediated adhesion in transformed embryonic chicken retinal cells. *J.Cell Biol.* 1984; 99: 1944-1954.
  192. Aoki J, Umeda M, Takio K, et al: Neural cell adhesion molecule mediates contact-dependent inhibition of growth of near-diploid mouse fibroblast cell line m5S/1M. *J Cell Biol.* 1991; 115: 1751-1761.

193. Bitter-Suermann D, Roth J: Monoclonal antibodies to polysialic acid reveal epitope sharing between invasive pathogenic bacteria, differentiating cells and tumor cells. *Immunol.Res* 1987; 6: 225-237.
194. Zuber C, Roth J: The relationship of polysialic acid and the neural cell adhesion molecule N-CAM in Wilms tumor and their subcellular distributions. *Eur.J.Cell Biol.* 1990; 51: 313-321.
195. Roth J, Zuber C, Wagner P, et al: Reexpression of poly(sialic acid) units of the neural cell adhesion molecule in Wilms tumor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1988; 85: 2999-3003.
196. Glüer S, Schelp C, Madry N, von Schweinitz D, Eckhardt M, Gerardy-Schahn R: Serum polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood neuroblastoma. *Br.J.Cancer* 1998; 78: 106-110.
197. Lipinski M, Hirsch MR, Deagostini-Bazin H, Yamada O, Tursz T, Goridis C: Characterization of neural cell adhesion molecules (NCAM) expressed by Ewing and neuroblastoma cell lines. *Int.J.Cancer* 1987; 40: 81-86.
198. Glick MC, Livingston BD, Shaw GW, Jacobs JL, Troy FA: Expression of polysialic acid on human neuroblastoma. *Prog.Clin.Biol.Res.* 1991; 366:267-74: 267-274.
199. Komada Y, Zhang XL, Zhou YW, et al: Flow cytometric analysis of peripheral blood and bone marrow for tumor cells in patients with neuroblastoma. *Cancer* 1998; 82: 591-599.
200. Figarella-Branger DF, Durbec PL, Rougon GN: Differential spectrum of expression of neural cell adhesion molecule isoforms and L1 adhesion molecules on human neuroectodermal tumors. *Cancer Res.* 1990; 50: 6364-6370.
201. Figarella-Branger D, Dubois C, Chauvin P, De Victor B, Gentet JC, Rougon G: Correlation between polysialic-neural cell adhesion molecule levels in CSF and medulloblastoma outcomes. *J.Clin.Oncol.* 1996; 14: 2066-2072.
202. Provias JP, Becker LE: Cellular and molecular pathology of medulloblastoma. *J.Neurooncol.* 1996; 29: 35-43.
203. Glüer S, Schelp C, von Schweinitz D, Gerardy-Schahn R: Polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood rhabdomyosarcoma. *Pediatr.Res.* 1998; 43: 145-147.
204. Takamatsu K, Auerbach B, Gerardy-Schahn R, Eckhardt M, Jaques G, Madry N: Characterization of tumor-associated neural cell adhesion molecule in human serum. *Cancer Res.* 1994; 54: 2598-2603.
205. Moolenaar CE, Muller EJ, Schol DJ, et al: Expression of neural cell adhesion molecule-related sialoglycoprotein in small cell lung cancer and neuroblastoma cell lines H69 and CHP-212. *Cancer Res.* 1990; 50: 1102-1106.
206. Kibbelaar RE, Moolenaar CE, Michalides RJ, Bitter-Suermann D, Addis BJ, Mooi WJ: Expression of the embryonal neural cell adhesion molecule N-CAM in lung carcinoma. Diagnostic usefulness of monoclonal antibody 735 for the distinction between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer. *J.Pathol.* 1989; 159: 23-28.
207. Kaiser U, Auerbach B, Oldenburg M: The neural cell adhesion molecule NCAM in multiple myeloma. *Leuk.Lymphoma.* 1996; 20: 389-395.
208. Nilsson O: Carbohydrate antigens in human lung carcinomas. *APMIS Suppl.* 1992; 27:149-61: 149-161.
209. Rygaard K, Moller C, Bock E, Spang-Thomsen M: Expression of cadherin and NCAM in human small cell lung cancer cell lines and xenografts. *Br.J.Cancer* 1992; 65: 573-577.
210. Kern WF, Spier CM, Miller TP, Grogan TM: NCAM (CD56)-positive malignant lymphoma. *Leuk.Lymphoma.* 1993; 12: 1-10.
211. Kwong YL, Chan AC, Liang R, et al: CD56+ NK lymphomas: clinicopathological features and prognosis. *Br.J.Haematol.* 1997; 97: 821-829.
212. Ansai S, Maeda K, Yamakawa M, et al: CD56-positive (nasal-type T/NK cell) lymphoma arising on the skin. Report of two cases and review of the literature. *J.Cutan.Pathol.* 1997; 24: 468-476.
213. Scheidegger EP, Lackie PM, Papay J, Roth J: In vitro and in vivo growth of clonal sublines of human small cell lung carcinoma is modulated by polysialic acid of the neural cell adhesion molecule. *Lab.Invest.* 1994; 70: 95-106.
214. Michalides R, Kwa B, Springall D, et al: NCAM and lung cancer. *Int.J.Cancer Suppl.* 1994; 8:34-7: 34-37.
215. Jaques G, Auerbach B, Pritsch M, Wolf M, Madry N, Havemann K: Evaluation of serum neural cell adhesion molecule as a new tumor marker in small cell lung cancer. *Cancer* 1993; 72: 418-425.
216. Komminoth P, Roth J, Lackie PM, Bitter-Suermann D, Heitz PU: Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule distinguishes small cell lung carcinoma from carcinoids. *Am.J.Pathol.* 1991; 139: 297-304.
217. Poley S, Stieber P, Nussler V, Pahl H, Fateh-Moghadam A: Evaluation of serum neural cell adhesion molecule as a prognostic marker in multiple myeloma. *Anticancer Res.* 1997; 17: 3021-3024.
218. Kaiser U, Oldenburg M, Jaques G, Auerbach B, Havemann K: Soluble CD56 (NCAM): a new differential-diagnostic and prognostic marker in multiple myeloma. *Ann.Hematol.* 1996; 73: 121-126.
219. Ledermann JA, Pasini F, Olabiran Y, Pelosi G: Detection of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in serum of patients with small-cell lung cancer (SCLC) with "limited" or "extensive" disease, and bone-marrow infiltration. *Int.J.Cancer Suppl.* 1994; 8:49-52: 49-52.
220. Glüer S, Schelp C, Gerardy-Schahn R, von Schweinitz D: Polysialylated neural cell adhesion molecule as a marker for differential diagnosis in pediatric tumors. *J.Pediatr.Surg.* 1998; 33: 1516-1520.
221. Scheidegger P, Papay J, Zuber C, Lackie PM, Roth J: Cellular site of synthesis and dynamics of cell surface re-expression of polysialic acid of the neural cell adhesion molecule. *Eur.J.Biochem.* 1994; 225: 1097-1103.
222. McCoy RD, Vimr ER, Troy FA: CMP-NeuNAc:poly-alpha-2,8-sialosyl sialyltransferase and the biosynthesis of

- polysialosyl units in neural cell adhesion molecules. *J.Biol.Chem.* 1985; 260: 12695-12699.
223. Alcaraz G, Goridis C: Biosynthesis and processing of polysialylated NCAM by AtT-20 cells. *Eur.J.Cell Biol.* 1991; 55: 165-173.
224. Tsuji S, Datta AK, Paulson JC: Systematic nomenclature for sialyltransferases. *Glycobiology.* 1996; 6: v-vii
225. Livingston BD, Paulson JC: Polymerase chain reaction cloning of a developmentally regulated member of the sialyltransferase gene family. *J.Biol.Chem.* 1993; 268: 11504-11507.
226. Eckhardt M, Mühlenhoff M, Bethe A, Koopman J, Frosch M, Gerardy-Schahn R: Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1. *Nature* 1995; 373: 715-718.
227. Nakayama J, Fukuda MN, Fredette B, Ranscht B, Fukuda M: Expression cloning of a human polysialyltransferase that forms the polysialylated neural cell adhesion molecule present in embryonic brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1995; 92: 7031-7035.
228. Yoshida Y, Kojima N, Tsuji S: Molecular cloning and characterization of a third type of N-glycan alpha 2,8-sialyltransferase from mouse lung. *J.Biochem.(Tokyo.)* 1995; 118: 658-664.
229. Scheidegger EP, Sternberg LR, Roth J, Lowe JB: A human STX cDNA confers polysialic acid expression in mammalian cells. *J.Biol.Chem.* 1995; 270: 22685-22688.
230. Kojima N, Yoshida Y, Tsuji S: A developmentally regulated member of the sialyltransferase family (ST8Sia II, STX) is a polysialic acid synthase. *FEBS Lett.* 1995; 373: 119-122.
231. Wood GK, Liang JJ, Flores G, Ahmad S, Quirion R, Srivastava LK: Cloning and in situ hybridization analysis of the expression of polysialyltransferase mRNA in the developing and adult rat brain. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 1997; 51: 69-81.
232. Kudo M, Takayama E, Tashiro K, et al: Cloning and expression of an alpha-2,8-polysialyltransferase (STX) from *Xenopus laevis*. *Glycobiology.* 1998; 8: 771-777.
233. Kleene R, Berger EG: The molecular and cell biology of glycosyltransferases. *Biochim.Biophys Acta* 1993; 1154: 283-325.
234. Drickamer K: A conserved disulphide bond in sialyltransferases. *Glycobiology* 1993; 3: 2-3.
235. Datta AK, Paulson JC: The sialyltransferase "sialylmotif" participates in binding the donor substrate CMP-NeuAc. *J.Biol.Chem.* 1995; 270: 1497-1500.
236. Geremia RA, Harduin-Lepers A, Delannoy P: Identification of two novel conserved amino acid residues in eukaryotic sialyltransferases: implications for their mechanism of action. *Glycobiology.* 1997; 7: v-vii
237. Datta AK, Sinha A, Paulson JC: Mutation of the sialyltransferase S-sialylmotif alters the kinetics of the donor and acceptor substrates. *J.Biol.Chem.* 1998; 273: 9608-9614.
238. Field MC, Wainwright LJ: Molecular cloning of eukaryotic glycoprotein and glycolipid glycosyltransferases: a survey. *Glycobiology.* 1995; 5: 463-472.
239. Kojima N, Yoshida Y, Kurosawa N, Lee YC, Tsuji S: Enzymatic activity of a developmentally regulated member of the sialyltransferase family (STX): evidence for alpha 2,8- sialyltransferase activity toward N-linked oligosaccharides. *FEBS Lett.* 1995; 360: 1-4.
240. Mühlenhoff M, Eckhardt M, Bethe A, Frosch M, Gerardy-Schahn R: Polysialylation of NCAM by a single enzyme. *Curr.Biol.* 1996; 6: 1188-1191.
241. Mühlenhoff M, Eckhardt M, Bethe A, Frosch M, Gerardy-Schahn R: Autocatalytic polysialylation of polysialyltransferase-1. *EMBO J.* 1996; 15: 6943-6950.
242. Close BE, Colley KJ: In vivo autopolysialylation and localization of the polysialyltransferases PST and STX. *J Biol.Chem* 1998; 273: 34586-34593.
243. Kojima N, Tachida Y, Tsuji S: Two polysialic acid synthases, mouse ST8Sia II and IV, synthesize different degrees of polysialic acids on different substrate glycoproteins in mouse neuroblastoma Neuro2a cells. *J.Biochem.(Tokyo.)* 1997; 122: 1265-1273.
244. Angata K, Nakayama J, Fredette B, Chong K, Ranscht B, Fukuda M: Human STX polysialyltransferase forms the embryonic form of the neural cell adhesion molecule. Tissue-specific expression, neurite outgrowth, and chromosomal localization in comparison with another polysialyltransferase, PST. *J.Biol.Chem.* 1997; 272: 7182-7190.
245. Ong E, Nakayama J, Angata K, et al: Developmental regulation of polysialic acid synthesis in mouse directed by two polysialyltransferases, PST and STX. *Glycobiology.* 1998; 8: 415-424.
246. Phillips GR, Krushel LA, Crossin KL: Developmental expression of two rat sialyltransferases that modify the neural cell adhesion molecule, N-CAM. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 1997; 102: 143-155.
247. Hildebrandt H, Becker C, Murau M, Gerardy-Schahn R, Rahmann H: Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development. *J Neurochem.* 1998; 71: 2339-2348.
248. Häyrynen J, Bitter-Suermann D, Finne J: Interaction of meningococcal group B monoclonal antibody and its Fab fragment with alpha 2-8-linked sialic acid polymers: requirement of a long oligosaccharide segment for binding. *Mol.Immunol.* 1989; 26: 523-529.

249. Häyrynen J, Jennings H, Raff HV, et al: Antibodies to polysialic acid and its N-propyl derivative: binding properties and interaction with human embryonal brain glycopeptides. *J.Infect.Dis.* 1995; 171: 1481-1490.
250. Michon F, Brisson JR, Jennings HJ: Conformational differences between linear alpha (2----8)-linked homosialooligosaccharides and the epitope of the group B meningococcal polysaccharide. *Biochemistry* 1987; 26: 8399-8405.
251. Brisson JR, Baumann H, Imberty A, Perez S, Jennings HJ: Helical epitope of the group B meningococcal alpha(2-8)-linked sialic acid polysaccharide. *Biochemistry* 1992; 31: 4996-5004.
252. Kabat EA, Nickerson KG, Liao J, et al: A human monoclonal macroglobulin with specificity for alpha(2----8)- linked poly-N-acetyl neuraminic acid, the capsular polysaccharide of group B meningococci and Escherichia coli K1, which crossreacts with polynucleotides and with denatured DNA. *J Exp.Med.* 1986; 164: 642-654.
253. Raff HV, Devereux D, Shuford W, Abbott-Brown D, Maloney G: Human monoclonal antibody with protective activity for Escherichia coli K1 and Neisseria meningitidis group B infections. *J Infect.Dis.* 1988; 157: 118-126.
254. Rougon G, Dubois C, Buckley N, Magnani JL, Zollinger W: A monoclonal antibody against meningococcus group B polysaccharides distinguishes embryonic from adult N-CAM. *J.Cell Biol.* 1986; 103: 2429-2437.
255. Seki T, Arai Y: Expression of highly polysialylated NCAM in the neocortex and piriform cortex of the developing and the adult rat. *Anat.Embryol.(Berl.)* 1991; 184: 395-401.
256. Finne J, Makela PH: Cleavage of the polysialosyl units of brain glycoproteins by a bacteriophage endosialidase. Involvement of a long oligosaccharide segment in molecular interactions of polysialic acid. *J.Biol.Chem.* 1985; 260: 1265-1270.
257. Pelkonen S, Pelkonen J, Finne J: Common cleavage pattern of polysialic acid by bacteriophage endosialidases of different properties and origins. *J.Virol.* 1989; 63: 4409-4416.
258. Tomlinson S, Taylor PW: Neuraminidase associated with coliphage E that specifically depolymerizes the Escherichia coli K1 capsular polysaccharide. *J Virol.* 1985; 55: 374-378.
259. Hallenbeck PC, Vimr ER, Yu F, Bassler B, Troy FA: Purification and properties of a bacteriophage-induced endo-N-acetylneuraminidase specific for poly-alpha-2,8-sialosyl carbohydrate units. *J.Biol.Chem.* 1987; 262: 3553-3561.
260. Petter JG, Vimr ER: Complete nucleotide sequence of the bacteriophage K1F tail gene encoding endo-N-acetylneuraminidase (endo-N) and comparison to an endo-N homolog in bacteriophage PK1E. *J.Bacteriol.* 1993; 175: 4354-4363.
261. Gerardy-Schahn R, Bethe A, Brennecke T, et al: Molecular cloning and functional expression of bacteriophage PK1E- encoded endoneuraminidase Endo NE. *Mol.Microbiol.* 1995; 16: 441-450.
262. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS: 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic.Acids.Res* 1991; 19: 4008
263. Hecker KH, Roux KH: High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques* 1996; 20: 478-485.
264. Francis F, Zehetner G, Høglund M, Lehrach H: Construction and preliminary analysis of the ICRF human P1 library. *Genet.Anal.Tech.Appl.* 1994; 11: 148-157.
265. Sternberg N: Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification, and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1990; 87: 103-107.
266. Siebert PD, Chenchik A, Kellogg DE, Lukyanov KA, Lukyanov SA: An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic.Acids.Res* 1995; 23: 1087-1088.
267. Kellogg DE, Rybalkin I, Chen S, et al: TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *Biotechniques* 1994; 16: 1134-1137.
268. Barnes WM: PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1994; 91: 2216-2220.
269. Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R: Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1994; 91: 5695-5699.
270. Yoshida Y, Kurosawa N, Kanematsu T, Kojima N, Tsuji S: Genomic structure and promoter activity of the mouse polysialic acid synthase gene (mST8Sia II). Brain-specific expression from a TATA-less GC-rich sequence. *J.Biol.Chem.* 1996; 271: 30167-30173.
271. Takashima S, Yoshida Y, Kanematsu T, Kojima N, Tsuji S: Genomic structure and promoter activity of the mouse polysialic acid synthase (mST8Sia IV/PST) gene. *J.Biol.Chem.* 1998; 273: 7675-7683.
272. Eckhardt M, Gerardy-Schahn R: Genomic organization of the murine polysialyltransferase gene ST8SiaIV (PST-1). *Glycobiology.* 1998; 8: 1165-1172.
273. Azizkhan JC, Jensen DE, Pierce AJ, Wade M: Transcription from TATA-less promoters: dihydrofolate reductase as a model. *Crit.Rev.Eukaryot.Gene Expr.* 1993; 3: 229-254.
274. Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, et al: Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic.Acids.Res* 1998; 26: 362-367.
275. Wingender E: Recognition of regulatory regions in genomic sequences. *J Biotechnol.* 1994; 35: 273-280.
276. Wingender E, Dietze P, Karas H, Knuppel R: TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA

- binding sites. *Nucleic.Acids.Res* 1996; 24: 238-241.
277. Wingender E, Karas H, Knuppel R: TRANSFAC database as a bridge between sequence data libraries and biological function. *Pac.Symp.Biocomput.* 1997; :477-85: 477-485.
278. Grange T, Roux J, Rigaud G, Pictet R: Cell-type specific activity of two glucocorticoid responsive units of rat tyrosine aminotransferase gene is associated with multiple binding sites for C/EBP and a novel liver-specific nuclear factor. *Nucleic.Acids.Res* 1991; 19: 131-139.
279. Hsu W, Kerppola TK, Chen PL, Curran T, Chen-Kiang S: Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region. *Mol.Cell Biol.* 1994; 14: 268-276.
280. LeClair KP, Blonar MA, Sharp PA: The p50 subunit of NF-kappa B associates with the NF-IL6 transcription factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1992; 89: 8145-8149.
281. Akira S, Isshiki H, Sugita T, et al: A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J* 1990; 9: 1897-1906.
282. Margalit Y, Yarus S, Shapira E, Gruenbaum Y, Fainsod A: Isolation and characterization of target sequences of the chicken CdxA homeobox gene. *Nucleic.Acids.Res* 1993; 21: 4915-4922.
283. Paca-Uccaralertkun S, Zhao LJ, Adya N, et al: In vitro selection of DNA elements highly responsive to the human T-cell lymphotropic virus type I transcriptional activator, Tax. *Mol.Cell Biol.* 1994; 14: 456-462.
284. Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH: Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 1993; 365: 855-859.
285. Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, et al: Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 1994; 370: 223-226.
286. Merika M, Orkin SH: DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol.Cell Biol.* 1993; 13: 3999-4010.
287. Merika M, Orkin SH: Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF. *Mol.Cell Biol.* 1995; 15: 2437-2447.
288. Lo K, Landau NR, Smale ST: LyF-1, a transcriptional regulator that interacts with a novel class of promoters for lymphocyte-specific genes. *Mol.Cell Biol.* 1991; 11: 5229-5243.
289. Morris JF, Hromas R, Rauscher FJ: Characterization of the DNA-binding properties of the myeloid zinc finger protein MZF1: two independent DNA-binding domains recognize two DNA consensus sequences with a common G-rich core. *Mol.Cell Biol.* 1994; 14: 1786-1795.
290. Hromas R, Davis B, Rauscher FJ, et al: Hematopoietic transcriptional regulation by the myeloid zinc finger gene, MZF-1. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 1996; 211:159-64: 159-164.
291. Hromas R, Collins SJ, Hickstein D, et al: A retinoic acid-responsive human zinc finger gene, MZF-1, preferentially expressed in myeloid cells. *J Biol.Chem* 1991; 266: 14183-14187.
292. Chen CY, Schwartz RJ: Identification of novel DNA binding targets and regulatory domains of a murine tinman homeodomain factor, nkx-2.5. *J Biol.Chem* 1995; 270: 15628-15633.
293. Chen CY, Schwartz RJ: Competition between negative acting YY1 versus positive acting serum response factor and tinman homologue Nkx-2.5 regulates cardiac alpha-actin promoter activity. *Mol.Endocrinol.* 1997; 11: 812-822.
294. Groenen MA, Dijkhof RJ, van der Poel JJ, van Diggelen R, Verstege E: Multiple octamer binding sites in the promoter region of the bovine alpha s2-casein gene. *Nucleic.Acids.Res* 1992; 20: 4311-4318.
295. Thiesen HJ, Bach C: Target Detection Assay (TDA): a versatile procedure to determine DNA binding sites as demonstrated on SP1 protein. *Nucleic.Acids.Res* 1990; 18: 3203-3209.
296. Chodosh LA, Baldwin AS, Carthew RW, Sharp PA: Human CCAAT-binding proteins have heterologous subunits. *Cell* 1988; 53: 11-24.
297. Kunsch C, Ruben SM, Rosen CA: Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol.Cell Biol.* 1992; 12: 4412-4421.
298. Stein B, Baldwin ASJ, Ballard DW, Greene WC, Angel P, Herrlich P: Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J* 1993; 12: 3879-3891.
299. Stein B, Cogswell PC, Baldwin ASJ: Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. *Mol.Cell Biol.* 1993; 13: 3964-3974.
300. Perkins ND, Agranoff AB, Pascal E, Nabel GJ: An interaction between the DNA-binding domains of RelA(p65) and Sp1 mediates human immunodeficiency virus gene activation. *Mol.Cell Biol.* 1994; 14: 6570-6583.
301. Rikitake Y, Moran E: DNA-binding properties of the E1A-associated 300-kilodalton protein. *Mol.Cell Biol.* 1992; 12: 2826-2836.
302. Eckner R, Ewen ME, Newsome D, et al: Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev.* 1994; 8: 869-884.
303. Funahashi J, Sekido R, Murai K, Kamachi Y, Kondoh H: Delta-crystallin enhancer binding protein delta EF1 is a zinc finger- homeodomain protein implicated in postgastrulation embryogenesis. *Development* 1993; 119: 433-446.
304. Harada R, Berube G, Tamplin OJ, Denis-Larose C, Nepveu A: DNA-binding specificity of the cut repeats from the human cut-like protein. *Mol.Cell Biol.* 1995; 15: 129-140.

305. Dufort D, Nepveu A: The human cut homeodomain protein represses transcription from the c- myc promoter. *Mol.Cell Biol.* 1994; 14: 4251-4257.
306. Mailly F, Berube G, Harada R, Mao PL, Phillips S, Nepveu A: The human cut homeodomain protein can repress gene expression by two distinct mechanisms: active repression and competition for binding site occupancy. *Mol.Cell Biol.* 1996; 16: 5346-5357.
307. Shrivastava A, Calame K: An analysis of genes regulated by the multi-functional transcriptional regulator Yin Yang-1. *Nucleic.Acids.Res* 1994; 22: 5151-5155.
308. Horvath CM, Wen Z, Darnell JEJ: A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev.* 1995; 9: 984-994.
309. Gutch MJ, Daly C, Reich NC: Tyrosine phosphorylation is required for activation of an alpha interferon-stimulated transcription factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1992; 89: 11411-11415.
310. Sadowski HB, Shuai K, Darnell JEJ, Gilman MZ: A common nuclear signal transduction pathway activated by growth factor and cytokine receptors. *Science* 1993; 261: 1739-1744.
311. Angel P, Imagawa M, Chiu R, et al: Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 1987; 49: 729-739.
312. Neuberg M, Schuermann M, Hunter JB, Muller R: Two functionally different regions in Fos are required for the sequence- specific DNA interaction of the Fos/Jun protein complex. *Nature* 1989; 338: 589-590.
313. Van Dijk MA, Voorhoeve PM, Murre C: Pbx1 is converted into a transcriptional activator upon acquiring the N-terminal region of E2A in pre-B-cell acute lymphoblastoid leukemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1993; 90: 6061-6065.
314. Phelan ML, Rambaldi I, Featherstone MS: Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. *Mol.Cell Biol.* 1995; 15: 3989-3997.
315. Nourse J, Mellentin JD, Galili N, et al: Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. *Cell* 1990; 60: 535-545.
316. Berger J, Hauber J, Hauber R, Geiger R, Cullen BR: Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene* 1988; 66: 1-10.
317. Cullen BR, Malim MH: Secreted placental alkaline phosphatase as a eukaryotic reporter gene. *Methods Enzymol.* 1992; 216:362-8: 362-368.
318. Andersson AM, Gaardsvoll H, Giladi E, Dahl B, Bock E: Characterization of rat brain NCAM mRNA using DNA oligonucleotide probes. *FEBS Lett.* 1990; 263: 385-388.
319. Linnemann D, Gaardsvoll H, Olsen M, Bock E: Expression of NCAM mRNA and polypeptides in aging rat brain. *Int.J.Dev.Neurosci.* 1993; 11: 71-81.
320. Stoykova LI, Glick MC: Purification of an alpha-2,8-sialyltransferase, a potential initiating enzyme for the biosynthesis of polysialic acid in human neuroblastoma cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1995; 217: 777-783.
321. Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A, et al: International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin.Oncol.* 1988; 6: 1874-1881.
322. Hughes M, Marsden HB, Palmer MK: Histologic patterns of neuroblastoma related to prognosis and clinical staging. *Cancer* 1974; 34: 1706-1711.
323. Lenka N, Vijayarathay C, Mullick J, Avadhani NG: Structural organization and transcription regulation of nuclear genes encoding the mammalian cytochrome c oxidase complex. *Prog.Nucleic.Acid.Res Mol.Biol.* 1998; 61:309-44: 309-344.
324. Pomp D, Medrano JF: Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction. *Biotechniques* 1991; 10: 58-59.
325. Kojima N, Kono M, Yoshida Y, Tachida Y, Nakafuku M, Tsuji S: Biosynthesis and expression of polysialic acid on the neural cell adhesion molecule is predominantly directed by ST8Sia II/STX during in vitro neuronal differentiation. *J.Biol.Chem.* 1996; 271: 22058-22062.
326. Tsuji S: Molecular cloning and functional analysis of sialyltransferases. *J.Biochem.(Tokyo.)* 1996; 120: 1-13.
327. Twyman RM, Jones EA: The regulation of neuron-specific gene expression in the mammalian nervous system. *J Neurogenet.* 1995; 10: 67-101.
328. Chin LS, Li L, Greengard P: Neuron-specific expression of the synapsin II gene is directed by a specific core promoter and upstream regulatory elements. *J Biol.Chem* 1994; 269: 18507-18513.
329. Sauerwald A, Hoesche C, Oschwald R, Kilmann MW: The 5'-flanking region of the synapsin I gene. A G+C-rich, TATA- and CAAT-less, phylogenetically conserved sequence with cell type-specific promoter function. *J Biol.Chem* 1990; 265: 14932-14937.
330. Sehgal A, Patil N, Chao M: A constitutive promoter directs expression of the nerve growth factor receptor gene. *Mol.Cell Biol.* 1988; 8: 3160-3167.
331. Wang MM, Tsai RY, Schrader KA, Reed RR: Genes encoding components of the olfactory signal transduction cascade contain a DNA binding site that may direct neuronal expression. *Mol.Cell Biol.* 1993; 13: 5805-5813.
332. Saffer JD, Jackson SP, Annarella MB: Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol.Cell Biol.* 1991; 11: 2189-2199.

333. Mastrangelo IA, Courey AJ, Wall JS, Jackson SP, Hough PV: DNA looping and Sp1 multimer links: a mechanism for transcriptional synergism and enhancement. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1991; 88: 5670-5674.
334. Smith CL, Hager GL: Transcriptional regulation of mammalian genes in vivo. A tale of two templates. *J Biol.Chem* 1997; 272: 27493-27496.
335. Hildebrandt H, Becker C, Glüer S, Rosner H, Gerardy-Schahn R, Rahmann H: Polysialic acid on the neural cell adhesion molecule correlates with expression of polysialyltransferases and promotes neuroblastoma cell growth. *Cancer Res.* 1998; 58: 779-784.
336. Cervello M, D'Amelio L, Tesoro V, Rougon G, Matranga V: Expression of PSA-N-CAM in human neuroblastoma cells induced to neuronal differentiation by retinoic acid. *Eur.J.Cell Biol.* 1997; 73: 270-275.
337. Kurosawa N, Yoshida Y, Kojima N, Tsuji S: Polysialic acid synthase (ST8Sia II/STX) mRNA expression in the developing mouse central nervous system. *J.Neurochem.* 1997; 69: 494-503.
338. Kitagawa H, Paulson JC: Differential expression of five sialyltransferase genes in human tissues. *J.Biol.Chem.* 1994; 269: 17872-17878.
339. Calaora V, Chazal G, Nielsen PJ, Rougon G, Moreau H: mCD24 expression in the developing mouse brain and in zones of secondary neurogenesis in the adult. *Neuroscience* 1996; 73: 581-594.
340. Doetsch F, Alvarez-Buylla A: Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1996; 93: 14895-14900.
341. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A: Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J.Neurosci.* 1997; 17: 5046-5061.
342. Glüer S, Wunder MA, Schelp C, Radtke E, Gerardy-Schahn R: Polysialylated neural cell adhesion molecule serum levels in normal children. *Pediatr.Res* 1998; 44: 915-919.
343. Glüer S, Zense M, Radtke E, von Schweinitz D: Polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood ganglioneuroma and neuroblastoma of different histological grade and clinical stage. *Langenbecks.Arch.Surg.* 1998; 383: 340-344.
344. Van Riet I, De Waele M, Remels L, Lacor P, Schots R, Van Camp B: Expression of cytoadhesion molecules (CD56, CD54, CD18 and CD29) by myeloma plasma cells. *Br.J Haematol.* 1991; 79: 421-427.
345. Saxen L, Sariola H: Early organogenesis of the kidney. *Pediatr.Nephrol.* 1987; 1: 385-392.
346. Nouwen EJ, Dauwe S, van der Biest I, De Broe ME: Stage- and segment-specific expression of cell-adhesion molecules N-CAM, A-CAM, and L-CAM in the kidney. *Kidney Int.* 1993; 44: 147-158.
347. von Schweinitz D, Leuschner I, Glüer S, Pietsch T: Expression of cell adhesion molecules and common acute lymphoblastic leukaemia antigen in hepatoblastoma. *Virchows Arch.* 1996; 429: 239-241.
348. Chen TR, Dorotinsky C, Macy M, Hay R: Cell identity resolved. *Nature* 1989; 340: 106
349. McAllister RM, Melnyk J, Finkelstein JZ, Adams ECJ, Gardner MB: Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer* 1969; 24: 520-526.
350. McAllister RM, Isaacs H, Rongey R, et al: Establishment of a human medulloblastoma cell line. *Int.J Cancer* 1977; 20: 206-212.
351. Koeffler HP: Induction of differentiation of human acute myelogenous leukemia cells: therapeutic implications. *Blood* 1983; 62: 709-721.
352. Bepler G, Bading H, Heimann B, Kiefer P, Havemann K, Moelling K: Expression of p64c-myc and neuroendocrine properties define three subclasses of small cell lung cancer. *Oncogene* 1989; 4: 45-50.
353. Tumulowicz JJ, Nichols WW, Cholon JJ, Greene AE: Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer Res* 1970; 30: 2110-2118.
354. Ross RA, Spengler BA, Biedler JL: Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl.Cancer Inst.* 1983; 71: 741-747.
355. Orkin SH, Goldman DS, Sallan SE: Development of homozygosity for chromosome 11p markers in Wilms' tumour. *Nature* 1984; 309: 172-174.
356. Yee C, Krishnan-Hewlett I, Baker CC, Schlegel R, Howley PM: Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am.J Pathol.* 1985; 119: 361-366.
357. Gerardy-Schahn R, Eckhardt M: Hot spots of antigenicity in the neural cell adhesion molecule NCAM. *Int.J.Cancer Suppl.* 1994; 8:38-42: 38-42.
358. Schol DJ, Mooi WJ, van der Gugten AA, Wagenaar SS, Hilgers J: Monoclonal antibody 123C3, identifying small cell carcinoma phenotype in lung tumours, recognizes mainly, but not exclusively, endocrine and neuron-supporting normal tissues. *Int.J Cancer Suppl.* 1988; 2:34-40: 34-40.
359. Frosch M, Gorgen I, Boulnois GJ, Timmis KN, Bitter-Suermann D: NZB mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens: isolation of an IgG antibody to the polysaccharide capsules of *Escherichia coli* K1 and group B meningococci. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1985; 82: 1194-1198.
360. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, et al: Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1987; 84: 7413-7417.
361. Freshney RI: *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique.* Wiley-Liss, 1992.

362. Cordell JL, Falini B, Erber WN, et al: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem.Cytochem.* 1984; 32: 219-229.
363. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
364. Kyhse-Andersen J: Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 1984; 10: 203-209.
365. Doring K: Ultrasensitive chemiluminescent and colorigenic detection of DNA, RNA, and proteins in plant molecular biology. *Anal.Biochem* 1991; 196: 433-438.
366. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
367. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al: *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley Interscience, 1991.
368. Wallace DM: Large- and small-scale phenol extractions. *Methods Enzymol.* 1987; 152:33-41: 33-41.
369. Wallace DM: Precipitation of nucleic acids. *Methods Enzymol.* 1987; 152:41-8: 41-48.
370. Vogelstein B, Gillespie D: Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1979; 76: 615-619.
371. Berger SL: Quantifying 32P-labeled and unlabeled nucleic acids. *Methods Enzymol.* 1987; 152:49-54: 49-54.
372. Brady G, Timmis KM: Ligation of cohesive and flush ended DNA fragments. In: *Adv.Mol.Gen.* Pühler A, ed. New York: Springer, 1993.
373. Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW: High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic.Acids.Res* 1988; 16: 6127-6145.
374. Birnboim HC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic.Acids.Res* 1979; 7: 1513-1523.
375. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
376. Gubler U, Hoffman BJ: A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 1983; 25: 263-269.
377. Calzone FJ, Britten RJ, Davidson EH: Mapping of gene transcripts by nuclease protection assays and cDNA primer extension. *Methods Enzymol.* 1987; 152:611-32: 611-632.
378. Boorstein WR, Craig EA: Primer extension analysis of RNA. *Methods Enzymol.* 1989; 180:347-69: 347-369.
379. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979; 18: 5294-5299.
380. Chomczynski P, Mackey K: One-hour downward capillary blotting of RNA at neutral pH. *Anal.Biochem* 1994; 221: 303-305.
381. Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol.Biol.* 1975; 98: 503-517.
382. Moller EM, Schilling AG, Karlousky P: Stripping of hybridization membranes. *Biotechniques* 1994; 17: 682, 684.
383. van Miltenburg R, Rüger B, Grünwald-Janho S, Leons M, Schröder C: *The DIG System User's Guide for Filter Hybridization*. 1995.
384. Springer JE, Robbins E, Meyer S, Baldino FJ, Lewis ME: Localization of nerve growth factor receptor mRNA in the rat basal forebrain with in situ hybridization histochemistry. *Cell Mol.Neurobiol.* 1990; 10: 33-39.
385. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 1977; 24:104-8: 104-108.

## 7 ANHANG

### 7.1 Lebenslauf

Geboren am 2. November 1967 in Lüneburg

Schulbildung:

1974 - 78	Grundschule In den Sieben Stücken
1978 - 80	Orientierungsstufe Rehmer Feld
1980 - 87	Gymnasium Misburg
Mai 1987	Abitur

Studium:

1987 - 1989	Studium der Biologie an der Universität Braunschweig
1989 - 1995	Studium der Biologie an der Universität Hannover
Februar 1994	Hauptdiplomprüfungen
Oktober 1994 – Juli 1995	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Hochschule Hannover
Seit Juli 1995	Promotion als Stipendiat des Graduiertenkollegs "Molekulare Patho- physiologie des Zellwachstums" innerhalb der Arbeitsgruppe von Frau Priv.-Doz. Dr. Rita Gerardy-Schahn am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Hochschule Hannover

## 7.2 Publikationen

### 7.2.1 Artikel

Polysialic Acid On The Neural Cell Adhesion Molecule Correlates With Expression Of Polysialyltransferases And Promotes Neuroblastoma Cell Growth.

Herbert Hildebrandt, Christoph Becker, Sylvia Glüer, Harald Rösner, Rita Gerardy-Schahn, and Hinrich Rahmann. *Cancer Research* 58, 779 - 784, February 1998

Heterogeneous Expression Of The Polysialyltransferases ST8Sia II And ST8Sia IV During Postnatal Rat Brain Development.

Herbert Hildebrandt, Christoph Becker, Marianne Müräu, Rita Gerardy-Schahn, and Hinrich Rahmann. *Journal of Neurochemistry*, 71(6), 2339 - 2348, December 1998

### 7.2.2 Abstracts

Polysialic Acid And Polysialyltransferases In Neuroblastoma.

Herbert Hildebrandt, Christoph Becker, Rita Gerardy-Schahn, Sylvia Glüer, Harald Rösner, and Hinrich Rahmann. GLYCO XIV, International Symposium on Glycoconjugates, September 7-12<sup>th</sup> 1997, Zurich, Switzerland.

Polysialyltransferases And Polysialic Acid In Tumor Cell Lines And Primary Neuroendocrine Tumors.

Christoph Becker, Herbert Hildebrandt, Sylvia Glüer, Matthias Eckhardt, and Rita Gerardy-Schahn. 9th Joint Meeting of the Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van Glycoconjugaten, the Studiengruppe Glykokonjugate der Gesellschaft für Biologische Chemie, and the Groupe Lillois de Glycobiologie, November 24-25<sup>th</sup> 1997, Lille, France.

Expression Of Polysialyltransferase mRNAs And Polysialic Acid In Human Tumor Cell Lines.

Ralph Seidenfaden, Christoph Becker, Rita Gerardy-Schahn, Hinrich Rahmann and Herbert Hildebrandt. 10th Joint Meeting of the Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van Glycoconjugaten, the Studiengruppe Glykokonjugate der Gesellschaft für Biologische Chemie, and the Groupe Lillois de Glycobiologie, November 2-3<sup>th</sup> 1998, Nuland, The Netherlands.

## Danksagung

Selbstverständlich ist eine Doktorarbeit ohne Danksagung wie ein Forscher ohne Erstautorenschaft. Deshalb danke ich im Folgenden von Herzen:

Herrn Prof. Dr. D. Bitter-Suermann für die gewährte Unterstützung und das Bereitstellen des Arbeitsplatzes.

Herrn PD Dr. W. Müller für die Übernahme des Referates und seine souveräne Begleitung durch das Promotionsverfahren.

Frau PD Dr. Rita Gerardy-Schahn für die Betreuung dieser Arbeit, ihre Fähigkeit sich auf schwierige Charaktere einzustellen, ihren unermüdlichen Einsatz beim Korrekturlesen, ihre Meinung, daß man auch Kongresse in Australien besuchen sollte, ihre Großzügigkeit, insbesondere bei Weihnachtsessen und natürlich für die Übernahme des Korreferates.

Der Besatzung des Labors 2500, daß trotz seiner ständig wechselnden Mannschaftsstärke immer in der Lage ist, neue Welten zu erforschen und sich in dem nur 40 m<sup>2</sup> großen Raumschiff meistens sogar zivilisiert verhält. Insbesondere bedanke ich mich für: Methodische Tricks und Tips, Kaffeepausen, Frühbesprechungen, Diskussions- und Hilfsbereitschaft, Mensabesuche, Toleranz und vieles mehr bei: Matthias Eckhardt, Martina Mühlenhoff, Andrea Bethe, Anja Münster, Olaf Eberhardt, Simone Schöne, Arnd Manegold, Patricia Fricke, Torsten Moltzen, Kerstin Potthast, Michaela Windfuhr, Stephan Oelmann, Birgit Gotza, Astrid Müller, Kathrin Oelgeschläger, Lihua Wang und Ulrich Siegers, dessen Betreuung mir eine ganz besondere Ehre und Herausforderung war und der mir in der Endphase dieser Arbeit durch sein fotografisches Talent sehr geholfen hat, sowie bei Uwe und Max für die Instandhaltung der Computerausrüstung.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre, insbesondere Ulrich Martin, Daniel Bock, Axel Kola, Melanie Grove, Birgit Brennecke, Susanne Häußler, Claudia Rheinheimer, die immer noch kein Exemplar meiner Diplomarbeit hat, Britta Settmacher und Bettina Sohns für ihre Hilfe bei der Etablierung des SEAP-Systems sowie natürlich allen fußballerischen Lauf-Puffern und allen Tischtennispielern.

Den Partnern aus der Kinderchirurgie: Dr. Sylvia Glüer, Birgit Teichmann, Michael Zense und Elgin Radtke.

Meinen Kooperationspartnern aus Stuttgart, Dr. Herbert Hildebrandt und Ralph Seidenfaden, auch für ihre niemals ermüdende Diskussionsbereitschaft.

Meinen gastwissenschaftlichen Freunden Guiseppo "Joe" Tiralongo und Jukka "Die Palme" Häyrynen.

Annette Busmann, Andrea Jocheim und Gaby Heine vom Institut für Peptidforschung

Carsten Schiller, Frank Heusohn, Iska Janßen-Graalfs, Ingo Bastisch und Fabian aus der Klinischen Immunologie

Karl-Friedrich Riedel vom Chemikalienzentrum für seine Bestellungen in Überlichtgeschwindigkeit

Allen ehemaligen, gegenwärtigen und womöglich zukünftigen Graduierten und Assoziierten des PKs für "Molekulare Pathophysiologie des Zellwachstums". Weiterhin meinen Kobetreuern Michael Martin und Heiner Wolfes sowie Sabine Barlach-Bölle.

Frau Schumacher vom Dekanat des Fachbereichs Chemie für die Verlängerung der Abgabefrist und ihre Bemühungen während des Promotionsverfahrens.

Meinen Eltern Eberhardt und Hiltrud und meinen Geschwistern Susanne, Immo und Oda, sowie meinen Neffen Tarik und Dennis für die Anteilnahme und Unterstützung während dieser Arbeit.

Meinen langjährigen Freunden Heiko Buse, Christopher Klose, Carsten Schiller, Florian Balnuß, Ralf Hansen, Heike Gernns und Dr. rer. nat. Annette Busmann.

Der 2. Mannschaft des SC Elite

Jochen Schulz sowie Claudia Neubarth von der Firma **I!de Druck & Werbung**, die ich für Layout und Vervielfältigung von Prüfungsarbeiten dringend weiterempfehlen kann.

Ein ganz besonders dickes Dankeschön geht an Antje Reganzerowski.

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, Christoph Becker, an Eides statt, daß ich nicht bereits früher oder gleichzeitig ein Promotionsverfahren bei einer anderen Hochschule oder einem anderen Fachbereich beantragt habe.

Weiterhin versichere ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Außerdem erkläre ich an Eides statt, daß die der vorliegenden Dissertation zugrundeliegenden Ergebnisse nicht für eine Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden sind.

Hannover, den 16. Dezember 1999

.....  
(Christoph Becker)