



**Fakultät für Medizin
Fachgebiet molekulare Tumorbioogie**

**Zielgerichtete Therapie gastrointestinaler Karzinome: Regulation
und Bedeutung des Rezeptors Gb3/CD77**

Markus Perl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades **eines Doktors der Medizinischen Wissenschaft** genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Ruland

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Klaus-Peter Janßen
2. Prof. Dr. Gabriele Multhoff
3. Prof. Dr. Dieter Saur

Die Dissertation wurde am 11.05.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 30.12.2020 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGEN	4
2	EINLEITUNG	7
2.1	SHIGA-TOXIN ALS PATHOGENES PROTEIN UND VIELVERSPRECHENDES NEUARTIGES THERAPEUTIKUM	7
2.1.1	<i>Pathophysiologische Bedeutung von Shiga-Toxinen</i>	7
2.1.2	<i>Intrazelluläre Aufnahme von Shiga-Toxinen: Der retrograde Weg</i>	9
2.1.3	<i>Shiga-Toxine und ihre Untereinheit B als vielversprechende biomedizinische Applikation in der Krebsforschung</i>	11
2.2	GB ₃ - ZELLULÄRER REZEPTOR FÜR BAKTERIELLES SHIGA- TOXIN MIT UNGEKLÄRTER PHYSIOLOGISCHER BEDEUTUNG	16
2.2.1	<i>Die Gb₃-Biosynthese: Erstes Glykosphingolipid der Globoserie</i>	16
2.2.2	<i>Lokalisation von Gb₃ in zellulären Membranen: Die „lipid rafts“</i>	17
2.2.3	<i>Detektion von Gb₃</i>	18
2.2.4	<i>Mit Gb₃ assoziierte Pathologien</i>	21
2.2.5	<i>Ausprägung von Gb₃ in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen</i>	22
2.2.6	<i>Gb₃ in verschiedenen Tumorentitäten und seine pathophysiologische Rolle im Tumorkontext</i>	23
2.2.7	<i>Regulation der Biosynthese von Gb₃</i>	27
3	ZIELSETZUNG	29
4	MATERIAL	30
4.1	CHEMIKALIEN	30
4.2	KITS UND FERTIGLÖSUNGEN.....	32
4.3	ANTIKÖRPER UND FÄRBESUBSTANZEN	32
4.4	GERÄTE	32
4.5	SOFTWARE.....	33
4.6	ZELLEN	34
4.7	VERBRAUCHSMATERIALIEN UND EINMALARTIKEL	34
5	METHODEN	36
5.1	PROTOKOLLE	36
5.2	PATIENTENKOLLEKTIV UND PATIENTENGEWEBE	70
5.2.1	<i>Probensammlung, Aufbewahrung und Klassifizierung</i>	70
5.2.2	<i>Patientendaten</i>	72

5.3	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	72
6	ERGEBNISSE	73
6.1	TEIL I: REGULATION DER GB ₃ BIOSYNTHESE	73
6.1.1	<i>Etablierung des StxB-Cy3 Membranfärbeprotokolls (nach Geyer et al., 2016).....</i>	73
6.1.2	<i>Gb₃ Biosynthese korreliert mit der A4GALT Ausprägung in Zelllinien sowie in Gewebeproben humaner gastrointestinaler Karzinome</i>	76
6.1.3	<i>Die A4GALT Expression und damit die Gb₃ Biosynthese wird durch epigenetische Mechanismen stillgelegt</i>	80
6.1.4	<i>Generierung eines genetischen A4GALT-Defizienzmodells mittels CRISPR/Cas9</i>	86
6.2	TEIL II: BEDEUTUNG VON GB ₃ FÜR ENTSTEHUNG UND PROGRESSION GASTROINTESTINALER KARZINOME	90
6.2.1	<i>Migration und Invasion der Krebszellen.....</i>	90
6.2.2	<i>Proliferation, klonogenes Überleben und Chemotherapieansprechen.....</i>	91
6.2.3	<i>Auswirkungen des Gb₃-Gehalts auf die Oberflächenexposition der publizierten Interaktionspartner Hsp70 und P-gp.....</i>	93
6.2.4	<i>A4GALT-Defizienz und Glykosphingolipidsynthese.....</i>	97
6.3	TEIL III: ZIELGERICHTETE THERAPIE VON GASTROINTESTINALEN TUMOREN MITTELS SHIGA-TOXINEN: IN VITRO VERSUCHE	100
6.3.1	<i>Aufnahme von Shiga-Toxin und Ausprägung von Gb₃ in Zelllinien, Gewebeschnitten und Primärkulturen gastrointestinaler Tumoren</i>	100
6.3.2	<i>Behandlung mit Monomethylauristatin E gekoppeltem StxB und bakteriellen Holotoxinen Stx1 und Stx2.....</i>	104
7	DISKUSSION	107
7.1	REGULATION DER GB ₃ -BIOSYNTHESE IN TUMORZELLEN	108
7.2	GB ₃ IN DER TUMORBIOLOGIE	113
7.3	GB ₃ ALS ZIELSTRUKTUR BIOMEDIZINISCHER ANWENDUNGEN	118
7.4	ZUKUNFT UND AUSBLICK FÜR DIE SHIGA-TOXIN-BASIERTE TUMORTHERAPIE UND -DIAGNOSTIK	120
7.5	MEMBRANLIPIDE MALIGNER TUMOREN – EIN VIELVERSPRECHENDES FORSCHUNGSFELD.....	122
8	ZUSAMMENFASSUNG	124
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	125
10	TABELLEN UND ABBILDUNGEN.....	135
10.1	TABELLEN	135
10.2	ABBILDUNGEN.....	137
11	PUBLIKATIONEN	139

12 DANKSAGUNG	140
ANHANG	142

1 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
5-Aza	5-Aza-2'-desoxycytidin
5-FU	5-Fluorouracil
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
95%-KI	95%-Konfidenzintervall
A4GALT	α -1,4-Galaktosyltransferase
ABC-Transporter	ATP binding cassette (ATP-Bindekassetten-) Transporter
APC	Adenomatous polyposis coli (Gen)
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Becton Dickinson
BL	Burkitt-Lymphom
BSA	bovines Serumalbumin
Cas9	CRISPR associated protein 9
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Ctx	Cholera-Toxin
Cy3	Cyanin3
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DHL	Diffus-Histozytäres-Lymphom
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
DNMT1	DNA-Methytransferase 1
DPDL	diffuse, poorly differentiated lymphoma (diffus schlechtdifferenziertes Lymphom)
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule (epitheliales Zelladhäsionsmolekül)
ER	endoplasmatisches Retikulum

FACS	fluorescence-activated cell sorting (fluoreszenzaktiviertes Zellsortieren): Handelsmarke Beckton Dickinson
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
Gal	Galaktosyl
Gb ₃	Globotriaosylceramid
Gb ₄	Globosid/Globotetraosylceramid
GCS	Glucosylceramidsynthase
GD ₁	Gangliosid GD- ₁
GlcCer	Glucosylceramid
GM ₁	Monosialotetrahexosylgangliosid
GM ₃	Monosialodihexosylgangliosid
gRNA	guide RNA
GSL	Glykosphingolipid
HDAC	Histondeacetylase
hEGF	human Epidermal Growth Factor (humaner epidermaler Wachstumsfaktor)
HIV-1	Humanes Immundefizienz-Virus 1
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
Hsp70	Hitzeschockprotein 70
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
i.v.	intravenös
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IL-1	Interleukin 1
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kDa	Kilodalton
LacCer	Laktosylceramid
LacCerS	Laktosylceramidsynthase
LT	Hitzelabiles Enterotoxin
M	Mol/Liter
MAF	minor allele frequency
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MMAE	Monomethylauristatin E
MMAF	Monomethylauristatin F
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
MWCO	molecular weight cut-off (Molekularmasse, bei der 90% einer Substanz innerhalb von Membrangrenzen gehalten werden können)
MβCD	Methyl-beta-Cyclodextrin
Neu5Gc	N-Glycolylneuraminsäure
NeuAB	Subtilase-Zytotoxin

NGS	Next Generation Sequencing
P-gp	P-Glykoprotein
PAM	protospacer adjacent motifs
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDAC	pankreatisch duktales Adenokarzinom
PE	Phycoerythrin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
Ptx	Pertussis-Toxin
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SMase	Sphingomyelinase
SN38	7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin
SNP	single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SSC	Side Scatter
Stx	Shiga-Toxin
Stx1(a)	Shiga-Toxin 1(a)
Stx2(a)	Shiga-Toxin 2(b)
StxB	Shiga-Toxin B-Untereinheit
StxB-Cy3	Cy3-gekoppelte Shiga-Toxin B-Untereinheit
StxB-MMAE	MMAE-gekoppelte Shiga-Toxin B-Untereinheit
StxB-SN38	SN38-gekoppelte Shiga-Toxin B-Untereinheit
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TLC	Dünnschichtchromatographie
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TNM	Tumor Nodus Metastasen (Klassifikationssystem für solide Tumoren)
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
UPL	UniversalProbeLibrary (Roche)
VPA	Valproat
VT1/2	Vero-Toxin
VT1b	Vero-Toxin B-Untereinheit
vWF	von-Willebrand-Faktor
wt	wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfo-phenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid
ZNS	zentrales Nervensystem

2 Einleitung

2.1 Shiga-Toxin als pathogenes Protein und vielversprechendes neuartiges Therapeutikum

2.1.1 Pathophysiologische Bedeutung von Shiga-Toxinen

Durch einen EHEC-Ausbruch (als EHEC bezeichnet man enterohämorrhagische *E. coli*-Stämme, die bakterielle Shiga-Toxine produzieren) im Mai 2011 bekam das bakterielle Shiga-Toxin und die von ihm mit ausgelösten, in ihrer Maximalform als hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) bezeichneten Erkrankungsfälle, eine breite öffentliche Aufmerksamkeit in Deutschland. Insgesamt erkrankten 2987 Personen an hämorrhagischen Gastroenteritiden und 855 Personen an HUS, von denen insgesamt 50 Personen verstarben. Als Erreger wurde der EHEC-Stamm O104:H4 identifiziert, der das Toxin Stx2a (syn. VT2a) produzierte. (Robert Koch Institut, 2011)

Shiga-Toxine sind bakterielle Proteine, benannt nach dem japanischen Forscher Kyoshi Shiga (Trofa et al., 1999); sie besitzen eine monomere, toxische A-Untereinheit sowie eine homopentamere, nicht pathogene B-Untereinheit zur Bindung an die Zielzelle. Shiga-Toxin als Komplex (monomere A Untereinheit und pentamere B Untereinheit) wird auch als (Shiga-Toxin-)Holotoxin oder AB₅-Toxin bezeichnet und findet sich in dieser Form etwa auch im Cholera-Toxin (Ctx) sowie dem Pertussis-Toxin (Ptx). Den Toxinen ebenso gemeinsam ist ihre Bindung an zelluläre Glykane sowie an Glykosphingolipide über ihre B-Untereinheiten. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über verschiedene AB₅-Toxine sowie deren Bindungspartner. (Beddoe et al., 2010; Hausman & Burns, 1993)

Tabelle 1: AB₅-Toxine und ihre zellulären Glykanrezeptoren (nach Beddoe et al., 2010 und Hausman & Bruns, 1993)

Toxin	Rezeptor
Shiga-Toxin (Stx)	Gb ₃ (und andere GSL der Globo-Serie)
Cholera-Toxin (Ctx)	GM ₁
Hitzelabiles Enterotoxin (LT)	GM ₁ (LT-I) sowie GD1-a und GD1-b (LT-II)
Pertussis-Toxin (Ptx)	verschiedene/unbekannt (Kohlenhydratgerüst mit terminaler Sialinsäure wie z.B. von GD-1a)
Subtilase-Zytotoxin (NeuAB)	N-Glycolylneuraminsäure-(Neu5Gc-)Reste

Die A-Untereinheit des Shiga-Toxins kann proteolytisch in eine A1- sowie eine A2-Einheit gespalten werden. A2 vermittelt hierbei die Bindung an die homopentameren B-Untereinheit. A1 trägt die enzymatische Aktivität, somit die eigentliche Zytoxizität mittels seiner N-Glykosidase-Aktivität, die spezifisch ein Adenin in der Nähe des 3'Endes der 28S rRNA absplattet und damit ribotoxischen Stress bewirkt und die Proteintranslation hemmt. (Fraser et al., 1994; Saxena et al., 1989; Tesh, 2010)

Trotz der gemeinsamen Wirkweise existieren mehrere verschiedene Varianten des Shiga-Toxins, die unterschiedliche Rezeptoraffinität sowie Toxizität besitzen und mit unterschiedlichen Krankheiten assoziiert sind. Dabei entspricht Stx1a, das von enterohämorrhagischen *E. coli*-Bakterien produziert wird, weitestgehend dem Shiga-Toxin aus *Shigella dysenteriae*, worin es ursprünglich entdeckt wurde. (Trofa et al., 1999) Während Stx1a bedeutend höhere Zytoxizität auf Vero-Zellen *in vitro* ausübt, ist Stx2a mit klinisch schwereren Verläufen sowie ZNS-Schädigungen assoziiert (Basu & Tumer, 2015; Tesh, 2010). Das erst später entdeckte Stx2e hingegen besitzt höhere Affinität zu Gb₄ im Vergleich zu anderen Shiga-Toxin-Varianten (Johannes & Römer, 2010). Tabelle 2 zeigt verschiedene Shiga-Toxin Varianten, den bevorzugten Rezeptor, Sequenzhomologie zu Stx aus *Shigella dysenteriae* sowie Besonderheiten bezüglich assoziierter Pathologien.

Tabelle 2: Shiga-Toxin-Varianten und ihre Unterschiede modifiziert nach Johannes und Römer (Johannes & Römer, 2010)

Variante	Rezeptor	Sequenzhomologie A-Untereinheit	Sequenzhomologie B-Untereinheit	Assoziierte Er- krankungen
Stx	Gb ₃	100%	100%	Bakterienruhr mit toxischem Krankheitsbild (Robert Koch Institut, 2015b)
Stx1a	Gb ₃	97%	98%	
Stx2a	Gb ₃	53%	64%	Schweres HUS, ZNS-Schädigung
Stx2c	Gb ₃	53%	61%	Schwere Krankheitsverläufe (wie HUS)(Robert Koch Institut, 2015a)
Stx2e	Gb ₄	53%	61%	Erkrankungen von Schweinen

2.1.2 Intrazelluläre Aufnahme von Shiga-Toxinen: Der retrograde Weg

Shiga-Toxine beschreiten einen ungewöhnlichen intrazellulären Aufnahmeweg: nach Bindung an den zellulären Rezeptor Gb₃ (Globotriaosylceramid) auf der Zelloberfläche formieren sich Membraneinstülpungen, die schließlich zur Abschnürung von Endosomen führen. Dieser Prozess kann clathrinabhängig oder -unabhängig ablaufen. (Römer et al., 2007; Sandvig et al., 1989; Sandvig & van Deurs, 1996) Nach dem Abschnüren der Endosomen erfolgt die Aufnahme von Shiga-Toxin je nach Zelltyp entweder entlang des „konventionellen“, endolysosomalen Aufnahmeweges oder entlang des retrograden Aufnahmeweges. Im Rahmen des retrograden Aufnahmeweges erreicht das Shiga-Toxin das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und über den Golgiapparat letztlich das endoplasmatische Retikulum (ER) sowie die damit verbundene Kernmembran. (Sandvig et al., 1992)

Auf dem Weg zum ER wird die A-Untereinheit mittels der Endoprotease Furin in die oben bereits aufgeführten Fragmente A1 und A2 gespalten, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden bleiben (Garred et al., 1995). Im ER angekommen wird diese durch Reduktion gelöst und enzymatisch aktives A1 kann ins Zytosol verbracht werden (Johannes & Römer, 2010).

Shiga-Toxine können auch den „konventionellen“ Aufnahmeweg beschreiten, der vorwiegend für innate Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen beschrieben wurde, die Gb₃ außerhalb von sog. „lipid rafts“ besitzen. Nach der Aufnahme in Endosomen erfolgt eine Ansäuerung des Vesikelinhalts und schließlich das Verschmelzen mit lysosomalen Kompartimenten, in denen proteindegradierende Bedingungen sowie niedriger pH vorherrschen. (Falguieres et al., 2001)

Die Bindungskinetik von StxB an Gb₃ ist komplex: das pentamere StxB kann bis zu 15 Moleküle Gb₃ binden. Die hochaffinen Bindungsstellen I und II eines jeden StxB-Monomers führen zunächst zur Ausbildung von lokaler Anhäufung der B-Untereinheit, während Bindungsstelle III daraufhin weitere Gb₃-Moleküle rekrutiert und die Membran so unter Ausbildung neuer Domänen mit hoher Lipiddichte und größerer Dicke reorganisiert. Dieser Prozess erzeugt so hohe Membranspannung, dass es je nach Beschaffenheit derselben zur Ausbildung von kleinen „Knöspchen“ oder größeren Membraninvaginationen kommt, die letztlich die Aufnahme von StxB mit ermöglichen. (Römer et al., 2007; Sandvig et al., 2010; Windschiegl et al., 2009) Abbildung 1 zeigt schematisch den retrograden und endolysosomalen Aufnahmeweg von Shiga-Toxin.

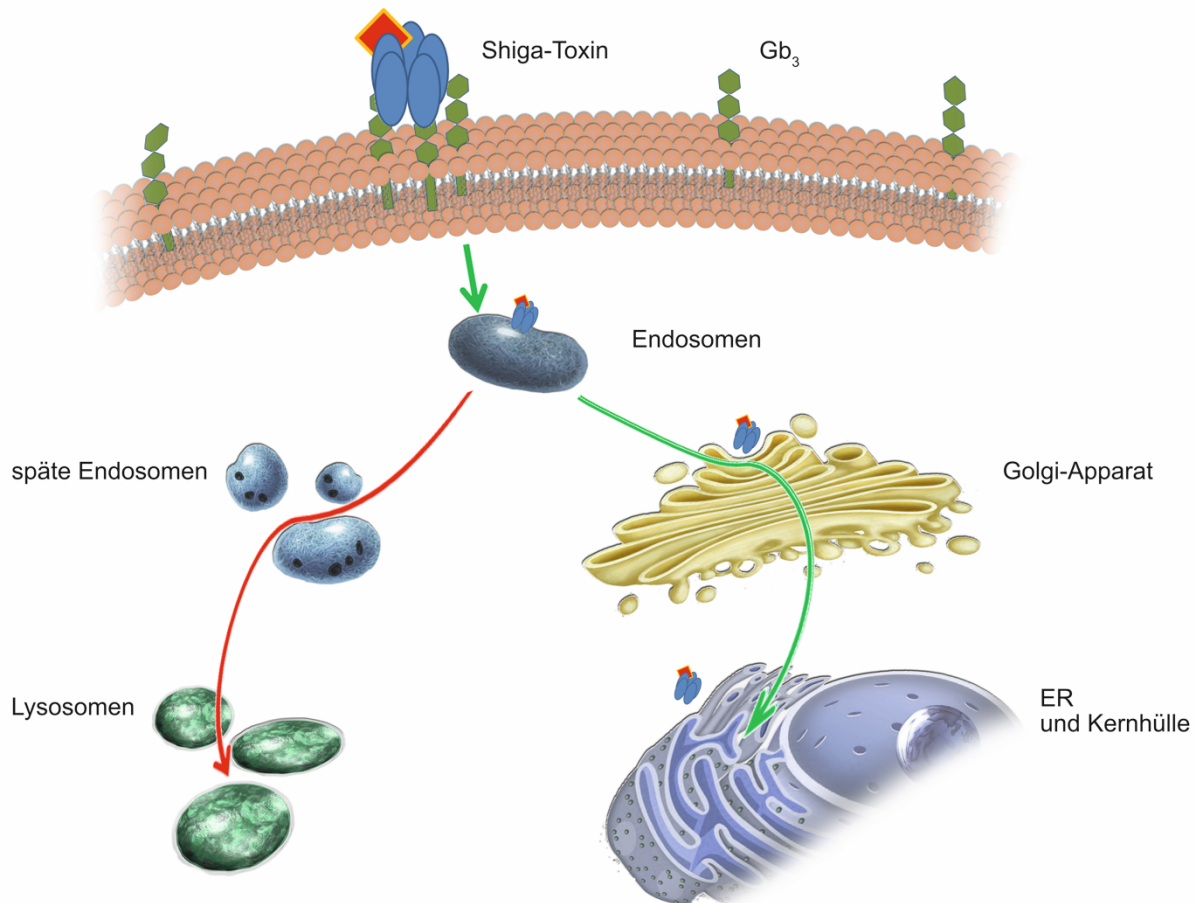


Abbildung 1: Retrograder und endolysosomaler Aufnahmeweg von Shiga-Toxin (Abbildung erstellt von Herrn PD Dr. Matthias Maak)
 Shiga-Toxin wird entlang des retrograden (grüner Pfeil) oder des endolysosomalen (roter Pfeil) Aufnahmeweges in die Zelle internalisiert. Abbildung erstellt von Herrn PD Dr. Matthias Maak und freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Shiga-Toxine und ihre Untereinheit B als vielversprechende biomedizinische Applikation in der Krebsforschung

Neben ihrer pathophysiologischen Bedeutung wurde der Einsatz von auf Shiga-Toxinen, sowie ihrer nicht-toxischen Untereinheit B basierenden Diagnostik- und Therapieansätze im Tumorkontext beschrieben. Laboreigene Untersuchungen, sowie publizierte Befunde anderer Arbeitsgruppen evaluierten erfolgreich verschiedene Ansätze *in vitro* und *in vivo* in vorklinischen Tiermodellen. Dabei wurden unterschiedliche Anwendungsszenarien beschrieben, die im Wesentlichen auf zwei Mechanismen beruhen: der Ausnutzung der spezifischen Bindung zwischen StxB und Gb₃ durch direkte Kopplung von Chemotherapeutika an STxB für therapeutische Zwecke, oder Markierung des STxB mit Fluorophoren oder radiaktiven Isotopen zur

diagnostischen Bildgebung einerseits, bzw. der Verwendung des Holotoxins mit seiner hohen Zytotoxizität als direktes Therapeutikum andererseits.

Die Kopplung von Chemotherapeutika an die B Untereinheit bietet gegenüber der Verwendung des Holotoxins den Vorteil, dass neben der Rezeptorspezifität von StxB eine zusätzliche Spezifität auf sich schnell teilende Zellen (Tumorzellen sowie potentiell auch tumorassoziierte Blutgefäße) ausgeübt werden kann und somit Gb₃-haltige Zelltypen und Gewebe, wie Nierentubuli und Endothelien in Gehirn und Niere mit vorwiegend postmitotischen Eigenschaften vor Schädigung geschützt sind. Zudem kann bei hydrophoben oder hochgradig toxischen Stoffen durch die Kopplung an StxB eine höhere Plasmalöslichkeit sowie eine geringere Belastung des Organismus erzielt werden.

Im Bereich gastrointestinaler Karzinome wurde an StxB gekoppeltes SN38 (StxB-SN38), dem aktiven Metaboliten des Topoisomerase I-Inhibitors Irinotecan, im *in vitro*-Modell getestet. Irinotecan findet im Rahmen verschiedener Therapieschemata zur Behandlung von Colon-, Magen- und Pankreaskarzinomen (pankreatisch duktales Adenokarzinom, PDAC) Anwendung. (Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2013, 2014; Moehler et al., 2011) SN38 besitzt starke antineoplastische Aktivität, als ungekoppelte Substanz betreffen es allerdings mit hochgradiger Hydrophobizität und Toxizität beide oben genannte Limitierungen für einen direkten, unvektorierten Einsatz. (El Alaoui et al., 2007)

Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe evaluierten den Einsatz von StxB-SN38 in einem *in vitro*-Modell für PDAC (Maak et al., 2011). Lebende Pankreaskarzinomzellen zeigten schnelle Aufnahme von fluorophorgekoppeltem StxB entlang des retrograden Aufnahmeweges. StxB-SN38 bewirkte eine um das 100-fach erhöhte Zytotoxizität im Vergleich zu Irinotecan bei Zellen, die den StxB-Rezeptor Gb₃ auf ihrer Oberfläche trugen, während Gb₃-negative Zellen selektiv vor der Zytotoxizität geschützt waren (Maak et al., 2011). StxB-SN38 wurde auch anhand eines *in vitro* Magenkarzinommodelles von unserer Arbeitsgruppe getestet. Die Mehrzahl der getesteten etablierten humanen Magenkarzinom-Zelllinien (6 von 10) nahm fluorophorgekoppeltes StxB entlang der retrograden Route auf. Auf stark Gb₃-positive St3051-Zellen übte StxB-SN38 eine um mehr als das 100-fach erhöhte Wachstumshemmung im Vergleich zu Irinotecan aus, während Gb₃-negative AGS-Zellen keine erhöhte Zytotoxizität im Vergleich zu Irinotecan zeigten. (Geyer et al., 2016) Auch in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 wies an StxB

gekoppeltes SN38 gesteigerte Wirksamkeit gegenüber seiner ungekoppelten Vorstufe auf, die durch Inhibition der Gb₃-Synthese aufgehoben werden konnte (El Alaoui et al., 2007).

Einen aktuellen Ansatz stellt die Kopplung des im Vergleich zu SN38 potenteren Wirkstoffes Monomethylauristatin dar, als Monomethylauristatin E (MMAE) oder Monomethylauristatin F (MMAF), der die Polymerisation von Mikrotubuli hemmt: Batische et al. beschrieben starke zytotoxische Effekte auf Gb₃-positive HT-29-Zellen, die mittels Gb₃-Syntheseinhibition unterdrückt werden konnten (Batische et al., 2015).

Neben dem Einsatz von StxB zur Tumorthherapie wurde die spezifische Bindung von StxB an Gb₃-positive Zellen zur Verbringung radioaktiver Tracer an Tumoren für PET-basierte Diagnostik im Mausmodell in laboreigenen Vorarbeiten untersucht. Auf einem genetischen Apc^{1638N}-Hintergrund entstehende spontane Adenokarzinome zeigten Anreicherung von [18F]-fluoropyridingekoppeltem StxB in der Positronenemissionstomographie, wenn gekoppeltes StxB i.v. verabreicht wurde. Ebenso konnten spontan entstandene Darmtumore mittels oral appliziertem fluoreszenzgekoppeltem StxB endoskopisch *in vivo*, sowie nach Resektion *ex vivo* detektiert werden. (Janssen et al., 2006)

StxB kann darüber hinaus als Trägersubstanz zur Impfung mit gekoppelten Peptiden herangezogen werden. Mit StxB war es Vingert et al. möglich, Mäuse gegen verschiedene Antigene langanhaltend zu vakzinieren. Dies scheint durch Bindung an und Aufnahme in dendritische Zellen ermöglicht zu werden. StxB stellt somit ein attraktives Werkzeug in der Immunologie dar. (Vingert et al., 2006)

Neben der B-Untereinheit wurde auch Shiga-Holotoxin *in vitro* und *in vivo* als Tumorthapeutikum untersucht. So konnten gezeigt werden, dass Xeno-Transplantate von etablierten humanen Blasenkarzinomlinien mittels intratumoral injiziertem VT1 (entspricht Stx1a) im Wachstum gehemmt werden können, sowie das Überleben der tumortransplantierten Mäuse verlängert werden kann. (Heath-Engel & Lingwood, 2003) Des Weiteren wurde ein antineoplastischen Effekt auf Astrozytomzelllinien *in vitro* beschrieben (Arab & Lingwood, 1998). Tabelle 3 gibt einen Einblick in verschiedene biomedizinische Anwendungen von StxB, sowie dem Shiga-Holotoxin in der aktuellen Krebsforschung.

Tabelle 3: Überblick über den Einsatz Shiga-Toxin-basierter biomedizinischer Anwendungen

Verbindung	Anwendung	Modell	Referenz
StxB-SN38	Antineoplastisch	<i>in vitro</i> , Kolorektalkarzinom (human)	(El Alaoui et al., 2007)
	Antineoplastisch	<i>in vitro</i> , Magenkarzinom (human)	(Geyer et al., 2016)
	Antineoplastisch	<i>in vitro</i> , PDAC (human)	(Maak et al., 2011)
StxB-MMAE	Antineoplastisch	<i>in vitro</i> , Kolorektalkarzinom (human)	(Batisse et al., 2015)
StxB-(TPPp-O-β-GluOH)₃	Photosensitivierung	<i>in vitro</i> , Zervixkarzinom (human)	(Amessou et al., 2008)
StxB-E75	Tumorvakzinierung (Her2/neu)	<i>in vivo</i> , rekombinantes Her2/neu auf Melanomzelllinie (murin)	(Tran et al., 2016)
StxB-[18F]-Fluoropyridin	PET-Bildgebung, Tracervektor	<i>in vivo</i> , Kolorektalkarzinom (APC, murin)	(Janssen et al., 2006)
StxB-Mikrobläschen	Ultraschallbildung, Kontrastmittelvektor	<i>in vivo</i> , Mammakarzinom Xenotransplantat (human, murin)	(Couture et al., 2011)
Holotoxin (Stx1a)	Antineoplastisch	<i>in vitro</i> , Astrozytom (human)	(Arab et al., 1998)
	Antineoplastisch	<i>in vivo</i> , Blasenkarzinom Xenotransplantat (human, murin)	(Heath-Engel & Lingwood, 2003)
	Antineoplastisch	<i>in vivo</i> , Malignes Meningeom Xenotransplantat (human, murin)	(Salhia et al., 2002)

	Antineoplastisch	<i>in vivo</i> , Nierenzellkarzinom Xenotransplantat (human, murin)	(Ishitoya et al., 2004)
--	------------------	---	-------------------------

2.2 Gb₃ - zellulärer Rezeptor für bakterielles Shiga-Toxin mit ungeklärter physiologischer Bedeutung

2.2.1 Die Gb₃-Biosynthese: Erstes Glykosphingolipid der Globoserie

Gb₃ (Globotriaosylceramid; Gal α 1-4-Gal β 1-4-Glucosylceramid) ist ein neutrales Glykosphingolipid (GSL) der Globoserie und fungiert als Ausgangsstruktur aller weiteren Globoserien-GSL (Meivar-Levy & Futerman, 1999). Wie alle GSL besitzt es einen hydrophoben Teil aus Sphingosin, der über eine Amidbindung mit einer Fettsäure verbunden ist und in seiner Gesamtheit als Ceramid bezeichnet wird, sowie eine hydrophile Kopfgruppe aus O-glykosidisch gekoppelten Mono- oder Oligosacchariden. Bei neutralen GSL besteht die Kopfgruppe aus ungeladenen Zuckerresten ohne Säure-Base-Charakter (Berg et al., 2013a).

Die Glucosylceramidsynthase (*GCS*, UDP-Glucose-Ceramid-Transferase) katalysiert den ersten Schritt vom Ceramid zum Glucosylceramid (GlcCer). Im nächsten Schritt wird ein Galaktosylrest in β -1-4-Konfiguration mittels der Laktosylceramidsynthase (Beta-1-4-Galaktosyltransferase, *LacCerS*) an GlcCer angehängt und Laktosylceramid (LacCer) entsteht. LacCer ist der letzte gemeinsame Vorgänger verschiedener GSL-Subspezies wie der Globo-, Lakto-, und Ganglioserie und steht somit an einem wichtigen metabolischen Kreuzungspunkt. Die Reaktion von LacCer zu Gb₃ wird vom Enzym Gb₃-Synthase (α -1,4-Galaktosyltransferase, *A4GALT*) katalysiert. Von Gb₃ ausgehend werden alle weiteren Globoserien-GSL wie Gb₄ synthetisiert (Abbildung 2).

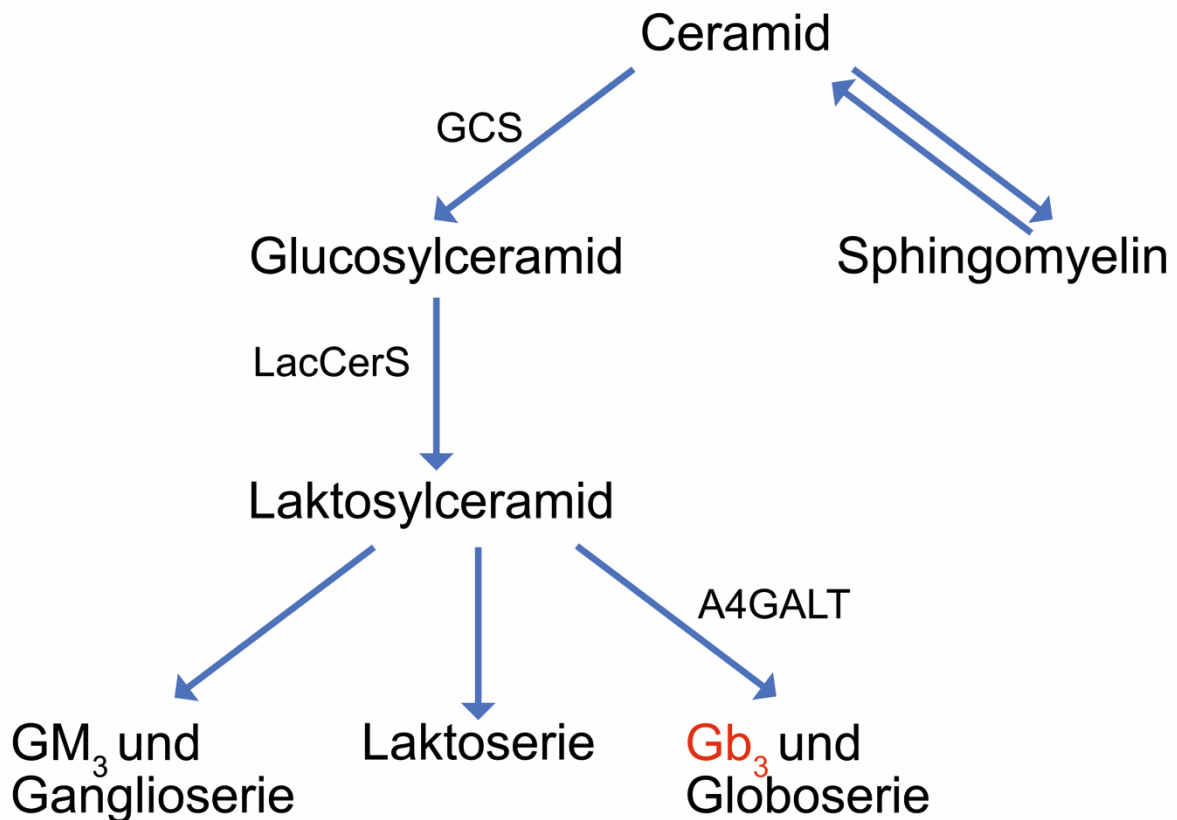


Abbildung 2: Gb₃ Biosynthese und verwandte Glykosphingolipide

Gb₃ wird ausgehend von Glucosylceramid synthetisiert und ist die Grundstruktur aller GSL der Globoserie. Die Pfeile sind mit wichtigen Enzymen der GSL-Synthese beschriftet. Abbildung modifiziert nach Meivar-Levy und Futerman. (Meivar-Levy & Futerman, 1999)

2.2.2 Lokalisation von Gb₃ in zellulären Membranen: Die „lipid rafts“

Gb₃ ist häufig an speziellen Membrandomänen, den sog. „lipid rafts“ (cholesterolreiche Mikrodomänen, Lipidflöße), an der Zelloberfläche angereichert. Bei den „rafts“ handelt es sich um funktionell hochorganisierte und die Signaltransduktion der Zelle beeinflussende Regionen, die das gegenwärtigen Flüssig-Mosaik-Modell als Organisationsprinzip von Zellmembranen erweitern. „Lipid rafts“ enthalten neben Phospholipiden hohe lokale Konzentrationen an Sphingolipiden wie Gb₃ und Cholesterol, weisen hochgradige Dynamik auf und interagieren mit dem Zytoskelett. Sie sind zudem beteiligt an Aufnahmeprozessen in die Zelle und können spezielle Proteine aggregieren. (Berg et al., 2013b; Head et al., 2014; D. Lingwood & Simons, 2010)

Die Lokalisation von Gb₃ bestimmt die zelluläre Route, die von Shiga-Toxin beschritten wird. So ist der retrograde Aufnahmeweg mit Gb₃ in „lipid rafts“ assoziiert, während die

konventionelle endolysosomale Aufnahme mit Gb₃ außerhalb von „rafts“ verknüpft ist. (Falguières et al., 2001)

2.2.3 Detektion von Gb₃

Detektion und Quantifizierung von Glykosphingolipiden wie Gb₃ ist im Vergleich zur Analyse von Proteinen aufwändiger und weniger standardisiert, daher sollen im Folgenden verschiedene Nachweisverfahren kurz dargestellt werden.

Gut etabliert in unserer Arbeitsgruppe ist die Färbung der Zelloberfläche mit fluorophorgekoppeltem StxB (VT1b) und die konsekutive immunfluoreszenzmikroskopische oder durchflusszytometrische (FACS) Analyse (Falguières et al., 2008; Geyer et al., 2016; Janssen et al., 2006; M. Kim et al., 2011; Maak et al., 2011). Kommerziell erhältliche Anti-Gb₃-Antikörper weisen im Vergleich zu StxB eine deutlich geringere Sensitivität bei vergleichbarer Spezifität auf (M. Kim et al., 2011). Neuere Erkenntnisse haben gezeigt, dass Cholesterolextraktion die Bindung von StxB an Gb₃ vermindern kann, sodass das eigentliche Ausmaß an Gb₃-Expression potentiell unterschätzt wird. Abhilfe hierbei schafft die Cholesterolextraktion aus Zellen und Gefrierschnitten mittels Methyl-beta-Cyclodextrin (MβCD) (D. Lingwood et al., 2011). Dies stellt jedoch einen hochgradig unphysiologischen Zustand dar, der zwar die Sensitivität der Gb₃-Detektion erhöht, jedoch *in vivo* kein entsprechendes Korrelat besitzt und damit nur begrenzte Aussagekraft zur Abschätzung und Vorhersage der Wirksamkeit von Shiga-Toxin-basierten biomedizinischen Anwendungen besitzt.

Eine weitere klassische Nachweismethode stellt die Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) dar. Hierbei werden Lipide nach Extraktion anhand ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften aufgetrennt. Danach können sie auf unterschiedliche Arten visualisiert werden. Eine Möglichkeit stellt die Lipidfärbung mittels Ornicol dar, die anschließend semiquantitative Aussagen über den Lipidgehalt verschiedener Proben zulässt. In begrenztem Umfang ist die Bestimmung des exakten Gehalts an Lipid mittels eines bekannten Standards möglich. (Taki & Ishikawa, 1997; Waksmondzka-Hajnos et al., 2008) Genauer und spezifischer ist die Detektion mittels StxB und anschließender enzymatischer Visualisierung durch Meerrettichperoxidasegekoppelte (HRP) Anti-StxB-Antikörper, oder durch Autoradiographie unter Verwendung von radioaktiv markiertem STxB im Vergleich zu einem bekannten Standard (Falguières et al., 2001).

Neuere massenspektrometrische Methoden erlauben nicht nur die Detektion von Gb₃, sondern auch die einfache Identifikation der an Sphingosin gekoppelten Fettsäure, die Auswirkungen auf die zellbiologischen Eigenschaften von Gb₃ hat (Arab & Lingwood, 1998; Kiarash et al., 1994). Hierbei kommen unterschiedliche Ansätze wie beispielsweise die Kombination von HPTLC und Massenspektrometrie zum Einsatz (Meisen et al., 2005). Zudem ist es mittlerweile möglich Gb₃ und andere Lipide ortsauflösend im Mikrometerbereich mittels MALDI (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation)-Massenspektrometrie und laserinduzierter Positionierung zu quantifizieren (Soltwisch et al., 2015). Dies verbindet theoretisch die Vorteile von Massenspektrometrie und mikroskopischer Färbung: Gb₃ kann inklusive gekoppelter Fettsäuren genau quantifiziert werden und es ist eine morphologische Zuordnung zu einzelnen Bereichen im Gewebekontext auf einem histologischen Dünnschnitt (Gefrierschnitt) möglich. Einschränkung gilt es zu bemerken, dass bislang noch unklar war, ob die Methode im Vergleich zur Färbung mittels StxB ausreichende Sensitivität besitzt, um Gb₃ im Tumorgewebe sinnvoll nachweisen zu können. Zudem ist die Auflösung gegenwärtig geringer als bei mikroskopischer Darstellung. (Bien et al., 2020)

Unsere aktuellen Untersuchungen zeigen, dass die Sensitivität des MALDI-2 basierten Gb₃-Nachweises sogar höher ausfällt als die Immunfluoreszenzbasierte. Die Methode erlaubt zudem Gb₃-Vorläuferstrukturen wie GlcCer und LacCer, Abkömmlinge wie Gb₄ sowie verwandte und zusätzlich beispielsweise durch Bindung einer Fucosylgruppe modifizierte Sphingolipide wie Lewis^a- (Fuc-Lc4Cer, type 1 antigen) und Lewis^x-Antigen (Fuc-nLc4Cer, type 2 antigen, stage specific embryonic antigen 1) im Mikrometerbereich zu detektiert. In Kombination mit histologischer, immunhistochemischer und immunfluoreszenzbasierter Mikroskopie können so detaillierte Rückschlüsse über den Sphingolipidmetabolismus in humanem Tumorgewebe sowie die mögliche Bedeutung abberanter Sphingolipidexpression für Tumorzellmorphologie und -eigenschaften gezogen werden. Innerhalb eines kolorektalen Karzinoms scheinen global betrachtet hochgradig variable, jedoch lokal sehr konstante, sich zum Teil gegenseitig ausschließende komplexe GSL vorzuliegen. Dieser Umstand kann möglicherweise als eine Art Differenzierung verstanden werden, der sich auch im mikroskopischen Bild der Zellen nachvollziehen lässt und dessen Bedeutung durch die neuartige Methode einer intensiveren Forschung zugänglich wird. (Bien et al., 2020)

Tabelle 4 gibt einen Überblick über verschiedene Detektionsmethoden von Gb₃ und mögliche Vor- und Nachteile.

Tabelle 4: Vergleich unterschiedlicher Gb₃-Detektionsmethoden

Methode	Vorteile	Nachteile	Referenz (Beispiele)
Mikroskopie	Subzelluläre Auflösung, breit verfügbar, kostengünstig	Semiquantitativ, Abhängigkeit von Schnittqualität, mögliche Gb ₃ -Maskierung durch Cholesterol	(Falguieres et al., 2008; Geyer et al., 2016; M. Kim et al., 2011; D. Lingwood et al., 2011; Maak et al., 2011)
FACS	Zelluläre Auflösung (Anteil an Gb ₃ -positiven Zellen), gut etabliert	Qualitative bis semiquantitative Bestimmung des Gb ₃ -Gehalts, lediglich bei frisch resezierten Tumoren und Zelllinien, hoher experimenteller Aufwand bei Gewebe	(Geyer et al., 2016; M. Kim et al., 2011)
HPTLC	Quantitative Daten (enzymatische Visualisierung mit Standard), günstiges Instrumentarium	Ungenauigkeit (bei Ornicol-Darstellung), keine Ortsauflösung	(Falguieres et al., 2001)
MS (konventionell)	Quantitative Daten, Detektion der an Sphingosin gekoppelten Fettsäure, hoher Durchsatz	Kostspieliges Instrumentarium, hohe Expertise notwendig, keine Ortsauflösung	(Meisen et al., 2005)
MALDI(-2)-TOF-MS (ortsauflösend)	Quantitative Daten, Detektion der an Sphingosin gekoppelten Fettsäure, Ortsauflösung	Kostspieliges Instrumentarium, sehr hohe Expertise notwendig, Ortsauflösung (bisher) geringer als bei mikroskopischer Analyse	(Bien et al., 2020; Soltwisch et al., 2015)

2.2.4 Mit Gb₃ assoziierte Pathologien

Die physiologische Rolle von Gb₃ im Menschen ist immer noch weitgehend unklar. In einem Mausmodell für Gb₃-Defizienz durch genetischen „Knock-out“ des Enzyms *A4galt* konnte zunächst kein offensichtlicher Phänotyp festgestellt werden (Ando et al., 2016; Okuda et al., 2006), jedoch scheint Gb₃-Defizienz zu einer verschlechterten Knochenqualität beizutragen (Hamamura et al., 2019). Der beim Menschen hingegen sehr seltene „p“-Phänotyp, bei dem eine komplette Defizienz von Gb₃ vorliegt, ist mit einem erhöhten Auftreten von Transfusionsreaktionen sowie Abortneigung, vergleichbar mit einer Rhesus-Inkompatibilität, verknüpft (De La Vega Elena et al., 2009).

Beim Fabry-Syndrom, einer lysosomalen Speichererkrankung, kommt es zu einer Akkumulation von Gb₃ und verwandter GSL im Lysosom aufgrund Fehlens des Abbauenzym α -Galactosidase A. Die Patienten weisen vielfältige unspezifische Organdysfunktionen wie Vaskulopathie, Herzinsuffizienz, Nephropathie oder periphere Neuropathie auf. (Schiffmann, 2015; Waldek & Feriozzi, 2014)

Patienten mit systemischem Lupus erythematoses, einer als Kollagenose klassifizierten Autoimmunerkrankung, weisen einen veränderten GSL-Stoffwechsel und vermutlich dadurch bedingt veränderte Signaltransduktion in CD4⁺ T-Helferzellen auf. Durch Hemmung der GSL-Synthese *in vitro* mit dem klinisch erprobten GCS-Hemmstoff N-Butyldeoxynojirimycin konnten die Stimulation von autologen B-Zellen zur Bildung von Anti-dsDNA-Antikörpern, funktionelle Defekte und die veränderte Signaltransduktion revertiert werden. (McDonald et al., 2014)

Gb₃ fungiert vermutlich auch als natürlicher Resistenzfaktor gegen HIV-1-Infektionen. Während es zunächst als Eintrittsvektor für HIV-1 in Wirtszellen diskutiert wurde, konnten Lund et al. und Ramkumar et al. *in vitro* eine protektive Rolle von Gb₃ für mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) zeigen. (Lund et al., 2009; Ramkumar et al., 2009; Rawat et al., 2005)

2.2.5 Ausprägung von Gb₃ in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen

Die physiologische Ausprägung von Gb₃ ist vermutlich auf eine kleine Anzahl an Geweben und Zelltypen begrenzt und variiert teilweise zwischen unterschiedlichen Spezies. So weisen beispielsweise Kaninchen eine vergleichsweise starke Expression im Epithel des Gastrointestinaltrakts auf, während beim Menschen die Expression im Dün- und Dickdarm auf wenige Zelltypen wie neuroendokrine Zellen beschränkt scheint, wie eigene Vordaten zeigen. (Geyer et al., 2016; Mobassaleh et al., 1994) Laboreigene Untersuchungen konnten zudem nachweisen, dass das Expressionsniveau und die Lokalisierung von Gb₃ im Darmepithel der Maus sowie im Schwein mit der Situation beim Menschen sehr gut übereinstimmen (Janssen et al., 2006; Janssen & Schnieke, unveröffentlichte Befunde).

Beim Menschen wurden Gb₃ sowie die Lipide der Globoserie zuerst als Blutgruppenantigene des sog. P/P1/P_k-Systems beschrieben. Menschliche Erythrozyten prägen die Antigene p^k (Gb₃), P (Gb₄) oder P1 aus. Der sehr seltene Phänotyp p (Frequenz ca. 5 pro 1 Million) wird durch das Fehlen von p^k und P1 charakterisiert und ist auf fehlende Gb₃-Synthase-(A4GALT)-Aktivität zurückzuführen (Lund et al., 2009). Ebenso weisen eine Reihe von Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen sowie prä-apoptotische B-Zellen des Keimzentrums eine Gb₃-Expression auf (Falguières et al., 2001; Mangeney et al., 1991). In soliden Organen findet sich Gb₃ vor allem auf der Oberfläche von Gefäßendothelien, auf Nierentubuli, Mesangiumzellen und Neuronen des Gehirns sowie des peripheren Nervensystems (Falguières et al., 2008; Geyer et al., 2016; Janssen et al., 2006; Maak et al., 2011; Obrig et al., 1993; Perl et al., 2016; Perl et al., 2015; Robinson et al., 1995; Uchida et al., 1999).

Tabelle 5 gibt einen Einblick in die physiologische Gb₃-Expression verschiedener humaner Gewebe.

Tabelle 5: Physiologische Expression von Gb₃ in humanen Geweben

Organ/Gewebe	Zellen	Referenz
Niere	Nierentubuluszellen, Mesangiumzellen	(Robinson et al., 1995; Uchida et al., 1999)
Gehirn	Neuronen	(Hagel et al., 2015)
Blutgefäße	Endothelien	(Obrig et al., 1993)
Gastrointestinaltrakt	Neuroendokrine Zellen	(Geyer et al., 2016)
Tonsillen	Präapoptotische B-Zellen des Keimzentrums	(Mangeney et al., 1991)
Blut, Immunsystem	Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen	(Falguières et al., 2001)

2.2.6 Gb₃ in verschiedenen Tumorentitäten und seine pathophysiologische Rolle im Tumorkontext

Gb₃-Expression wurde für verschiedene Tumorentitäten beschrieben, teilweise in Vorbefunden der eigenen Arbeitsgruppe an gastrointestinalen Karzinomen. Im Magenkarzinom zeigten 72% der von uns mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersuchten Proben Gb₃-Überexpression im Vergleich zur normalen Magenschleimhaut, wobei die intratumorale Ausprägung signifikant negativ mit dem Tumor-Stadium (TNM) korreliert war. (Geyer et al., 2016)

Weitere Befunde der Arbeitsgruppe zeigten, dass auch Darmtumore verstärkt Gb₃ ausprägen, sowohl im vorklinischen genetischen Mausmodell (Janssen et al., 2006), als auch bei Patienten. So wiesen humane Kolonkarzinome eine hochsignifikante Überexpression von Gb₃ (quantifiziert mittel Dünnschichtchromatographie) um das Dreifache gegenüber Normalgewebe auf. Auch Lebermetastasen zeigten eine erhöhte Ausprägung, während jeweils ähnliche Gb₃-Konzentrationen wie in den zugehörigen Primärtumoren („matched samples“) nachgewiesen wurden. In derselben Untersuchung wurden auch seltenere Tumorentitäten des Gastrointestinaltraktes einbezogen; einzelne Carcinoidtumore, Epidermoidkarzinome, Leiomyosarkome sowie Lymphome des Dünndarms konnten ebenfalls als Gb₃-überexprimierend beschrieben werden. Interessanterweise wiesen gutartige Adenome des Kolorektums keine erhöhte Expression von Gb₃ auf, dies konnte an ex vivo Primärkulturen bestätigt werden und legt eine gesteigerte Ausprägung von Gb₃ während der malignen Transformation nahe. (Falguières et al., 2008)

Auch für duktales Pankreasadenokarzinome wurde eine hochsignifikant erhöhte Ausprägung von Gb₃ (quantifiziert mittels Dünnschichtchromatographie) gezeigt (Maak et al., 2011).

Tabelle 6 gibt einen Einblick in verschiedene Tumorentitäten, für die Gb₃-Überexpression im Tumorgewebe aus Patienten beschrieben wurde.

Tabelle 6: Gb₃-Überexpression in humanen Tumorproben. Abkürzungen: PDAC: pankreatisch duktales Adenokarzinom, BL: Burkitt-Lymphom, DHL: Diffus-Histozytäres-Lymphom, DPDL: diffuse, poorly differentiated lymphoma (diffus schlechtdifferenziertes Lymphom)

Tumorentität	Anzahl unter-such-ter Pa-tienten	Gb₃-Detektionsmethode	Referenz
Magenkarzinom	50	Immunfluoreszenzmikroskopie (fluorophorgekoppeltes StxB)	(Geyer et al., 2016)
Kolorektalkarzinom	66	HPTLC	(Falguieres et al., 2008)
PDAC	27	HPTLC	(Maak et al., 2011)
Mammakarzinom	107	Immunfluoreszenzmikroskopie (fluorophorgekoppeltes StxB)	(Stimmer et al., 2014)
Maligne Ovarialtumoren	16	TLC	(Arab et al., 1997)
Testikuläre Tumoren	13	TLC, Immunfluoreszenzmikroskopie	(Ohyama et al., 1990)
Burkitt-Lymphom	8	Immunfluoreszenzmikroskopie	(Nudelman et al., 1983; Wiels et al., 1981)
Lymphome (BL, DHL, DPDL)	16	HPTLC	(Kalisiak et al., 1991)
Multiples Myelom	7	Flusszytometrie und Immunzytometrie	(LaCasse et al., 1999)

Die Neovaskulatur von Tumoren exprimiert zumeist ebenfalls besonders hohe Mengen an Gb₃, wie auch laboreigene Befunde zeigen. Anti-Gb₃-Antikörper nutzen diesen Umstand und wurden *in vitro* und im Tiermodell als Angiogenesehemmer erprobt. (Desselle et al., 2012)

Während die Ausprägung von Gb₃ in verschiedenen Tumorgeweben gut untersucht und für eine Vielzahl von Malignitäten eine starke Erhöhung beschrieben ist, ist die funktionelle Rolle von Gb₃ für Tumorentstehung und Progression, die in Anbetracht der häufigen Erhöhung dieser Lipidspezies zu erwartet ist, noch weitgehend unklar. Gb₃ werden in der Literatur vielfach Funktionen zugeschrieben, die die „hallmarks“, sprich die zentralen Kennzeichen, von malignen Tumoren beeinflussen (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Trotz dieser mutmaßlich relevanten Rolle fehlen bislang noch allgemein anerkannte Modelle für die genaue zellbiologische Wirkungsweise.

Die Arbeitsgruppe um M. Donowitz postulierte für Gb₃ eine invasionsfördernde Rolle, die zur metastatischen Umwandlung von Darmkrebszellen beiträgt. Hierzu wurden im Rahmen eines *in vitro*-Modells einzelne hochgradig Gb₃-positive Zellen aus einer heterogenen Zelllinie selektiert. Auch konnte durch Transfektion der Gb₃-Synthase in nicht-malignen Epithelzellen Invasivität induziert werden. (Kovbasnjuk et al., 2005) Dahingegen zeigten Jacob et al. mittels eines Ovarialkarzinommodells, dass das Gb₃-synthetisierende Enzym *A4galt* die mit Invasion, Migration, Metastasierung und Chemotherapie assoziierte Epithelial-mesenchymale Transition unterdrückt und seine Deletion und damit die Auslöschung der Globoserie der GSL mittels CRISPR/Cas9 diesen Transitionsprozess anstoßen kann (Jacob et al., 2018). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den meisten bisher publizierten Untersuchungen bezüglich der Rolle von Gb₃, die eine Erhöhung von Chemotherapieresistenz sowie Migrationfähigkeit nahelegen (De Rosa et al., 2008; Johansson et al., 2010; Kovbasnjuk et al., 2005; C. A. Lingwood, 2011; C. A. Lingwood et al., 2010; Liu et al., 2010).

Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen Gb₃ und der erworbenen Chemotherapieresistenz durch den ABC-Transporter P-gp (P-Glykoprotein) untersucht. P-gp ist eine membranständige Effluxpumpe, die verschiedene xenogene Substanzen wie beispielsweise Chemotherapeutika aus dem Inneren einer Zelle unter Energieverbrauch nach Außen transportieren kann. (Ambudkar et al., 1999) Es dient bei der Gb₃-Synthese als „Flippase“, die Glucosylceramid, dem Ausgangsprodukt der GSL-Synthese, von der zytosolischen auf die endoluminale Seite der Golgimembran verbringen kann (Behnam-Motlagh et al., 2010; Lala et al., 2000). Zudem wurde Gb₃ als Anker für P-gp an der Zellmembran beschrieben, weshalb durch Einsatz des wasserlöslichen Gb₃-Analogons AdamantylGb₃ die Membranrekrutierung erfolgreich verhindert und somit Chemotherapieresistenz aufgehoben werden kann (De Rosa et al., 2008). Gb₃

scheint auch einen Effekt auf die intrazelluläre Signaltransduktion via β -Catenin und der Kinase c-Src zu haben und so die Expression von P-gp indirekt zu erhöhen (Liu et al., 2010). Erworbene Cisplatinresistenz steht in Zusammenhang mit erhöhter Gb₃-Expression (Johansson et al., 2010). Durch subletale Konzentrationen des an Gb₃ bindenden VT1 (Stx1a) und Cisplatin konnte ein super-additiver Abtötungseffekt auf Tumorzellen detektiert werden; Inhibition der Gb₃-Synthese führte dagegen zu erhöhter Cisplatinempfindlichkeit (Johansson et al., 2010).

Eine Membranankerfunktion von Gb₃ ähnlich zu der für P-gp wurde auch für das Hitzeschockprotein Hsp70 beschrieben. Gb₃-haltige Zellen scheinen sowohl höhere Mengen endogenen als auch exogen zugeführtem, fluorophorgekoppeltem Hsp70 in den „Lipidrafts“ verankern zu können. Membranständiges Hsp70 wurde als möglicher Resistenzfaktor gegen Strahlentherapie identifiziert und ist Angriffspunkt verschiedener experimenteller Ansätze zur Tumorummuntherapie. (Gehrmann et al., 2008; Gehrmann et al., 2012; Murakami et al., 2015; Stangl et al., 2011; Vega et al., 2008)

Daneben wurde beschrieben, dass Gb₃ in Epithelzellen die zelluläre Kontaktinhibition vermittelt. So konnte gezeigt werden, dass kultivierte, immortalisierte, jedoch nicht maligne transformierte Mammazellen eines hohen Konfluenzgrades mit vielen Zell-Zell-Kontakten durch exogen hinzugefügtes Gb₃ niedrigere Proliferationsraten und niedrigere EGFR-Aktivierungslevel als nicht Gb₃-ausprägende Kontrollen aufwiesen. Zudem konnte die Proliferation von Zellen hoher Dichte, die unter Kontrollumständen starker Kontaktinhibition unterlagen und dadurch stark in ihrer Zellteilung eingeschränkt waren, durch Inhibition der Gb₃-Synthese gesteigert werden. Anzumerken ist, dass hier nicht-transformierte, jedoch immortalisierte Zellen verwendet wurden und die Übertragbarkeit auf Tumorzellen somit nur bedingt gegeben ist. (Huang et al., 2017)

Wie bei anderen Glykosphingolipide wird die Biosynthese von Gb₃ als Möglichkeit für Tumorzellen gesehen, um proapoptisches Ceramid in für die Tumorzelle unschädliche oder sogar überlebensfördernde Sphingolipidderivate umzuwandeln (Liu et al., 2010). So könnte die Stimulation von GSL-Synthesewegen einen Selektionsvorteil, insbesondere unter chemotherapiebedingter Akkumulation von Ceramid, mit sich bringen (Johansson et al., 2010; Lala et al., 2000; Liu et al., 2010). Der Gb₃-Abkömmling Gb₄ wurde zusätzlich als Ligand des EGF-Rezeptors (EGFR) beschrieben und könnte so Proliferation und Überleben von EGFR-tragenden Tumorzellen steigern (Giussani et al., 2014; Park et al., 2012).

2.2.7 Regulation der Biosynthese von Gb₃

Neben der noch unklaren physiologischen und pathophysiologischen Rolle von Gb₃ sind bislang auch die molekularen Grundlagen der Gb₃-Ausprägung weitgehend unverstanden. Einige Studien haben sich mit Erhöhung und Verringerung der Expression über bestimmte Mediatoren auseinandergesetzt, wobei dies oftmals auf rein phänomenologischer Basis geschah. Weniger bekannt ist, welche Faktoren überhaupt für Gb₃-Exposition entscheidend sind, zumal die meisten menschlichen Gewebe wie zuvor erwähnt keine Gb₃ Expression aufzuweisen scheinen.

Für den Einsatz Shiga-Toxin-basierter Therapien erscheint weniger die Gesamtmenge an Gb₃ auf der Zelloberfläche entscheidend als das Vorhandensein der Oberflächenexposition an sich sowie einer raschen und effizienten Aufnahme entlang des retrograden Weges. (Jacewicz et al., 1994)

Die Glucosylceramidsynthase (GCS) wurde als Schrittmacherenzym der Glykosphingolipid-Synthese beschrieben und beeinflusst den Gb₃-Gehalt einer Zelle maßgeblich (Liu et al., 2010). Eine de novo Gb₃-Expression kann durch Transfektion des Enzyms *A4galt* auf initial Gb₃-defizienten Zellen hergestellt werden, was nahelegt, dass dieser eine essentielle Rolle zukommt (J. J. Keusch et al., 2000; Kojima et al., 2000; Kovbasnjuk et al., 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass die Gb₃-Synthese, kodiert durch das A4GALT-Gen, mutmaßlich rein transkriptionell ohne relevante kovalente oder allosterische Modifikationen reguliert wird, da nach Induktion der Gb₃-Synthese mittels Fumonisin B₁ der k_m der katalysierten Reaktion konstant blieb und sich v_{max} erhöhte (Meivar-Levy & Futerman, 1999).

Entzündungsmediatoren wie die Zytokine TNF- α und IL-1 erhöhen den Gehalt an Gb₃ in endothelialen HUVEC-Zellen, was zur Entstehung des HUS im Rahmen einer EHEC-Infektion beitragen könnte (van de Kar et al., 1992). Die erhöhte Gb₃-Exposition wurde auf steigende Expression der an der GSL-Synthese beteiligten Enzyme zurückgeführt (Stricklett et al., 2002). Interessanterweise konnte der Effekt von TNF- α nicht bei CD4⁺ T-Helferzellen nachgewiesen werden, was die Schwierigkeit bei der Übertragbarkeit einzelner Versuche auf einen zelltypübergreifenden Regulationsmechanismus verdeutlicht (McDonald et al., 2014).

Eine Erhöhung des Ceramidangebotes durch Spaltung von Sphingomyelin mittels neutraler Sphingomyelinase steigert die Gb₃-Expression in endothelialen Zellen (Obrig et al., 2003). Gb₃-Akkumulation kann auch durch verminderten Abbau mittels Alpha-Galaktosidase A bedingt werden. Wenn die Alpha-Galaktosidase A wie beim Morbus Fabry in ihrer Aktivität gehemmt ist, weisen betroffene Patienten stark erhöhte Konzentrationen an Globoserien-GSL im Gewebe auf. (Bodary et al., 2005)

Tabelle 7 gibt einen Überblick über bekannte Faktoren, die die Gb₃-Expression erhöhen sowie den in der Publikation vorgeschlagenen Mechanismus.

Tabelle 7: Erhöhte Biosynthese von Gb₃ und vorgeschlagener Wirkmechanismus in der Literatur

Faktor	Mechanismus	Modell	Referenz
Zytokine (TNF-α, IL-1)	Erhöhte Expression von GCS, LacCerS sowie A4GALT	Endothel (HUVEC)	(Stricklett et al., 2002; van de Kar et al., 1992)
Neutrale SMase	Erhöhung des Ceramidangebots und GCS-Überexpression	Endothel (HDMEC)	(Obrig et al., 2003)
Alpha-Galaktosidase A-Defizienz	Verminderter Abbau von Globoserien-GSL	<i>in vivo</i> , Maus	(Bodary et al., 2005)
Butyrat	Unklar (vermutlich epigenetischer Effekt, vermittelt durch Histon-Deacetylasen)	Endothel (HUVEC, HSVEC)	(G. T. Keusch et al., 1996; Louise et al., 1995)
Fumonisin B₁	Erhöhte Expression von GCS	Fibroblasten (3T3)	(Meivar-Levy & Futerman, 1999)
Cisplatin-Therapie	P-gp Erhöhung (Flippase für GlcCer)	Pleuramesotheliom (P31, H1299)	(Johansson et al., 2010)

3 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, die Regulation der Biosynthese des zellulären Rezeptors des Shiga-Toxins, Globotriaosylceramid (Gb₃) näher zu charakterisieren, sowie die pathophysiologische Rolle von Gb₃ bei der Entstehung und Progression von Karzinomen zu ergründen und weiterhin den Einsatz von bakteriellen Shiga-Toxinen als gezielten Therapieansatz zu erproben.

Im ersten Teil der Arbeit wird die Rolle des Enzyms α -1,4-Galaktosyltransferase (A4GALT) für die Synthese von Gb₃ herausgearbeitet sowie pharmakologische Ansatzpunkte zur Beeinflussung der A4GALT-Ausprägung diskutiert. Im zweiten Abschnitt wird die Bedeutung des Glykosphingolipids Gb₃ als Konsequenz der Neoexpression von A4GALT für Karzinomentstehung und -progression mittels durch Genomeditierung erstellter A4GALT-Defizienzzlinien untersucht. Im dritten Teil wird der gezielte Tumor-Therapieansatz gegen auf der Zelloberfläche ausgeprägtes Gb₃ näher betrachtet.

Im Rahmen der Arbeit stellte sich zunehmend heraus, dass Gb₃ nicht als singuläre Struktur zu begreifen ist: als gemeinsamer Vorgänger der Globoserienlipide stellt die Expression mutmaßlich einen entscheidenden Schritt hin zu einer von mehreren möglichen Differenzierungsmöglichkeiten dar und beeinflusst möglicherweise den gesamten GSL-Metabolismus der Tumorzelle. Zukünftige Untersuchungen werden sich so auch auf diesen Umstand stützen müssen und die wesentlichen Zusammenhänge und Funktionen der verschiedenen komplexen GSL-Spezies untersuchen müssen.

4 Material

4.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	M6250
5-Aza-2'-desoxycytidin	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	A3656
5-Fluorouracil (5-FU)	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland	-
6,5mm Transwellinserts mit 8,0µm Poren	Corning, Corning NY, USA	3422
Adenosin-5'-Triphosphat (ATP)	New England Biolabs, Ipswich, USA	P0756S
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	1122390100
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck, Darmstadt, Deutschland	100924
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	A0166
Anti/Anti 100x	Thermo Fisher, Waltham, USA	15240096
BioCoat Matrigel Invasionskammern	Corning, Corning, USA	354480
BIX01294	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	B9311
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	A7906
Collagenase I	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	C1639
DAPI	Thermo Fisher, Waltham, USA	D1306
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	PHR1309
Dispase I	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz	04942086001
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Thermo Fisher, Waltham, USA	41965062
DTT (Dithiothreitol)	Thermo Fisher, Waltham, USA	R0861
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Thermo Fisher, Waltham, USA	14190169
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland	100983
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	2218
FastDigest BpiI (BbsI)	Thermo Fisher, Waltham, USA	FD1014
FastDigest EcoRI	Thermo Fisher, Waltham, USA	FD0274
FastDigest Green Puffer (10x)	Thermo Fisher, Waltham, USA	B72
Foetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher, Waltham, USA	10500064
Formaldehyd 37%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	7398
Gelatine	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	G-9391
Gentamycinlösung (50mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	G1397
Glycerol-Gelatinelösung	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	GG1
hEGF	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	SRP3027
Humaninsulin (100 I.U./ml)	Novo Nordisk A/S, Bagsværd, Dänemark	8-0204-81
Ibidi „Wundheilungs“-Einsatz in µ-Kammer 35mm, hoch	Ibidi, Martinsried, Deutschland	81176
IPTG	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	10724815001

Isopropanol	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland	-
Kristallviolettlösung (1%)	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	V5265
L-Glutamin 200mM	Biochrom, Berlin, Deutschland	K 0283
LB-Medium	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München, München, Deutschland	-
McCoy's 5A (Modified) Medium, GlutaMAX™ Supplement	Thermo Fisher, Waltham, USA	36600088
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	M4287
MS-275	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	EPS002
OptiMEM	Thermo Fisher, Waltham, USA	31985062
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	P6148
PBS-Trockensubstanz	Biochrom, Berlin, Deutschland	L 182-50
Penicillin/Streptomycin 10.000U/ml / 10.000µg/ml	Biochrom, Berlin, Deutschland	A 2213
PlasmidSafe-Exonuklease	Lucigen via Fisher Scientific (Thermo Fisher), Waltham, USA	NC9046399
pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0	Feng Zhang via Addgene, Cambridge, USA	62988
Puromycin	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	P9620
RPMI 1640 Medium	Thermo Fisher, Waltham, USA	11875093
SOB-Medium	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München, München, Deutschland	-
SOC-Medium	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München, München, Deutschland	-
Stx1	Institut für Hygiene der Universität Münster (AG Müthing), Münster, Deutschland	-
Stx2	Institut für Hygiene der Universität Münster (AG Müthing), Münster, Deutschland	-
StxB-MMAE	Ludger Johannes, Paris, Frankreich	-
T4 Ligationspuffer 10x	Thermo Fisher, Waltham, USA	B69
T4 Polynukleotidkinase	New England Biolabs, Ipswich, USA	M0201S
T7-Ligase	New England Biolabs, Ipswich, USA	M0318S
Tango Puffer (10X)	Thermo Fisher, Waltham, USA	BY5
Trichostatin A	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	T8552
Triton X-100	Hercules, USA	1610407
Trypanblaulösung	Biochrom, Berlin, Deutschland	L 6323
Trypsin/EDTA (1x)	Thermo Fisher, Waltham, USA	15050065
Valproat-Natrium-Salz	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	P4543
X-GAL	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	10745740001

4.2 Kits und Fertiglösungen

Kit	Hersteller	Artikelnummer
Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	69504
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	11465015001
EpiTect Fast Bisulfitkonversionskit	Qiagen, Hilden, Deutschland	59824
FuGENE HD-Transfektionskit	Promega, Fitchburg, USA	E2311
HotStarTaq DNA Polymerase-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	203203
LightCycler 480 Probes Master	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz	4887301001
NHS-Rhodamine Antikörper-Kopplungskit	Thermo Fisher, Waltham, USA	53031
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	27106
QIAquick Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden, Deutschland	28704
RevertAid H Minus cDNA-Synthesekit	Thermo Fisher, Waltham, USA	K1632
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	74104
TOPO TA Klonierungskit mit pCR2.1-TOPO-Vektor und TOP10 chemisch kompetenten Bakterien	Thermo Fisher, Waltham, USA	K457540
Universal ProbeLibrary Set	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA	4683633001

4.3 Antikörper und Färbesubstanzen

Substanz	Hersteller	Artikelnummer
7-AAD	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA	559925
Anti-cmHsp70.1-FITC (Maus)	(Friedrich et al., 2010)	
Anti-EpCAM (Ber-EP4, Maus)	Thermo Fisher, Waltham, USA	MA5-12604
Anti-Golgin-97 (CDF4, Maus)	Thermo Fisher, Waltham, USA	A-21270
Anti-Maus-A488 (Ziege)	Jackson ImmunoResearch	115-545-146
Anti-P-gp-PE Klon 17F9 (Maus)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA	557003
Anti-von-Willebrand-Faktor (F8/86, Maus)	Thermo Fisher, Waltham, USA	MA5-14029
BSA-Cy3	Nanocs, New York, USA	BS1-S3-1
StxB-Cy3	Ludger Johannes, Paris, Frankreich	-
StxB-Cys Mutante	Ludger Johannes, Paris, Frankreich	-

4.4 Geräte

Gerät	Hersteller	Artikelnummer
Autoklaviergerät Systec D-65	Systec, Linden, Deutschland	-
Axio Observer.Z1 Mikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland	diverse

FACSCalibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA	4CS-E4923
Fettstift	Dako, Glostrup, Dänemark	S200230-2
Gel Doc XR Molecular Imager	Bio-Rad, München, Deutschland	1708195EDU
Gelkammern für Elektrophorese	Diverse Hersteller	diverse
Gleichstromquelle (Biometra Power Pack P25T)	Analytik Jena, Jena, Deutschland	846-040-850
Kryostat CM3050S	Leica, Nussloch, Deutschland	-
LightCycler 480 Instrument II	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz	5015278001
Magnetrührer	diverse	diverse
Metall-Block-Thermostat MBT 250	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, Deutschland	5852430
Mithras LB 940 Multitechnologie Mikroplattenlesegerät	Berthold Technologies, Wildbad, Deutschland	-
Multifuge 3SR Plus	Heraeus, Hanau, Deutschland	75004371
NanoDrop 1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher, Waltham, USA	ND-1000
Pipetboy acu 2 Pipettierhilfe	Integra, Zizers, Schweiz	155 000
Reinstwassersystem Purelab Ultra Analytic MK II	ELGA LabWater, Lane End, UK	EPLULANA
T3 Thermocycler	Analytik Jena, Jena, Deutschland	3100-810-13
TissueLyser II	Qiagen, Hilden, Deutschland	85300
Vakuumpumpe EcoVac	schuett-biotech, Göttingen, Deutschland	3.350 022
Vortex-Genie 2 (G560E)	Scientific Industries, Bohemia, USA	SI-0236
Zählkammer nach Neubauer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland	640130
Zentrifuge 39.000g Biofuge	Heraeus Kendro, Osterode, Deutschland	75003650

4.5 Software

Software	Hersteller	Version
Affinity Designer	Serif, Nottingham, UK	1.6.0
Affinity Photo (iOS)	Serif, Nottingham, UK	1.6.5
AxioVision	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland	4.8.2
CellQuest Pro	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA	6.0
Endnote	Clarivate Analytics (Thomson Reuters), Philadelphia, USA	8.1
Gel Doc Software Quantity one	Bio-Rad, München, Deutschland	4.6.2
GraphPad Prism	GraphPad Software, La Jolla, USA	6.00
Nanodrop	Thermo Fisher, Waltham, USA	3.8.1
Powerpoint für Mac	Microsoft, Redmond, USA	16.8.0
Primer3	Whitehead-Institut für biomedizinische Forschung, Cambridge, USA	4.10

SnapGene Viewer	GSL Biotech, Chicago, USA	4.1.3
Word für Mac	Microsoft, Redmond, USA	15.4.0

4.6 Zellen

Zellen	Hersteller	Referenznummer
AGS	LGC Standards, Teddington, UK	ATCC CRL-1739
DLD-1	LGC Standards, Teddington, UK	ATCC CCL-221
HTC 116	LGC Standards, Teddington, UK	ATCC CCL-247
MKN-45	DSMZ, Braunschweig, Deutschland	DSMZ ACC 409
St3051	-	(Vollmers et al., 1993)

4.7 Verbrauchsmaterialien und Einmalartikel

Substanz/Artikel	Hersteller	Artikelnummer
15ml Zentrifugiergefäß	Corning, Corning, USA	352096
50ml Zentrifugiergefäß	Corning, Corning, USA	352070
96 Well PCR Platte, weiß, LC 480	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland	710877
Clean Solution	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA	340345
Cryovials, 2 ml, konisch, Innengewinde	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland	710523
Deckgläschen 24mmx24mm	Thermo Fisher, Waltham, USA	BBAD02400240
Durchflusszytometriegefäß 5ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	55.1579
Einmalskalpelle Fig. 10	Feather, Osaka, Japan	02.001.30.010
Eppendorf Safe-Lock Tubes 0.5 mL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	0030 121.023
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1.5 mL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	0030 120.086
Eppendorf Safe-Lock Tubes 2.0 mL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	0030 120.094
Ethanol 70%, 96%	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland	-
FACSRinse Solution	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA	340346
Filterpipettenspitze 0,1-10µl	Kisker Biotechnology, Stuttgart, Deutschland	A300S
Filterpipettenspitze 0,5-20µl	Kisker Biotechnology, Stuttgart, Deutschland	A20S
Filterpipettenspitze 1-200µl	Kisker Biotechnology, Stuttgart, Deutschland	A200S
Filterpipettenspitze 100-1000µl	Kisker Biotechnology, Stuttgart, Deutschland	A1000S

Nylonzellsieb 100µM	Corning, Corning, USA	352360
Objektträger	Thermo Fisher, Waltham, USA	10144633CF
Objektträger Superfrost	Thermo Fisher, Waltham, USA	1014356190
Parafilm Folie	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA	HEA234526A
Pasteurpipetten aus Glas	Brand, Wertheim, Deutschland	7477 15
PCR 8er-SoftStrips, 0.2 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland	711030
Pipettenspitzen ohne Filter 0,1-1000µl	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland	diverse
Serologische Pipetten 10ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland	86.1254.001
Serologische Pipetten 25ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland	86.1685.001
Serologische Pipetten 50ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland	86.1256.001
Serologische Pipetten 5ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland	86.1253.001
Sheath Fluid	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA	342003
Spectra/Por 3 Dialyseschlauch	Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, USA	132724
Zellkulturschale 24-Vertiefungen Mikrotiterplatte, adhärenente Zellen	Corning, Corning, USA	353047
Zellkulturschale 6-Vertiefungen Mikrotiterplatte, adhärenente Zellen	Corning, Corning, USA	353934
Zellkulturschale 96-Vertiefungen Mikrotiterplatte, adhärenente Zellen	Corning, Corning, USA	353219
Zellkulturschale für adhärenente Zellen 10cm	Corning, Corning, USA	353003

5 Methoden

5.1 Protokolle

Zellen ernten, auszählen und passagieren: adhärenente Zellen

1. Wachstumsmedium mit einer Pumpe und Pasteureinmalpipetten entfernen
2. Zellen mit PBS waschen und PBS absaugen
3. 2ml Trypsin/EDTA auf die Zellen geben und für ca. 5min (2-10min) bei 37°C inkubieren
4. Zellen in 6ml Wachstumsmedium mit FCS aufnehmen und in ein steriles 15ml Zentrifugiergefäß (Falcon® Tube) geben
5. Zellen bei 540g abzentrifugieren und Überstand verwerfen
6. Zellen in 5ml Wachstumsmedium aufnehmen und durchmischen
7. 10µl der Suspension in eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen geben, 30µl 0,4% Trypanblaulösung hinzugeben und mittels sanftem Auf- und Abpipettieren mischen
8. In einer Zählkammer nach Neubauer die Zellkonzentration lichtmikroskopisch bestimmen
9. Die Zellen in der gewünschten Konzentration auf einer für adhärenente Zellen vorgesehenen Zellkulturplatte ausbringen

Zellkulturmedien:

- HCT116
Für Zellkultur: McCoy's 5A (Modified) Medium + GlutaMAX™ Supplement, 7% FCS, 1% Pen/Strep, 1% Glutamin
Zur Migration und Invasion entlang eines FCS-Gradienten: McCoy's 5A (Modified) Medium + GlutaMAX™ Supplement, 10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% Glutamin
- DLD-1, MKN-45, St 3051
DMEM, 10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% Glutamin
- AGS
RPMI 1640, 10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% Glutamin
- Primärkultur gastrointestinaler Karzinome (nach Maak et al., 2011)

DMEM, 20% FCS, 1% Pen/Strep, 1% Glutamin, 1% Anti/Anti (100x), 0,1% Gentamicin, 0,1% Insulin (100 I.U./ml), 0,02% hEGF (50µg/ml)

Zellen einfrieren

1. Wachstumsmedium mit einer Pumpe und Pasteureinmalpipetten entfernen
2. Zellen mit PBS waschen und PBS absaugen
3. 2ml Trypsin/EDTA auf die Zellen geben und für ca. 5min (2-10min abhängig von der jeweiligen Linie) bei 37°C inkubieren
4. Zellen in 6ml Wachstumsmedium mit FCS aufnehmen und in ein 15ml Zentrifugiergefäß (Falcon® Tube) geben
5. Zellen bei 540g abzentrifugieren und Überstand entfernen
6. Zellen in 90%FCS/10%DMSO aufnehmen und je 1 bis 1,5ml in 2ml Gefriergefäße geben
7. Bei -80°C langsam mittels eines Isopropanol-Gefriercontainers einfrieren
8. Zur langfristigen Lagerung nach frühestens 24h in flüssigem Stickstoff aufbewahren
9. Ein Gefriergefäß zur Kontrolle auftauen (siehe unten) und lichtmikroskopisch Wachstums- und Überlebensverhalten der Zellen überprüfen

Zellen auftauen

1. Zellen im Gefriergefäß langsam bei Raumtemperatur erwärmen und sogleich nach vollständigem Auftauvorgang zur Vermeidung von durch DMSO bedingter Schädigung in 9ml Wachstumsmedium in ein 15ml Zentrifugiergefäß (Falcon® Tube) geben
2. Suspension bei 540g zentrifugieren und Überstand entfernen
3. Zellen in Wachstumsmedium auf einer geeigneten Zellkulturplatte ausbringen und mindestens 12h inkubieren
4. Wachstums- und Überlebensverhalten der Zellen lichtmikroskopisch regelmäßig überprüfen

Herstellung einer Primärkultur humaner gastrointestinaler Karzinome (nach Maak et al., 2011)

1. Verdaumedium und Kulturmedium herstellen

a. Verdaumedium:

Reagenz	Menge
DMEM 1x	25ml
FCS	125µl
Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml bzw. 10.000µg/ml)	250µl
Anti/Anti 100x (Antibiotikum/Antimykotikum)	250µl
Gentamicin	25µl
Glutamin (200mM)	250µl
Dispase I (40mg/ml)*	50µl
Collagenase I (20mg/ml)*	50µl
Insulin (100I.U./ml)*	25µl
hEGF (50µg/ml)*	5µl

*Diese Substanzen sollten jeweils unmittelbar vor der jeweiligen Benutzung zugegeben werden (siehe Punkt c).

b. Kulturmedium:

Reagenz	Menge
DMEM 1x	40ml
FCS	10ml
Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml bzw. 10.000µg/ml)	500µl
Anti/Anti 100x	500µl
Gentamicin	50µl
Glutamin (200mM)	500µl
Insulin (100I.U./ml)*	50µl
hEGF (50µg/ml)*	10µl

*Diese Substanzen sollten jeweils unmittelbar vor der jeweiligen Benutzung zugegeben werden (siehe Punkt c).

- c. Wenn die Medien nicht direkt benutzt werden, müssen hEGF (1 zu 500 verdünnt bei 50µg/ml), Insulin (1 zu 100 verdünnt bei 100 I.U./ml) beim Kulturmedium bzw. zusätzlich Dispase I (1 zu 500 verdünnt bei 40mg/ml) sowie Collagenase I (1 zu 500 verdünnt bei 20mg/ml) beim Verdaumedium jeweils unmittelbar vor Benutzung frisch zugegeben werden
2. Sterile Deckgläschen in die Vertiefungen einer 6er Mikrotiterplatte legen und für 1h bei Raumtemperatur mit 0,1% Gelatine in PBS beschichten
3. Tumorprobe entnehmen bzw. an OP-Schleuse in Empfang nehmen und in Kulturmedium zum Transport lagern
4. Tumorprobe mit zwei Skalpellens auf einer 10cm Schale unter Anfeuchten mit 500µl Verdaumedium fein verkleinern, sodass sie in einen serologischen 10ml Pipettenaufsatz aufgenommen werden können
5. Mechanisch mithilfe der Pipette durch Auf- und Abpipettieren zerkleinern
6. Zerkleinerte Tumorprobe für 3 bis 5h bei 37°C unter ständiger Bewegung (z.B. in einem Bakterienschrank) in einem 15ml Zentrifugiergefäß inkubieren, dabei den Deckel lediglich fest aufsetzen, jedoch nicht luftdicht verschließen
7. Bei 540g abzentrifugieren, den Überstand verwerfen und in 5ml DMEM resuspendieren
8. Schritt 7 wiederholen
9. Bei 540g abzentrifugieren, den Überstand verwerfen und die Probe in der gewünschten Menge Kulturmedium resuspendieren
10. Suspension mit einem sterilen 100µM Nylonsieb filtern
11. Extrahierte Primärzellen auf den beschichteten Deckgläsern ausbringen und für ein bis fünf Tage inkubieren
12. Primärzellen mittels Immunfluoreszenz bzw. StxB-Cy3-Aufnahmeversuch gemäß Protokoll färben, dabei besondere Vorsicht walten lassen, um größere Organellen nicht abzuspülen

RNA-Extraktion mittels des Qiagen RNeasy Mini Kits

1. Zellen ernten und bei 540g pelletieren (siehe oben)
2. Überstand entfernen und in 350µl RLT Zellysepuffer mit 1% 2-Mercaptoethanol resuspendieren
3. Die Suspension auf die Qiashreddersäule geben und bei 8000g zentrifugieren
4. Die Suspension mit 350µl Ethanol mischen und in die RNeasy Mini Zentrifugiersäule pipettieren

5. 30s bei 8000g zentrifugieren, die sich im Auffangbereich der Säule befindliche Flüssigkeit verwerfen
6. 400µl Puffer RW1 auf die Säule geben und bei 8000g für 30s zentrifugieren, die sich im Auffangbereich der Säule befindliche Flüssigkeit verwerfen
7. 10µl DNase (1500 Kunitz Einheiten/ml) in 70µl RDD Puffer auf die Säule geben und 15min bei Raumtemperatur inkubieren
8. 400µl Puffer RW1 auf die Säule geben und bei 8000g für 30s zentrifugieren, die sich im Auffangbereich der Säule befindliche Flüssigkeit verwerfen
9. 500µl RPE Puffer auf die Säule geben und bei 8000g für 30s zentrifugieren, die sich im Auffangbereich der Säule befindliche Flüssigkeit verwerfen
10. Schritt 9 einmal wiederholen
11. Säule in ein neues 2ml Eppendorfgefäß stellen und bei 8000g für 2min zentrifugieren
12. Säule in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß stellen und 30µl RNase-freies Wasser auf die Säule geben
13. 1min bei Raumtemperatur inkubieren
14. 2min bei 8000g zentrifugieren
15. Säule entfernen und das Eppendorfgefäß beschriften
16. RNA-Gehalt mittels NandoDrop bestimmen und RNA bei -80°C lagern

Umschreibung von RNA in cDNA

1. 1µg RNA in einem Gesamtvolumen von 12,5µl RNase-freiem Wasser verdünnen
2. Je 1µl „Random hexamer primer“ (1:150) und 1µl dt Oligo (1:20) zugeben
3. Bei 70°C für 10min inkubieren
4. 2min auf Eis stellen, danach abzentrifugieren
5. Reversetranskriptase-Reaktion vorbereiten und hinzupipettieren:

Reagenz	Menge in µl
Reaktionspuffer 5x	4
dNTP Mix 10mM	1
RiboLock RNase-Inhibitor	0,5
RevertAid H Minus reverse Transkriptase	1

6. 10min Inkubation bei Raumtemperatur, 60min Transkriptionsphase bei 42°C, 5min RNA-Abbau bei 95°C

7. cDNA abzentrifugieren und bei mindestens -20°C lagern

Analyse der mRNA-Expression verschiedener Gene mittels qrtPCR

Zur Quantifizierung der Genexpression auf mRNA-Ebene wurde ein Roche LightCycler II mittels UPL System verwendet. Als Referenztranskript diente Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Pro Platte wurde jeweils ein Kalibrator eingesetzt, um die interexperimentelle Vergleichbarkeit sicherzustellen, sowie als Negativkontrolle destilliertes Wasser eingesetzt. Die Reaktionsansätze erfolgten jeweils im Duplikat. Eingesetzte Primer und UPL-Sonden sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Quantifizierung der mRNA-Expression mittel UPL und Roche LightCycler II:

1. Pro Transkript folgenden Reaktionsansatz vorbereiten:

Reagenz	Menge in µl
Gene Expression Mastermix Abi	10
ddH₂O	4,4
Rechter Primer (20µM)	0,2
Linker Primer (20µM)	0,2
UPL-Sonde	0,2

2. 15µl Reaktionsansatz in je eine der 96 Vertiefungen der bereitgestellten Mikrotiterplatte geben
3. 5µl cDNA (100ng/µl) zugeben
4. PCR nach mitgeliefertem Herstellerprotokoll „monocolour hydrolysis probe UPL“ im Modus „Relative Quantification“ durchführen

Tabelle 8: Primer und UPL-Sonden zur Bestimmung der mRNA-Genexpression mittels Roche LightCycler II.

Gen	UPL-Sonde	Primer rechts	Primer links
A4GALT(_004)	1	GGTATCCCCAGATCA- GACCA	GCAGTAGTACCAGT- CAGCGTCA
GCS	4	TTCAATCCAGAAT- GATCAGGTG	CATTCTGAAATT- GGCTCACAAA
HPRT	22	GACCAGTCAACAGGG- GACAT	GTGTCAATTATATCTT- CCACAATCAAG

Messung der Gb₃-, Hsp70- sowie Pgp-Oberflächenexpression mittels FACS (Durchflusszytometrie)

1. Zellen ernten (siehe oben) und je 2×10^5 in ein Eppendorfgefäß pipettieren
2. Je 1ml auf 4°C vorgekühlten FACS-Puffer (10% FCS in 90% PBS) hinzugeben
3. Bei 1500g und 4°C abzentrifugieren, Überstand verwerfen
4. Gekoppelte Antikörper bzw. BSA-Cy3 und StxB-Cy3 gemäß Tabelle 8 in PBS verdünnen
5. Je 5µl verdünnte Färbelösung auf das Zellpellet geben und vorsichtig auf- und abpipettieren zur Durchmischung
6. Eppendorfgefäße ferner zur weiteren Durchmischung auf einem Gitter entlangziehen (Vortexen könnte zu einer falsch hohen Anzahl toter Zellen führen)
7. Im Dunkeln 30min auf Eis inkubieren
8. 1ml FACS-Puffer zum Färbeansatz geben, danach bei 1500g und 4°C abzentrifugieren
9. Überstand verwerfen und in 500µl eisgekühltem FACS-Puffer resuspendieren
10. Suspension in ein Durchflusszytometriegefäß überführen, diese ebenfalls stets auf Eis lagern
11. 5µl 7-AAD-Lösung zugeben und für 30 min auf Eis inkubieren
12. Vitale Zellen mittels BD FACSCalibur und BD CellQuest Pro analysieren

Tabelle 9: Antikörper und Proteine zur durchflusszytometrischen Analyse lebender Zellen.

Antikörper bzw. Protein	Verdünnung in PBS	Kopplung	Spezies	Hersteller
cmHsp70.1	1:2	FITC	Maus	(Friedrich et al., 2010)
P-gp		PE	Maus	BD
BSA (10mg/ml)	1:300	Cy3	Rind	Nanocs
StxB (7mg/ml)	1:200	Cy3		Ludger Johannes
7-AAD	1:100	-	-	BD

Benutzung epigenetikmodifizierender Reagenzien in der Zellkultur

Valproat (M=166,19g/mol) wurde jeweils frisch pro Versuch in einer Endkonzentration von 100mM in PBS gelöst und in der Zellkultur sterilfiltriert. 5-Aza-2'desoxycytidin (M=228,21g/mol) wurde in DMSO in einer Endkonzentration von 1mM gelöst, aliquotiert und für weitere Versuche bei -80°C aufbewahrt. Dabei wurde ein Gefäß mit 5-Aza-2'desoxycytidin zur Vermeidung von lagerungsbedingter Wirkungsfluktuation jeweils nur einmalig benutzt.

Tabelle 10 zeigt eingesetzte epigenetische Reagenzien und deren Konzentration sowie Lösungsmittel.

Tabelle 10: Epigenetikmodifizierende Substanzen: Konzentrationen, Lösungsmittel, Wirkmechanismus.

Reagenz	Konzentration	Lösungsmittel	Wirkmechanismus	Hersteller
5-Aza-2'-desoxycytidin	1 μ M	DMSO	DNMT1-Inhibition	Sigma Aldrich
Valproat	1mM	PBS	HDAC Klasse I und IIa-Inhibition(H. J. Kim & Bae, 2011)	Sigma Aldrich
MS-275	5 μ M	Ethanol	Spezifische HDAC 1-3-Inhibition(H. J. Kim & Bae, 2011)	Sigma Aldrich
Trichostatin A	100nM	Ethanol	Unspezifische HDAC-Inhibition(H. J. Kim & Bae, 2011)	Sigma Aldrich
BIX01294	2 μ M	Ethanol	Histon-Methyltransferase-Inhibition	Sigma Aldrich

Fluorophorkopplung von rekombinant hergestelltem StxB

StxB-Cy3 wurde von unserem Kooperationspartner, der Johannes Arbeitsgruppe, wie beschrieben hergestellt (Janssen et al., 2006). Dabei wurde ein rekombinant hergestelltes und mit einem Cysteinrest versehenes sog. StxB-Cys verwendet. Das hergestellte StxB-Cy3 wurde für jede Charge einzeln für die Verwendung in Durchflusszytometrie, in-vivo-StxB-Aufnahme und Färbung fixierter Zellen und von Gefrierschnitten getestet und nur für erfolgreich durchgeführte Anwendungsbereiche verwendet.

StxB-TRITC:

1. 10-fach molarem Überschuss an NHS-Rhodamin zu StxB-Cys geben (StxB-Cys besitzt eine Masenkonzentration von 0,6mg/ml und damit eine Stoffmengenkonzentration von $7 \cdot 10^{-5}$ mol/l): pro 100µl StxB-Cys müssen 3,68 µl NHS-Rhodamin-Lösung der Konzentration 10mg/ml hinzugefügt werden
2. 1h Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss
3. Dialyse mittels Spectra/Por 3 Dialyseschlauch mit MWCO 3,5 kDa („molecular weight cut-off“: Molekularmasse, bei der 90% einer Substanz innerhalb der Membrangrenzen gehalten werden können) durchführen
 - a. Schlauch in gewünschter Länge zuschneiden
 - b. Schlauch mittels einer Klemme auf einer Seite abdichten
 - c. StxB-Cys/NHS-Rhodaminlösung in den Schlauch pipettieren
 - d. Luftbläschen austreiben und die andere Seite mittels einer Klemme abdichten
 - e. 2h bei 4°C unter Lichtabschluss und beständigem Rühren in moderater Geschwindigkeit mittels Magnetrührer in PBS geben zur Dialyse
 - f. PBS verwerfen und für 2h in 800ml PBS unter beständigem Rühren dialysieren
 - g. PBS verwerfen und über Nacht (14-18 Stunden) in 800ml PBS unter beständigem Rühren dialysieren
 - h. Gekoppeltes StxB-TRITC aus dem Schlauch in einzelne Gefäße aliquotieren und bei -20°C unter Lichtabschluss lagern

In-vivo-Aufnahme von StxB-Cy3 und Membranfärbung

1. 6-Vertiefungen-Mikrotiterplatte mit autoklaviertem Deckgläsern ausstatten
2. 2ml 0,1% Gelatine in PBS für 1h bei Raumtemperatur zur Beschichtung zugeben und danach absaugen
3. Zellen ernten, zählen und aussäen ($0,5-4 \times 10^5$) und für mindestens 12h bei 37°C inkubieren
4. BSA-Cy3 und StxB-Cy3 in Medium mit FCS verdünnen (Endkonzentration 10µg/ml), ggfs. auf Eis kühlen für Membranfärbung
5. Medium verwerfen; Membranfärbung: Zellen in Medium für 10min auf Eis kühlen
6. 500µl StxB-Cy3- bzw. BSA-Cy3-Lösung in die Vertiefung geben und für die gewünschte Zeitdauer bei 37°C inkubieren; für Membranfärbung: 15min auf Eis inkubieren

7. Dreimal Deckgläser mit PBS waschen
8. 10min mit 1ml 3% PFA fixieren; für Membranfärbung: 10min auf Eis mit 1ml 3% PFA fixieren
9. Dreimal Deckgläser mit PBS waschen
10. 50mM NH₄Cl in PBS für 20min auf die Deckgläser geben
11. Dreimal Deckgläser mit PBS waschen
12. 3min mit 0,1% Triton X-100 in PBS permeabilisieren
13. Dreimal Deckgläser mit PBS waschen
14. 20min mit 2% BSA in PBS blocken
15. Einen Tropfen (150µl) 1. Antikörper (Endkonzentrationen in Tabelle 11) in 2% BSA in PBS in feuchter Kammer auf Parafilm geben. Deckgläser umgedreht auf Tropfen legen und für 1h inkubieren
16. Dreimal Deckgläser mit PBS waschen
17. Einen Tropfen (150µl) 2. Antikörper (Endkonzentrationen in Tabelle 11) mit 300nM DAPI zur Kernfärbung in 2% BSA in PBS in feuchter Kammer auf Parafilm geben, Deckgläser umgedreht auf Tropfen legen und für 1h inkubieren
18. Dreimal Deckgläser mit PBS waschen
19. Deckgläschen mit erwärmter Glycerin-Gelatine-Lösung auf einem Objektträger mit der Zellseite nach unten fixieren und ggfs. den Deckglasrand zur Vermeidung von Austrocknung mit Nagellack bestreichen
20. Aufbewahrung der Objektträger bei 4°C

Färbung fixierter Zellen für Immunfluoreszenzmikroskopie

1. Deckgläser mit adhärenenten Zellen dreimal mit PBS waschen
2. 20min mit 3%PFA fixieren
3. Dreimal Deckgläser mit PBS waschen
4. 50mM NH₄Cl in PBS für 20min auf die Deckgläser geben
5. Dreimal Deckgläser mit PBS waschen
6. 20min mit 2% BSA in PBS blocken
7. Einen Tropfen (150µl) StxB-Cy3 bzw. BSA-Cy3 (Endkonzentrationen in Tabelle 11) in 2% BSA in PBS in feuchter Kammer auf Parafilm geben, Deckgläser umgedreht auf Tropfen legen und für 30min bis 1h inkubieren.
8. Dreimal Deckgläser mit PBS waschen

9. 3min mit 0,1% Triton X-100 in PBS permeabilisieren
10. Dreimal Deckgläser mit PBS waschen
11. Ein Tropfen (150µl) 1. Antikörper (Endkonzentrationen in Tabelle 11) in 2% BSA in PBS in feuchter Kammer auf Parafilm geben, Deckgläser umgedreht auf Tropfen legen und für 1h inkubieren.
12. Dreimal Deckgläser mit PBS waschen
13. Ein Tropfen (150µl) 2. Antikörper (Endkonzentrationen in Tabelle 11) mit 300nM DAPI zur Kernfärbung in 2% BSA in PBS in feuchter Kammer auf Parafilm geben, Deckgläser umgedreht auf Tropfen legen und für 1h inkubieren.
14. Dreimal Deckgläser mit PBS waschen
15. Deckgläschen mit erwärmter Glycerin-Gelatine-Lösung auf einem Objektträger mit der Zelleseite nach unten fixieren und ggfs. den Deckglasrand zur Vermeidung von Austrocknung mit Nagellack bestreichen
16. Aufbewahrung der Objektträger bei 4°C

Färbung von Gefrierschnitten für Immunfluoreszenzmikroskopie

1. Schnitte auf Objektträger mit Fettstift umranden
2. 20min mit 3%PFA fixieren
3. Dreimal Schnitte mit PBS waschen
4. 50mM NH₄Cl in PBS für 20min auf die Schnitte geben
5. Dreimal Schnitte mit PBS waschen
6. 20min mit 2% BSA in PBS blocken
7. Einen Tropfen (150µl) StxB-Cy3 bzw. BSA-Cy3 (Endkonzentrationen in Tabelle 11) in 2% BSA in PBS in feuchter Kammer auf die Schnitte geben und für 30min bis 1h inkubieren
8. Dreimal Schnitte mit PBS waschen
9. 3min mit 0,1% Triton X-100 in PBS permeabilisieren, Lösung abnehmen und Fettstiftrand bei Bedarf nachziehen
10. Dreimal Schnitte mit PBS waschen
11. Ein Tropfen (150µl) 1. Antikörper (Endkonzentrationen in Tabelle 11) in 2% BSA in PBS in feuchter Kammer auf die Schnitte geben und für 1h inkubieren
12. Dreimal Schnitte mit PBS waschen

13. Ein Tropfen (150µl) 2. Antikörper (Endkonzentrationen in Tabelle 11) mit 300nM DAPI zur Kernfärbung in 2% BSA in PBS in feuchter Kammer in 2% BSA in PBS in feuchter Kammer auf die Schnitte geben und für 1h inkubieren
14. Dreimal Schnitte mit PBS waschen
15. Deckgläschen ausreichender Größe mit erwärmter Glycerin-Gelatine-Lösung auf den Schnitten fixieren und ggfs. den Deckglasrand zur Vermeidung von Austrocknung mit Nagellack bestreichen
16. Aufbewahrung der Objektträger bei 4°C

Schnellprotokoll für die Gb₃-Detektion mittels StxB-Cy3 auf Zellen und Gefrierschnitten in Immunfluoreszenz

1. Schnitte auf Objektträger mit Fettstift umranden bzw. Zellen dreimal mit PBS waschen
2. 10min mit 3%PFA fixieren
3. Dreimal Schnitte bzw. Zellen mit PBS waschen
4. 50mM NH₄Cl in PBS für 10min auf die Schnitte geben
5. Dreimal Schnitte bzw. Zellen mit PBS waschen
6. Einen Tropfen (150µl) StxB-Cy3 bzw. BSA-Cy3 (Endkonzentrationen in Tabelle 11) sowie 300nM DAPI in 2% BSA in PBS in feuchter Kammer auf die Schnitte bzw. Zellen geben und für 15min inkubieren.
7. Dreimal Schnitte bzw. Zellen mit PBS waschen
8. Für Gefrierschnitte: Deckgläschen ausreichender Größe mit erwärmter Glycerin-Gelatine-Lösung auf den Schnitten fixieren und ggfs. den Deckglasrand zur Vermeidung von Austrocknung mit Nagellack bestreichen
bzw.:
Für Zellen: Deckgläschen mit erwärmter Glycerin-Gelatine-Lösung auf einem Objektträger mit der Zellseite nach unten fixieren und ggfs. den Deckglasrand zur Vermeidung von Austrocknung mit Nagellack bestreichen
9. Aufbewahrung der Objektträger bei 4°C

Tabelle 11: Antikörper und Bindeproteine für Immunfluoreszenzmikroskopie.

Antikörper bzw. Protein	Verdünnung	Klonalität	Spezies	Hersteller
Anti-EpCAM (Ber-EP4)	1:200	monoklonal	Maus, IgG1	Invitrogen
Anti-von-Willebrand-Faktor	1:300	monoklonal	Maus, IgG1	Invitrogen
Anti-Golgin-97 (CDF4)	1:100	monoklonal	Maus, IgG1	Invitrogen
BSA-Cy3 (10mg/ml)	1:1000	-	Rind	Nanocs
StxB-Cy3 (7mg/ml)	1:700	-	<i>E. coli</i>	Ludger Johannes
Anti-Maus-A488	1:300	polyklonal	Ziege	Jackson ImmunoResearch

Extraktion genomischer DNA aus Zellen mittels des Qiagen Blood & Tissue Kit

1. Zellen ernten, zählen und 5×10^6 Zellen für 5min in einem 1,5ml Eppendorfgefäß bei 540g zentrifugieren, Medium abnehmen
2. Zellen in 200µl PBS resuspendieren und 20µl Proteinase K hinzupipettieren
3. 200µl Puffer AL hinzugeben und vortexen
4. 200µl Ethanol (96%) hinzugeben und vortexen
5. Suspension in die in dem 2ml Sammelgefäß platzierte DNeasy Mini-Säule pipettieren und bei 6000g für 1min zentrifugieren, Flüssigkeit und Sammelgefäß verwerfen
6. DNeasy Mini-Säule in ein neues 2ml Sammelgefäß stellen und 500µl Puffer AW1 hinzugeben, für 1min bei 6000g zentrifugieren, Flüssigkeit und Sammelgefäß verwerfen
7. DNeasy Mini-Säule in ein neues 2ml Sammelgefäß stellen und 500µl Puffer A2 hinzugeben, für 1min bei 6000g zentrifugieren, Flüssigkeit und Sammelgefäß verwerfen
8. DNeasy Mini-Säule in ein neues, DNase-freies 1,5ml Eppendorfgefäß platzieren und 200µl AE Puffer auf die Membran pipettieren, für 1min bei Raumtemperatur inkubieren
9. Für 1min bei 6000g zentrifugieren

10. Gegebenenfalls gelöste DNA zur Konzentrationserhöhung nochmals auf die Säule pipettieren und für 1min bei 6000g zentrifugieren
11. DNA-Gehalt mittels NanoDrop spektrophotometrisch quantifizieren und DNA bei -20°C aufbewahren

Herstellung eines Agarosegels zur Gelelektrophorese eines PCR Produktes

1. 100ml 1x TAE und gewünschte Menge an Agarose in der Mikrowelle aufkochen lassen
2. Gel leicht abkühlen lassen
3. 3µl 1:10 verdünntes Ethidiumbromid hinzupipettieren
4. Das Gel in eine Gelkammer mit Kamm füllen und erkalten lassen

Extraktion von DNA-Banden mittels QIAquick Gelextraktionskit

1. 2% Agarosegel herstellen
2. PCR durchführen und 50 bis 100µl PCR-Produkt in eine Geltasche mit Loading Buffer füllen, in die übernächste Tasche eine geeignete DNA-Leiter zur Größenkontrolle gemäß Herstellerangaben pipettieren
3. Gelelektrophorese bei 90V durchführen
4. Banden mittels UV-Lampe visualisieren, dabei Schutzbrille und Schutzkleidung tragen und mit Skalpell die gewünschten Banden ausschneiden
5. Die Gelfragmente wiegen, in einer Säule dürfen maximal 400mg Gel verarbeitet werden
6. Das sechsfache Volumen Puffer QG hinzufügen (100mg Gel entsprechen 100µl)
7. Bei 50°C für 10min oder bis zur vollständigen Auflösung inkubieren, dabei alle 2 bis 3 Minuten vortexen,
 - a. wenn die Lösung nach Inkubation wieder gelb erscheint, kann mit dem nächsten Schritt fortgefahren werden
 - b. sofern die Farbe orange oder violett erscheint, 10µl 3M Natriumacetat hinzufügen, danach erscheint die Lösung gelb
8. Ein Gelvolumen Isopropanol hinzufügen und mittels auf- und abpipettieren mischen
9. QIAquick Säule in ein 2ml Sammelgefäß stellen und jeweils 800µl der Lösung in die Säule pipettieren, bei 12.000g für 1min zentrifugieren und Flüssigkeit verwerfen
10. Schritt 9 wiederholen, bis die gesamte Lösung abzentrifugiert wurde

11. 500µl Puffer QG auf die Säule pipettieren, bei 12.000g für 1min zentrifugieren und Flüssigkeit verwerfen
12. Puffer PE bei Bedarf gemäß Gefäßbeschriftung mit 96% Ethanol ansetzen, 750µl Puffer PE auf die Säule pipettieren und 5min inkubieren
13. Bei 12.000g für 1min zentrifugieren und Flüssigkeit verwerfen
14. Säule in ein neues 2ml Sammelgefäß stellen und bei 12.000g für 1min abzentrifugieren, um verbliebene Flüssigkeit zu entfernen
15. Säule in ein 1,5ml Eppendorfgefäß stellen und 50µl Puffer EB direkt auf die Membran pipettieren
16. 5min inkubieren und bei 12.000g abzentrifugieren, DNA bei -20°C aufbewahren

Bisulfitkonversion mittels des Qiagen EpiTect Fast Kits

Es wurden das Qiagen EpiTect Fast Kit und das Qiagen EpiTect LyseAll Kit verglichen. Dabei lieferte nur ersteres ausreichend reine bisulfitkonvertierte DNA, die der PCR-Amplifikation und Sequenzierung valide zugänglich waren.

1. Bisulfitreagenzien und DNA in einem 200µl PCR-Gefäß vorbereiten:
 - a. 1µg DNA in einem Gesamtvolumen von 20µl mit DNase- und RNase-freiem ddH₂O verdünnen
 - b. 85µl Bisulfit-Lösung zugeben. Die Bisulfit-Lösung muss vollständig gelöst sein. Ist dies nicht der Fall, Bisulfit-Lösung bei 60°C mittels Vortex vollständig lösen.
 - c. 35µl DNA Protect Puffer zugeben
2. Die Lösung ausgiebig mischen
3. Reaktionsansatz im Thermocycler mit folgenden Bedingungen Bisulfit-konvertieren:
 - a. Denaturierung für 5min bei 95°C
 - b. Inkubation für 10min bei 60°C
 - c. Denaturierung für 5min bei 95°C
 - d. Inkubation für 10min bei 60°C
 - e. Abkühlen auf 20°C
4. Die PCR-Gefäße bei 10.000g für 1min abzentrifugieren und Inhalt in ein 1,5ml Eppendorfgefäß geben.

5. 310µl Puffer BL hinzugeben und vortexen
6. 250µl Ethanol (96%) hinzugeben und für 15s vortexen sowie 1min bei 10.000g abzentrifugieren
7. MiniElute DNA Säulen in einen Reaktionsgefäßständer platzieren und gesamte Lösung auf die Membran pipettieren
8. Säulen für 1min bei 10.000g zentrifugieren und Flüssigkeit verwerfen
9. Puffer BW ansetzen (30ml Ethanol in Puffergrundlösung), 500µl Puffer BW auf die Membran pipettieren und für 1 min zentrifugieren, Flüssigkeit verwerfen
10. Puffer BD ansetzen (27ml Ethanol in Puffergrundlösung), 500µl Puffer BD auf die Säulen pipettieren, Deckel schließen und für 15min bei Raumtemperatur inkubieren, Puffer BD stets verschlossen halten, um die Oxidierung am Luftsauerstoff zu verhindern.
11. Säulen für 1min bei 10.000g zentrifugieren und Flüssigkeit verwerfen
12. 500µl Puffer BW auf die Membran pipettieren und für 1min bei 10.000g zentrifugieren, Flüssigkeit verwerfen
13. Schritt 12 einmalig wiederholen
14. 250µl Ethanol (96%) auf die Membran pipettieren und für 1min bei 10.000g zentrifugieren, Flüssigkeit verwerfen
15. Säulen in ein neues 2ml Aufnahmegefäß stellen und für 1min bei 10.000g zentrifugieren
16. Säule in ein neues, DNase- und RNase-freies 1,5ml Eppendorfgefäß stellen und 15µl Puffer EB direkt auf die Membran geben, Deckel der Säulen verschließen
17. Ansatz 1min bei Raumtemperatur inkubieren, zur Elution der bisulfitkonvertierten DNA 1min bei 10.000g zentrifugieren
18. Konvertierte DNA bei -20°C aufbewahren

Bisulfitmodifizierte DNA Sequenzierung

Bei der Bisulfitsequenzierung ist es von essentieller Bedeutung, eine DNA-Polymerase zu verwenden, die die durch Bisulfitkonversion entstandenen Uracilbasen der DNA toleriert. Wenn das TOPO TA Cloning Kit pCR2.1 verwendet werden soll, so muss eine Taq-basierte Polymerase verwendet werden, die zusätzliche Adenosintriphosphatreste an die amplifizierte Sequenz anhängt und so die notwendige Energie für die Ligation des Plasmids bereitstellt. Da die DNA nach Bisulfitkonversion im Wesentlichen nur noch aus drei verschiedenen abgelesenen Basen besteht, ist das Risiko unspezifischer Amplifizierung außerhalb der Zielregion deutlich erhöht, insbesondere, wenn keine Hotstart-Polymerase eingesetzt wird. Aus diesem Grund

verwendeten wir die Qiagen HotStarTaq DNA Polymerase, die bei niedrigen Temperaturen durch ein Aptamer inhibiert wird.

1. PCR-Reaktion vorbereiten, Primer wurden mit der Software Methprimer erstellt(Li & Dahiya, 2002) und finden sich in Tabelle 12:

Reagenz	Menge in μl
Bisulfitkonvertierte DNA	2
HotStarPuffer mit 1,5mM MgCl₂	2,5
dNTPs (5mM)	1
MgCl₂ (25mM)	1
Primer rechts (25μM)	1
Primer links (25μM)	1
HotStarTaq	0,25
ddH₂O	16,25

2. Thermocycler programmieren: 300s Denaturierung bei 94°C, 35 Zyklen mit 45s Denaturierung bei 94°C, 45s 58°C Hybridisierung, 90s 72°C Extension und abschließend einmalig 600s bei 72°C finale Extension
3. 5 μl des PCR Produktes auf Elektrophoresegel mit 2% Agar auftragen, bei 130V laufen lassen und nach 45min überprüfen, ob eine eindeutige Bande auf dem Gel unter UV-Licht zu sehen ist
4. Sofern eine Bande detektiert wurde, PCR-Produkt unverzüglich in den TOPO TA Cloning pCR2.1-Vektor ligieren:
 - a. Folgende Komponenten vorsichtig mischen:

Reagenz	Menge in μl
PCR-Produkt	2
Salz-Lösung	1
ddH₂O	2
TOPO-Vektor	1
Gesamtvolumen	6

- b. 10min bei Raumtemperatur inkubieren, danach auf Eis bzw. bei -20°C lagern

5. Den TOPO-Vektor in chemisch kompetente TOP10 *E. coli* Bakterien transformieren
 - a. Wasserbad auf 42°C vorheizen
 - b. SOC Medium auf Raumtemperatur erwärmen
 - c. 20µl X-Gal (40mg/ml) sowie 40µl IPTG (100mM) auf LB-Platten mit 100µg/ml Ampicillin ausstreichen und diese auf 37°C erwärmen
 - d. 20µl chemisch kompetente TOP10 *E. coli* Bakterien in einem 1,5ml Eppendorfgefäß auf Eis auftauen
 - e. 2µl des ligierten TOPO-Konstrukts in die Bakterien pipettieren, sanft mischen und die Bakterien wieder auf Eis stellen
 - f. 30min auf Eis inkubieren
 - g. Zum Hitzeschock die Bakterien in das 42°C warme Wasserbad für 30s geben, danach Bakterien für 2min auf Eis stellen
 - h. 250µl SOC Medium zu den Bakterien pipettieren und für 1h bei 37°C inkubieren
 - i. 100µl Transformationsansatz auf die mit X-Gal und IPTG bestrichene LB Platte mit 100µg/ml Ampicillin ausbringen und über Nacht (14-18h) bei 37°C inkubieren
 - j. 20 einzelne Kolonien mit einer Pipettenspitze aufnehmen und jede Spitze in ein verschließbares Gefäß mit 3ml LB Medium und 100µg/ml Ampicillin abwerfen
 - k. Gefäße über Nacht (14-18h) bei 37°C inkubieren und die Plasmide mittels Qiagen MiniPrep gemäß beschriebener Anleitung isolieren
 - l. Klonierung mittels EcoRI-Restriktionsverdau durch Mischung folgender Reagenzien überprüfen:

Reagenz	Menge in µl
Plasmid	2
FastDigest Green Puffer	2
FastDigest EcoRI Enzym	1
ddH ₂ O	15
Gesamtvolumen	20

- m. Den Restriktionsverdau im Heizblock für 10min bei 37°C durchführen
- n. Geschnittenes Plasmid auf Elektrophoresegel mit 2% Agar auftragen, bei 130V laufen lassen und nach 45min überprüfen, ob eine Bande der gesuchten Größe auf dem Gel unter UV-Licht zu sehen ist

- o. Sofern eine Bande entsprechender Größe vorhanden ist, Plasmid auf 75ng/μl in DNase-freiem Wasser verdünnen und 15μl in ein Safe-Lock Eppendorfgefäß pipettieren
- p. Auf der Onlinemaske von Eurofins Genomics die Etikettnummer eingeben und als Sequenzierprimer T7 sowie M13rev auswählen
- q. Gefäß in einem luftgepolsterten Umschlag zum Sequenzieren einsenden
- r. Produktsequenz und von Methprimer vorhergesagte Sequenz vergleichen: Unmethylierte Cytosinreste werden zu Uracil umgewandelt und bei der Sequenzierung wegen der Basenpaarung an Adenin als Thymin abgelesen, während methylierte Cytosinreste weiterhin als Cytosin abgelesen werden
- s. Methylierte und unmethylierte Cytosinreste innerhalb von CpG-Inseln können danach graphisch dargestellt werden

Tabelle 12: Primer zur Bisulfitsequenzierung der A4GALT-Region.

CpG-Sequenz	Primer links	Primer rechts
CpG_1a	TTTTTAAAGTGTTGGGAT- TATAGG	AACCTAACCA- ACATAATAAAACCTC
CpG_1b	TTGGAGTGTAGTGG- TATAATTTGGTT	ACCTTCCCTAAAAAATT- CTCAAT
CpG_2	ATAAAACACCACTT- CTTAAAAACCC	GTTGGGAGTTTTATTTGTT- GTT

Extraktion von Plasmid-DNA mittels Qiagen QIAprep Spin MiniPrep Kit

1. 5ml über Nacht kultivierte Bakteriensuspension bei 10.000g für 5 min abzentrifugieren, Puffer verwerfen
2. Falls nötig, RNase A nach Gefäßbeschriftung zu Puffer P1 hinzufügen und mischen, Bakterienpellet in 250μl Puffer P1 resuspendieren und in ein 1,5ml Eppendorfgefäß geben
3. 250μl Puffer P2 hinzufügen und durch vier- bis sechsmaliges Invertieren mischen bis die Lösung klar erscheint, die Reaktion darf maximal 5min stattfinden, längere Inkubationsdauer kann das Ergebnis verschlechtern

4. 350µl Puffer N3 hinzufügen und unverzüglich durch vier- bis sechsmaliges Invertieren mischen
5. 10min bei 10.000g zentrifugieren
6. Den Überstand auf die QIAprep-Säule pipettieren und bei 10.000g für 1min zentrifugieren, Flüssigkeit verwerfen
7. 0,5ml Puffer PB auf die Säule pipettieren und bei 10.000g für 1min zentrifugieren, Flüssigkeit verwerfen
8. Falls nötig, Puffer PE mit 96% Ethanol gemäß Gefäßbeschriftung vorbereiten, 0,75ml Puffer PE auf die Säule pipettieren
9. Bei 10.000g zentrifugieren und Flüssigkeit verwerfen
10. Säule in ein neues 2ml Sammelgefäß stellen und einmalig bei 10.000g für 1min abzentrifugieren
11. Säule in ein DNase-freies 1,5ml Eppendorfgefäß stellen, 50µl Puffer EB direkt auf die Membran pipettieren und 1min inkubieren
12. Bei 10.000g für 1min zentrifugieren, Säule verwerfen
13. Plasmid-Gehalt mittels NanoDrop bestimmen und Plasmid bei -20°C aufbewahren

Aufreinigung bakterieller Holotoxine Stx1 und Stx2

Die Aufreinigung von Stx1 und Stx2 wurde von unseren Kooperationspartnern der Arbeitsgruppen von Professor Dreisewerd und Professor Müthing aus Münster aus pathogenen Bakterienisolaten durchgeführt. Die aufgereinigten Toxine waren vollständig pyrogen- und LPS-frei.

XTT-Zellproliferationstest

1. Zellen ernten und zählen wie beschrieben
2. 2000 Zellen jeweils im Triplikat auf zwei individuellen Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen in 100µl Medium mit FCS ausbringen; je Platte drei Vertiefungen mit 100µl Medium zur Leerwertbestimmung füllen
3. Nach 16h XTT-Lösung vorbereiten: XTT Markierungslösung und Elektronenkopplungsreagenz im Wasserbad auf 37°C erwärmen; 5ml XTT Markierungslösung und 100µl Elektronenkopplungsreagenz vermischen

4. Je 50µl der XTT-Lösung mit einer Mehrfachpipette in die Vertiefungen einer der beiden Platten pipettieren und Platte bei 37°C inkubieren
5. Messung der Absorption mittels des Mithras LB 940 bei 450-500nm nach 4h
6. Nach weiteren 48h XTT-Lösung vorbereiten: XTT Markierungslösung und Elektronenkopplungsreagenz im Wasserbad auf 37°C erwärmen; 5ml XTT Markierungslösung und 100µl Elektronenkopplungsreagenz vermischen
7. Je 50µl der XTT-Lösung mit einer Mehrfachpipette in die Vertiefungen der zweiten Platten pipettieren und Platte bei 37°C inkubieren
8. Messung der Absorption mittels des Mithras LB 940 bei 450-500nm nach 4h
9. Relative Proliferation entspricht der Differenz aus gemessenem Wert und Leerwert der zweiten Platte dividiert durch dieselben Parameter der ersten Platte

XTT-Zytotoxizitätstest

1. Zellen ernten und zählen wie beschrieben, Zellen auf 10.000 Zellen/ml in Medium mit FCS verdünnen
2. Je 100µl der Zellsuspension (entsprechend 1000 Zellen) pro Vertiefung einer 96er Mikrotiterplatte mit einer Mehrfachpipette ausbringen, in drei Vertiefungen Medium mit FCS zur Leerwertbestimmung geben
3. Über Nacht (ca. 14-18h) bei 37°C inkubieren
4. Auf Zytotoxizität zu überprüfende Substanz (Tabelle 13) in Medium mit FCS verdünnen und eine geeignete Verdünnungsreihe herstellen
5. Medium von den Zellen mit einer Mehrfachpipette absaugen, Zellen nicht eintrocknen lassen
6. 100µl Medium mit zu überprüfender Substanz verschiedener Konzentrationen vorsichtig auf die Zellen geben
7. 20h bei 37°C inkubieren
8. Medium mit der zu überprüfenden Substanz mit einer Mehrfachpipette absaugen und durch normales Wachstumsmedium ersetzen (Leerwert-Vertiefungen nicht vergessen)
9. Weitere 4d bei 37°C inkubieren
10. XTT-Lösung vorbereiten: XTT Markierungslösung und Elektronenkopplungsreagenz im Wasserbad auf 37°C erwärmen; 5ml XTT Markierungslösung und 100µl Elektronenkopplungsreagenz vermischen

11. Je 50µl der XTT-Lösung mit einer Mehrfachpipette in die Vertiefungen der Platte pipettieren und Platte bei 37°C inkubieren
12. Messung der Absorption mittels des Mithras LB 940 bei 450-500nm nach 2h
13. Zytotoxizität entspricht der Differenz aus gemessenem Wert und Leerwert der Probe, die mit einer bestimmten Konzentration der Testsubstanz behandelt wurde, dividiert durch Differenz aus gemessenem Wert und Leerwert der unbehandelten Probe

Test auf klonogenes Überleben

1. Zellen ernten und zählen wie beschrieben, je 5×10^5 pro Vertiefung einer 6er Mikrotiterplatte in 3ml Medium mit FCS ausbringen
2. Über Nacht (ca. 14-18h) bei 37°C inkubieren
3. Auf klonogenes Überleben zu überprüfende Substanz Tabelle 13) in Medium mit FCS in gewünschter Konzentration verdünnen
4. Je 500µl Medium mit zu überprüfende Substanz verschiedener Konzentrationen bzw. Medium mit FCS ohne weitere Substanz zugeben
5. Für 20h bei 37°C inkubieren
6. Zellen mit 1ml Trypsin ablösen und in 3ml Medium mit FCS aufnehmen, gut durch auf- und abpipettieren vereinzeln und je in ein beschriftetes 15ml Falcon füllen
7. Bei 540g abzentrifugieren, Überstand verwerfen und in 10 ml Medium mit FCS resuspendieren
8. Ermittlung der Zellkonzentration der unbehandelten Zellen
9. Aussaat der Zellen:
 - a. In einer 10cm Zellkulturschale: Von der Konzentration der unbehandelten Kontrolle ausgehend werden jeweils 100 Zellen in 10ml Medium im Triplikate auf 10cm Platten aussäen
 - i. bzw.:
 - b. In einer Vertiefung einer 6er Mikrotiterplatte: Von der Konzentration der unbehandelten Kontrolle ausgehend werden jeweils 20 Zellen in 3ml Medium im Triplikate in jede Vertiefung gesät
10. Inkubation für 15 Tage bei 37°C
11. Medium verwerfen und Zellen einmalig mit PBS waschen
12. 5min mit 2ml (10cm Platte) bzw. 1ml (Mikrotiterplatte) 3% PFA fixieren
13. Dreimal fixierte Zellen mit Leitungswasser waschen

14. 3ml (10cm Platte) bzw. 1ml (Mikrotiterplatte) 0,1% Kristallviolett in PBS zugeben und für 30min bei Raumtemperatur inkubieren
15. Dreimal mit Leitungswasser waschen
16. Schalen auf einem Zellfasertuch etwas trocknen lassen
17. Kolonien mittels eines Zählstiftes auszählen
18. Relatives klonogenes Überleben entspricht dem Mittelwert der Kolonien der behandelten Probe dividiert durch den Mittelwert der unbehandelten Probe

Tabelle 13: Zytotoxische Substanzen zum Einsatz in Viabilitätstests und zur Überprüfung des klonogenen Überlebens.

Substanzen	Molare Masse in g/mol	Wirkmechanismus	Hersteller
5-Fluorouracil (5-FU)	130,1	Irreversible Thymidilatsynthase-Inhibition	Apotheke Mri
StxB-MMAE	8600 (Monomer)	Gb ₃ -Bindung und Tubulinpolymerisationshemmung(Battisse et al., 2015)	Ludger Johannes
Stx1a	70500 (Müthing et al., 2009)	Gb ₃ -Bindung und u.a. Proteinbiosyntheseinhibition	Johannes Müthing
Stx2a	70500 (Müthing et al., 2009)	Gb ₃ -Bindung und u.a. Proteinbiosyntheseinhibition	Johannes Müthing

Adhäsionsunabhängiges Zellwachstum („Soft Agar Assay“)

1. 0,6% Agaroselösung herstellen: 0,12g Agarose abwiegen und zu 20ml Medium in einem 50ml Zentrifugiergefäß geben
2. Lösung in der Mikrowelle aufkochen, dabei das Zentrifugiergefäß in ein Becherglas stellen und den Deckel zum Druckausgleich lediglich aufsetzen

3. Unter Vortexen in der Sterilkultur 2ml Serum (10%), 200µl Penicillin/Streptomycin (1%) und 200µl Glutamin (1%) zugeben
4. 500µl Soft Agar in jede Vertiefung einer 12er Mikrotiterplatte pipettieren und bei 37°C für 30min abkühlen lassen, den Rest des Soft Agar bei 42°C im Wasserbad aufbewahren
5. 2500 Zellen sollen pro Well ausgesät werden, indem zunächst die Zellen geerntet, gezählt und danach zu einer Konzentration von 15.000 Zellen/ml in Medium mit 10% FCS verdünnt werden
6. 1ml dieser Zellsuspension mit 2ml der im Wasserbad gehaltenen Agarlösung vermischen und 0,5ml davon in jede der zuvor bei 37°C beschichteten Vertiefungen gegeben
7. Über Nacht (14-18h) inkubieren und 500µl Medium mit FCS zugeben, dieses alle zwei bis drei Tage wechseln
8. 2 Wochen bei 37°C kultivieren
9. Unter 50-facher Vergrößerung an einem Zellkulturmikroskop die angewachsenen Kolonien einer repräsentativen Ebene in mindestens fünf Gesichtsfeldern auszählen

Transwell Migrationstest

Die Transwell Migrationstests wurden zum Teil von Herrn Christoph Barz durchgeführt.

1. In einer Mikrotiterplatte mit 24 Vertiefungen 600µl Medium mit 10% FCS vorlegen und das Kunststoffinsert mit 8µm Poren hineinstellen
2. 100µl Medium mit 10% FCS in das Insert pipettieren
3. 1h bei 37°C inkubieren
4. Zellen ernten, zählen und 1×10^6 in 5ml PBS waschen
5. Zellen bei 540g abzentrifugieren
6. PBS-Überstand verwerfen und in 1ml Medium ohne FCS resuspendieren
7. Insert an der Ober- und Unterseite einmalig mit PBS waschen
8. PBS in der Vertiefung und im Insert absaugen ohne die Membran zu beschädigen
9. 600µl Medium mit 10% FCS in eine neue, unbenutzte Vertiefung geben
10. Insert in das vorgelegte Medium legen
11. 100µl Zellsuspension (entspricht 1×10^5 Zellen) oben in das Insert geben
12. 24h bei 37°C inkubieren
13. Zweimal mit PBS Ober- und Unterseite des Inserts waschen

14. 600µl 3% PFA in eine neue, unbenutzte Vertiefung geben, Insert in die Vertiefung legen und 100µl 3% PFA in das Insert pipettieren
15. 20min bei Raumtemperatur inkubieren
16. Insert auf der Ober- und Unterseite zweimal mit PBS waschen
17. Mit einem mit PBS angefeuchteten Wattestäbchen drei- bis viermal die obere Seite der Membran von den Zellen reinigen
18. Insert auf der Ober- und Unterseite zweimal mit PBS waschen
19. Einen Tropfen 300nM DAPI in 2% BSA/PBS auf einen Parafilm in eine feuchte Kammer pipettieren und Insert auf den Tropfen stellen
20. 10min bei Raumtemperatur inkubieren
21. Insert auf der Ober- und Unterseite zweimal mit PBS waschen
22. Aufnahmen werden an einem Immunfluoreszenzmikroskop bei 100-facher Auflösung angefertigt, wobei das Insert auf einen Objektträger gestellt wird
23. Fünf bis acht repräsentative Aufnahmen aus dem Zentrum des Inserts machen (am Rand können nicht abgelöste Zellen von der Oberseite eine falsch hohe Zahl an hindurchgewanderten Zellen vortäuschen)
24. Hindurchgewanderte Zellen pro Aufnahme mit der AxioVision Software zählen und den Mittelwert pro Aufnahme bestimmen

Matrigelinvasionstest

Die Versuche zum Matrigelinvasionstest wurden von Herrn Christoph Barz durchgeführt.

1. Die bei -20°C gelagerten Matrigelinvasionskammern auf Raumtemperatur erwärmen
2. 700µl Medium mit 10% FCS in eine Vertiefung einer 24er Mikrotiterplatte geben und die Kammer in das Medium stellen
3. 500µl Medium mit 10% FCS in die Kammer geben
4. 2h bei 37°C inkubieren
5. Zellen ernten, zählen und 1×10^6 in 5ml PBS waschen
6. Zellen bei 540g abzentrifugieren
7. PBS-Überstand verwerfen und in 1ml Medium ohne FCS resuspendieren
8. Das Medium in den Kammern nach 2h absaugen, dabei die Membran nicht berühren
9. Die Kammern einmalig mit PBS waschen und in eine neue Vertiefung mit 700µl Medium mit 10% FCS stellen

10. 200µl der Zellsuspension (entspricht 2×10^5 Zellen) und 300µl Medium ohne FCS mischen und in das Insert pipettieren
11. Für 48h bei 37°C inkubieren
12. Kammer zweimal vorsichtig auf Ober- und Unterseite mit PBS waschen
13. 700µl 3% PFA in eine neue Vertiefung pipettieren, Kammer hineinstellen, 500µl 3% PFA in die Kammer pipettieren und für 20min inkubieren
14. Kammer zweimal vorsichtig auf Ober- und Unterseite mit PBS waschen
15. Mit einem mit PBS angefeuchteten Wattestäbchen drei- bis viermal die obere Seite der Membran von den Zellen reinigen
16. Die Kammer zweimal vorsichtig auf Ober- und Unterseite mit PBS waschen
17. Einen Tropfen 300nM DAPI in 2% BSA/PBS auf einen Parafilm in eine feuchte Kammer pipettieren und die Kammer auf den Tropfen stellen
18. 10min bei Raumtemperatur inkubieren
19. Die Kammer zweimal vorsichtig auf der Ober- und der Unterseite mit PBS waschen
20. Aufnahmen werden an einem Immunfluoreszenzmikroskop bei 100-facher Auflösung angefertigt, wobei die Kammer auf einen Objektträger gestellt wird
21. Fünf bis acht repräsentative Aufnahmen aus dem Zentrum der Kammer machen (am Rand können nicht abgelöste Zellen von der Oberseite eine falsch hohe Zahl an in die Matrix eingedrungene Zellen vortäuschen)
22. In die Matrix eingedrungene Zellen pro Aufnahme mit der AxioVision Software zählen und den Mittelwert pro Aufnahme bestimmen

2D-Zellmigrationstest („Wundheilungstest“) mittels standardisierter Zellkulturkammern

Die Versuche zum Wundheilungstest wurden von Herrn Christoph Barz durchgeführt.

1. Zellen ernten, zählen und 3×10^6 auf einer 10cm Platte ausbringen
2. Wundheilungskammern in beiden Vertiefungen mit 60µl Fibronectin der Konzentration 50µg/ml in destilliertem, sterilem Wasser beschichten
3. Über Nacht (14-18h) bei 37°C inkubieren
4. In das Zellkulturmedium Mitomycin C zur Teilungsinhibition in einer Endkonzentration von 0,625µg/ml geben (bei einer Ausgangskonzentration der Mitomycin C-Lösung von 100µg/ml entspricht das 62,5µl pro 10ml Zellkulturmedium)
5. Für 2,5h bei 37°C inkubieren

6. Zellen ernten, zählen und 1×10^6 Zellen in 5ml PBS waschen
7. Zellen bei 540g abzentrifugieren
8. PBS-Überstand verwerfen und in 1ml Medium mit 7% FCS resuspendieren
9. Fibronektin aus den beiden Vertiefungen absaugen
10. Jeweils 100 μ l Zellsuspension (entspricht 1×10^5 Zellen) in jeder der beiden Vertiefungen ausbringen
11. 1ml Medium mit 7% FCS in den Bereich um die Vertiefungen pipettieren
12. Über Nacht (14-18h) bei 37°C inkubieren
13. Inkubationskammern mit einer sterilen Pinzette von der Platte entfernen
14. Platte einmalig mit Medium ohne FCS waschen und 1,5ml Medium mit 7% FCS auf die Platte geben
15. Zellmigration nach 0, 2, 4, 19, 21 und 24h bei 100-facher Vergrößerung am Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit der AxioCam MRm CCD Kamera erfassen und den kleinsten und größten Abstand zwischen den beiden Zellfronten mittels der AxioVision-Software abmessen, den Mittelwert aus diesen Messungen bilden

Generierung eines genetischen A4GALT-Defizienzmodells mittel CRISPR/Cas9

Das CRISPR/Cas9-System wurde nach dem Protokoll des Feng Zhang Labors etabliert und mittels des Plasmids pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (Addgene-Plasmid Nr. 62988), einem Geschenk von Feng Zhang, durchgeführt.(Ran et al., 2013)

1. Die gewünschte kodierende DNA-Region im Ensembl genome browser 90 auswählen, diese sollte
 - a. Möglichst nah am Transkriptionsstart liegen, um Restaktivität des Genprodukts zu vermeiden
 - b. Auf einem gemeinsamen Exon aller exprimierten Transkripte liegen
2. Für die gewünschte Region auf der CRISPR Design Website 20bp lange sgRNAs erstellen(Zhang, 2015), die eine geringe Wahrscheinlichkeit aufweisen, auch außerhalb der gewünschten Region einen Doppelstrangbruch herbeizuführen, dabei werden kodierende Regionen stärker gewichtet als nicht kodierende
3. Drei der sgRNAs auswählen
4. Oligodesoxynukleotide konstruieren und bestellen, die in das Cas9-Plasmid kloniert werden können:

- a. Die Sequenz, die in den oberen Strang kloniert werden muss, entspricht der genomischen Sequenz, in der der Doppelstrangbruch ausgelöst werden soll
- b. Sofern diese Sequenz nicht mit einem G beginnt, muss ein G als erste von dann 21 Basen angehängt werden, damit die sgRNA adäquat unter dem U6-Promotor exprimiert wird, dies beeinflusst die Effizienz des Systems nicht
- c. An die Sequenz für den oberen Strang muss ein 5'-CACC-3'-Überhang für die BbsI-Schnittstelle des Cas9-Plasmids gemäß Abbildung 3 angehängt werden
- d. Eine zur gRNA komplementäre Sequenz mit 5'-AAAC-3'-Überhang muss gemäß Abbildung 3 ebenfalls erstellt werden
- e. Sofern beim oberen Strang ein G für den U6-Promotor angehängt wurde, muss an das 3'-Ende ein C angehängt werden

Oligo oben 5'-CACC**G**xxxxxxxxxxxxxxxxxxx-3'
 Oligo unten 3'-**C**yyyyyyyyyyyyyyyyyyCAA-5'

Abbildung 3: Schematische Darstellung der zu synthetisierenden Oligosequenzen zur Klonierung in das Cas9-Plasmid.

Am 5'-Ende der sgRNA-Sequenz muss zur adäquaten Expression der sgRNA unter dem U6-Promotor ein Guanin angehängt werden, sofern sich dort noch keines befindet (rot). Statt Platzhalterbase x muss die erhaltene Sequenz aus dem CRISPR-Onlinetool eingesetzt werden. In y die dazu komplementäre Sequenz in Gegenrichtung. An den oberen Strang wird an das 5'-Ende noch die Sequenz 5'-CACC-3' angehängt, an den unteren Strang die Sequenz 5'-AAAC-3' sowie an das 3'-Ende ein Cytosin, sofern beim oberen Strang ein Guanin zusätzlich eingefügt werden musste.

5. Cas9-Plasmid wenn nötig mittels kompetenten TOP10-Bakterien und Qiagen QIAPrep MiniPrep in ausreichender Menge herstellen
6. Die erstellten sgRNA-Oligos in das Cas9-Plasmid klonieren:
 - a. Oligos in DNase freiem Wasser auf eine Endkonzentration von 100µM verdünnen
 - b. Komponenten zur Phosphorylierung und Hybridisierung verdünnen:

Reagenz	Menge in μl
sgRNA Oligo oben (100 μM)	1
sgRNA Oligo unten (100 μM)	1
T4 Ligationspuffer 10x	1
T4 PNK	1
ddH ₂ O	6
Gesamt	10

- c. Oligos im Thermocycler phosphorylieren und hybridisieren: 30min 37°C, 5min 95°C, mit der Geschwindigkeit von 5°C/min auf 25°C abkühlen lassen
- d. 1 μl der phosphorylierten und hybridisierten Oligos in 199 μl DNase-freiem ddH₂O verdünnen
- e. Ligationsreaktion erstellen:

Reagenz	Menge in μl
pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459), 100ng	x
Verdünnte, hybridisierte, phosphorylierte Oligos	2
Tango Puffer 10x	2
ATP 10mM	1
DTT 10mM	1
Fast Digest BbsI	1
T7-Ligase	0,5
ddH ₂ O	Volumen auf 20 μl auffüllen
Gesamt	20 μl

- f. Ligation im Thermocycler durchführen: 6 Zyklen mit jeweils 5 min abwechselnder Inkubation bei 37°C und 21°C
- g. Das ligierte Plasmid mit der PlasmidSafe-Exonuklease behandeln, um noch linear vorliegende DNA zu eliminieren

Reagenz	Menge in μl
Ligiertes Plasmid	11
PlasmidSafe Puffer	1,5
ATP 10mM	1,5
PlasmidSafe-Exonuklease	1
Gesamt	15 μl

- h. Die PlasmidSafe Reaktion im Thermocycler bei 30min bei 37°C, danach 30min bei 70°C inkubieren und auf 4°C abkühlen lassen, das Plasmid kann danach bei -20°C gelagert werden
7. Das erstellte Plasmid in kompetente TOP10-*E. coli* Bakterien transformieren und mittels Qiagen MiniPrep in ausreichender Menge herstellen:
 - a. LB-Platten mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin auf 37°C erwärmen
 - b. Wasserbad auf 42°C vorheizen
 - c. SOC Medium auf Raumtemperatur erwärmen
 - d. 20 μl chemisch kompetente TOP10 *E. coli* Bakterien in einem 1,5ml Eppendorfgefäß auf Eis auftauen
 - e. 2 μl des Plasmids aus Schritt 6h in die Bakterien pipettieren, sanft mischen und die Bakterien wieder auf Eis stellen
 - f. 30min auf Eis inkubieren
 - g. Zum Hitzeschock die Bakterien in das 42°C warme Wasserbad für 30s geben, danach Bakterien für 2min auf Eis stellen
 - h. 250 μl SOC Medium zu den Bakterien pipettieren und für 1h bei 37°C inkubieren
 - i. 100 μl Transformationsansatz auf LB Platte mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin ausbringen und über Nacht (14-18h) bei 37°C inkubieren
 - j. Drei einzelne Kolonien mit einer Pipettenspitze aufnehmen und jede Spitze in ein verschließbares 3ml LB Medium mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin abwerfen
 - k. Gefäße über Nacht (14-18h) bei 37°C inkubieren und die Plasmide mittels Qiagen MiniPrep gemäß oben beschriebener Anleitung isolieren
 - l. Klonierung mittels Sequenzierung überprüfen: 15 μl in ddH₂O verdünntes Plasmid der Konzentration 75ng/ μl in ein 1,5ml Eppendorf Safe-Lock-Gefäß pipettieren, Sequenzieretikett auf dem Gefäß anbringen

- m. Auf der Onlinemaske von Eurofins Genomics die Etikettnummer eingeben und als Sequenzierprimer U6-Fwd auswählen
 - n. Gefäß in einem luftgepolsterten Umschlag zum Sequenzieren einsenden
 - o. gewünschte Plasmidsequenz und tatsächliche Sequenz vergleichen
8. Transfizierung des Plasmids in HCT 116 Zellen mittels FuGENE HD und Erzeugung einer monoklonalen Zelllinie:
- a. Zellen ernten, zählen und 3×10^5 in einer Vertiefung einer 6er Mikrotiterplatte ausbringen
 - b. Über Nacht (14-18h) bei 37°C inkubieren
 - c. Fugene HD auf Raumtemperatur erwärmen, sollten Präzipitate bestehen, Reagenz auf 37°C erwärmen und bis zur vollständigen Auflösung vortexen
 - d. $100\mu\text{l}$ OptiMEM Medium in ein steriles $1,5\text{ml}$ Eppendorfgefäß vorlegen, $2\mu\text{g}$ Plasmid zugeben, kurz vortexen
 - e. $8\mu\text{l}$ FuGENE HD hinzufügen und für 15min bei Raumtemperatur inkubieren
 - f. Das hergestellte Gemisch unter langsamem Tropfen und kreisenden Bewegungen zu den kultivierten Zellen in 2ml Medium geben
 - g. 48h bei 37°C inkubieren
 - h. Medium verwerfen, einmalig mit PBS waschen und Medium mit 7% FCS und $6\mu\text{g/ml}$ Puromycin zugeben (bei einer Grundkonzentration von 10mg/ml der Puromycinlösung entspricht das $0,6\mu\text{l}$ Puromycinlösung pro ml Medium)
 - i. 72h bei 37°C inkubieren
 - j. Zellen ernten, zählen und je 1×10^5 Zellen auf 10cm Platten in Medium mit 7% FCS ausbringen
 - k. Drei Wochen bei 37°C inkubieren, dabei darauf achten, dass die Platten so wenig als möglich bewegt werden, um Kreuzkontamination zu vermeiden
 - l. Medium verwerfen und mit einer sterilen $20\mu\text{l}$ Pipette einzelne Kolonien aufnehmen und jeweils in einer Vertiefung einer 24er Mikrotiterplatte in 1ml Medium mit 7% FCS ausbringen
 - m. Zwei bis drei Wochen bei 37°C inkubieren, alle 5 Tage das Wachstumsmedium wechseln
9. Evaluation der Linien auf Gb₃-Expression und Verbreiterung:
- a. Zellen ernten und zählen
 - b. Idealerweise 1×10^5 der Zellen zur Evaluation mittels Durchflusszytometrie verwenden, allerdings nicht mehr als die Hälfte der Gesamtzellzahl

- c. Zellen nach oben genanntem Protokoll ohne die Verwendung von 7-AAD mittels StxB-Cy3 durchflusszytometrisch analysieren: diejenigen Linien mit weniger als 1,5% an StxB-Cy3 positiven Ereignissen gelten prima facie als Gb₃-defizient, die Verwendung von 7-AAD wird nicht empfohlen, da sich bei geringer Zellzahl falsch hohe Werte im 7-AAD-Kanal ergeben können und bei starken 7-AAD-Intensitäten eine Verschiebung der Fluoreszenzintensität im Cy3-Kanal nicht völlig ausgeschlossen werden kann
- d. Den Rest der Zellen auf einer 10cm Platten in 10ml Medium mit 7% FCS ausbringen
- e. Inkubation für 1 Woche bei 37°C
- f. Zellen ernten und mehrere Aliquots der in der Durchflusszytometrie Gb₃-defiziente Linien gemäß oben genannter Anleitung in 90% FCS und 10% DMSO einfrieren
- g. Lagerung in flüssigem Stickstoff

Next Generation Sequencing-Analyse der monoklonalen Zelllinien

1. DNA gemäß oben genanntem Protokoll aus den generierten Linien extrahieren
2. Die Schnittstellen Region der gRNA bestimmen und mittels Primer3(Koressaar & Remm, 2007; Untergasser et al., 2012) Primer erstellen (Tabelle 14),
 - a. Die ein Amplicon der Länge 200 bis 280bp erzeugen
 - b. Deren Produkt die CRISPR/Cas9 Schnittstelle innerhalb der ersten 100bp des Amplicons besitzt
 - c. Die in dieser Kombination im humanen Genom nur einmal zu einem Produkt dieser oder vergleichbarer Länge führen (Überprüfung mittels BLAST-Funktion des Ensembl genome browser 90)
3. Eine PCR mit der DNA der generierten Linien, den erstellten Primern und der Phusion Hot Start II Polymerase durchführen
4. Das PCR Produkt auf ein 2% Agarosegel auftragen und die Gelelektrophorese bei 90V durchführen
5. Bande bzw. Banden um 200-400bp mit einem Skalpell ausschneiden unter Zuhilfenahme einer UV-Lampe
6. DNA aus Gelstück wie oben beschrieben extrahieren
7. Gewonnene DNA auf 10-40ng/µl in EB-Puffer in einem Volumen von 35µl verdünnen

8. CRISPR Sequencing Service der MGH DNA Core Unit online gemäß Anweisung bestellen(MGH CCIB DNA Core, 2017)
9. DNA Proben beschriftet, gut verschlossen und vor Stößen geschützt an die angegebene Adresse versenden, dabei Zollunterlagen und Unbedenklichkeitsformular ausfüllen und beilegen
10. Erhaltenen Sequenzen mittels des SnapGene Viewers öffnen und die Verteilung der einzelnen Amplicons zur Reinheitsbestimmung erfassen

Tabelle 14: Mittels Primer3 erstellte Primer zur Amplifizierung der Cas9-Schnittstellenregion.

Schnittstellenregion	Primer rechts	Primer links
A4GALT Exon 2	GGAAGAAGATGTT- GCCTGGA	GGTCTGATCTGGG- GATACCA

5.2 Patientenkollektiv und Patientengewebe

5.2.1 Probensammlung, Aufbewahrung und Klassifizierung

Humanes Tumor- und Normalgewebe wurde nach schriftlicher Einwilligung des Patienten und Genehmigung der Ethikkommission der Fakultät für Medizin der TU München (Nr. 1926/2007, sowie #5428/2012) im Klinikum rechts der Isar aufbewahrt und für wissenschaftliche Zwecke benutzt. Ab der chirurgischen Entnahme der Proben dauerte der Archivierungsprozess in der Biobank der Chirurgischen Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar bei -80°C in der Regel nicht länger als eine Stunde. Insgesamt wurde Gewebsproben von 21 Patienten wissenschaftlich untersucht, die in den Jahren 1990 bis 2017 in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar behandelt wurden. Unter 21 analysierten Tumorproben befand sich eine Metastase eines Duodenalkarzinoms sowie 20 nicht vorbehandelte Kolorektalkarzinome. Die Karzinome wurden gemäß den Richtlinien der Internationalen Vereinigung gegen Krebs (UICC) von erfahrenen Pathologen des Klinikums rechts der Isar bzw. vom Institut für Pathologie der Technischen Universität München klassifiziert. Entnommene Tumorproben wurden vor Analyse mittels Hämatoxylin/Eosin-Färbung untersucht und nur verwendet, wenn der Tumorzellgehalt größer als 30% war („histology guided sample selection“) (Nitsche et al., 2011). Normalgewebe wurde ebenso gefärbt und nur bei mikroskopischer Tumorzellfreiheit weiter analysiert. Patientencharakteristika sowie Tumorstadien sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Patientencharakteristik und Tumorstadien.

		Anzahl	Relativer Anteil
Gesamtzahl		21	100%
Geschlecht	Männlich	13	62%
	Weiblich	8	38%
Alter	Median (Min; Max)	67 (49;82)	
WHO-Klassifikation	Adenokarzinom	16	76%
	Muzinöses Karzinom	3	14%
	Siegelringkarzinom	1	5%
	Duodenalkarzinom	1	5%
Grading	G1	0	0%
	G2	14	67%

	G3	6	29%
	G4	0	0%
	G1-2	14	67%
	G3-4	6	29%
	unklassifiziert (Duodenal- karzinommetastase)	1	5%
pT-Stadium	T1	1	5%
	T2	3	14%
	T3	13	62%
	T4	3	14%
	unklassifiziert (Duodenal- karzinommetastase)	1	5%
pN-Stadium	N0	10	48%
	N1	8	38%
	N2	2	10%
	unklassifiziert (Duodenal- karzinommetastase)	1	5%
L (Lymphinvasion)	L0	14	67%
	L+	6	29%
	unklassifiziert	6	29%
V (Angioinvasion)	V0	20	95%
	V+	0	0%
	unklassifiziert (Duodenal- karzinommetastase)	1	5%
Vorbehandlung	Nein	21	100%
	Ja	0	0
UICC	I	4	19%
	II	5	24%
	III	9	43%
	IV	2	10%
	unklassifiziert (Duodenal- karzinommetastase)	1	5%

5.2.2 Patientendaten

Es erfolgte eine prospektive, kontinuierliche Erfassung klinischer sowie histopathologischer Patientendaten. Diese wurden in einer Excel-Datenbank gespeichert und bei Bedarf von Herrn Dr. Dr. Ulrich Peter Nitsche auch aus einer Datenbank exportiert, erweitert und bereitgestellt. Bei Unvollständigkeit wurden die Aufzeichnungen federführend von Herrn Dr. Dr. Nitsche um Daten aus dem elektronischen Aufzeichnungssystem und weiteren anderweitig vorliegenden medizinischen Befunden des Klinikums rechts der Isar ergänzt oder bei Bedarf den Auskünften betroffener Patienten bzw. deren Ärzten entnommen.

5.3 Statistische Auswertung

Bei angenommener Normalverteilung der jeweiligen Messdaten wurde zum Vergleich zweier oder mehrerer Messreihen ein zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Sofern die Messdaten als nicht normalverteilt klassifiziert wurden, wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Der Exakte Test nach Fisher diente im Falle einer dichotomen Aufteilung, also wenn mindestens einer der Mittelwerte den Wert 0 annahm, zur Signifikanzanalyse. Zur Korrelationsanalyse diente ein Rangkorrelationstest nach Spearman und dessen Rangkorrelationskoeffizient r . Ab einem p-Wert kleiner oder gleich 0,05 wurde von einem signifikanten Ergebnis ausgegangen. Eine Korrektur für multiples Testen fand nicht statt. Statistische Analysen und die Erstellung von Graphen wurden mit GraphPad Prism (Version 6) durchgeführt.

6 Ergebnisse

6.1 Teil I: Regulation der Gb₃ Biosynthese

6.1.1 Etablierung des StxB-Cy3 Membranfärbeprotokolls (nach Geyer et al., 2016)

StxB-Cy3 wird aktiv und schnell in Zellen mit Gb₃-Oberflächenexpression aufgenommen. Die Intensität der Färbung mit Cy3-gekoppeltem StxB ist somit auch abhängig von der Inkubationszeit der Probe, sofern die aktive Aufnahme nicht unterbunden wird. Dies wird im vorliegenden Protokoll mittels Inkubation auf Eis gelöst. Auch danach wird die Probe stets auf Eis bis zum Erfassen der Zellen im Durchflusszytometer gehalten, da sich ansonsten Veränderungen der Granularität der Zelle und dessen Maßzahl, dem Seitwärtsstreulicht (SSC für „Side Scatter“), sowie gegebenenfalls unter anderem auch der Emissionsintensität des Fluorophors ergeben könnten.

Ziel der Durchflusszytometrie ist es, einerseits sensitiv Gb₃-positive Zellen zu detektieren, andererseits aber auch spezifisch ausschließlich diese Zellen anzufärben. Zu diesem Zweck wurde eine StxB-Cy3 Titration durchgeführt. Bereits bei niedrigen StxB-Cy3 Konzentrationen können Gb₃-positive Zellen detektiert werden, allerdings erhöht sich der Anteil der Gb₃-positiven Fraktion stark bei steigenden Konzentrationen an StxB-Cy3 (Abbildung 4). Um die Spezifität der Färbung bei hohen Konzentrationen zu testen, wurde ein Konkurrenzversuch durchgeführt, bei dem ungekoppeltes StxB/Cys in 40-fachem Überschuss zu StxB-Cy3 der Konzentration von 35 µg/ml zugegeben und anschließend die Zellen nach oben genanntem Protokoll gefärbt wurden. Ergebnis war eine ausgeprägte Reduktion der StxB-Cy3 Oberflächenfärbung in der Durchflusszytometrie (Abbildung 5).

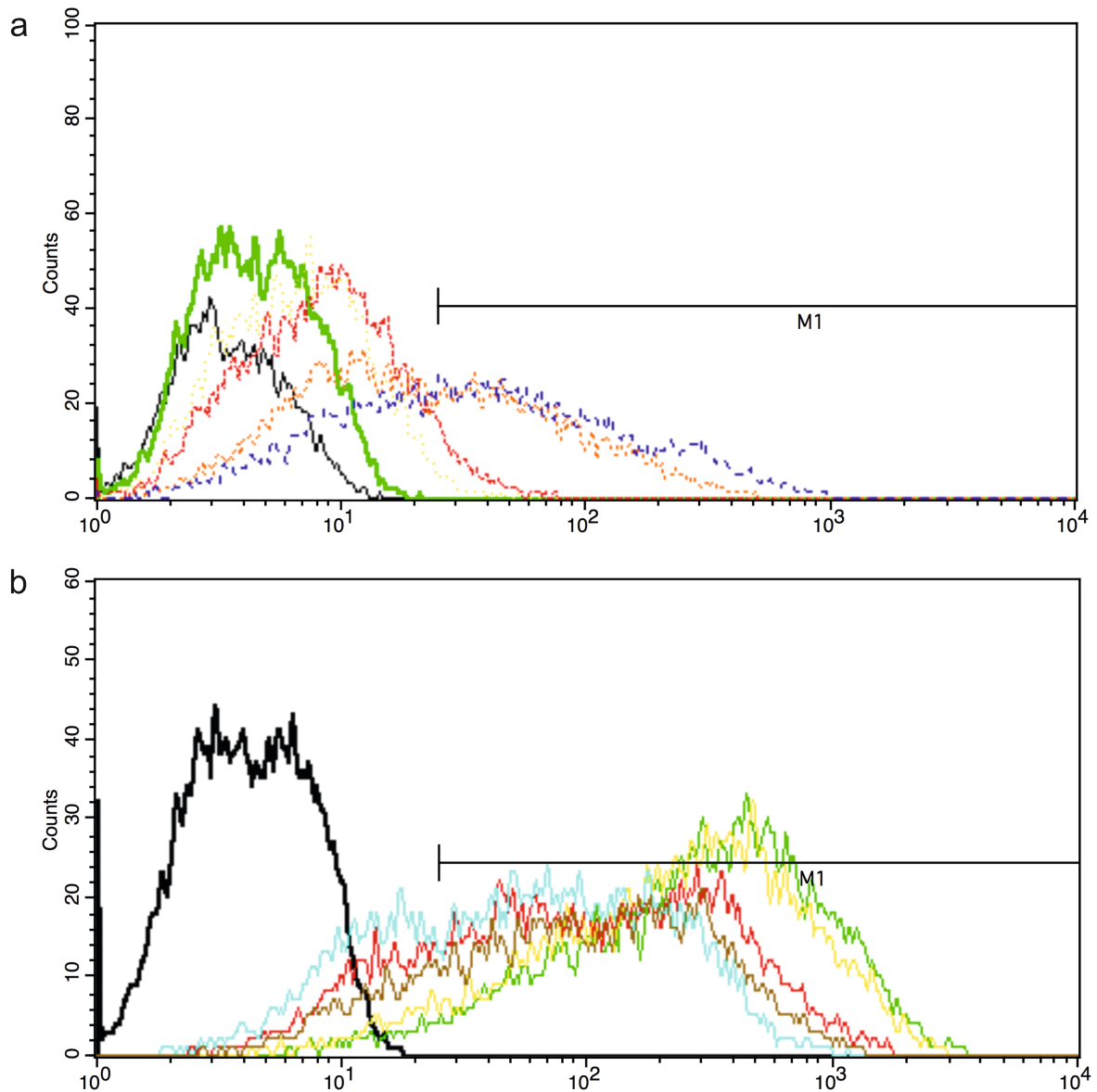


Abbildung 4: Titration von StxB-Cy3 zur Bestimmung der idealen Konzentration bei durchflusssyztometrischer Quantifizierung von Gb3.

In a werden niedrige Konzentrationen von 140ng/ml bis 35µg/ml (schwarz: BSA-Cy3-Kontrolle, grün: 140ng/ml, gelb: 700ng/ml, rot: 1,4µg/ml, orange: 7µg/ml, blau: 35µg/ml), in b hohe Konzentrationen von 35µg/ml bis 1,4mg/ml (schwarz: BSA-Cy3-Kontrolle, braun: 35µg/ml, hellblau; 70µg/ml, rot: 140µg/ml, gelb: 700µg/ml, grün: 1,4mg/ml).

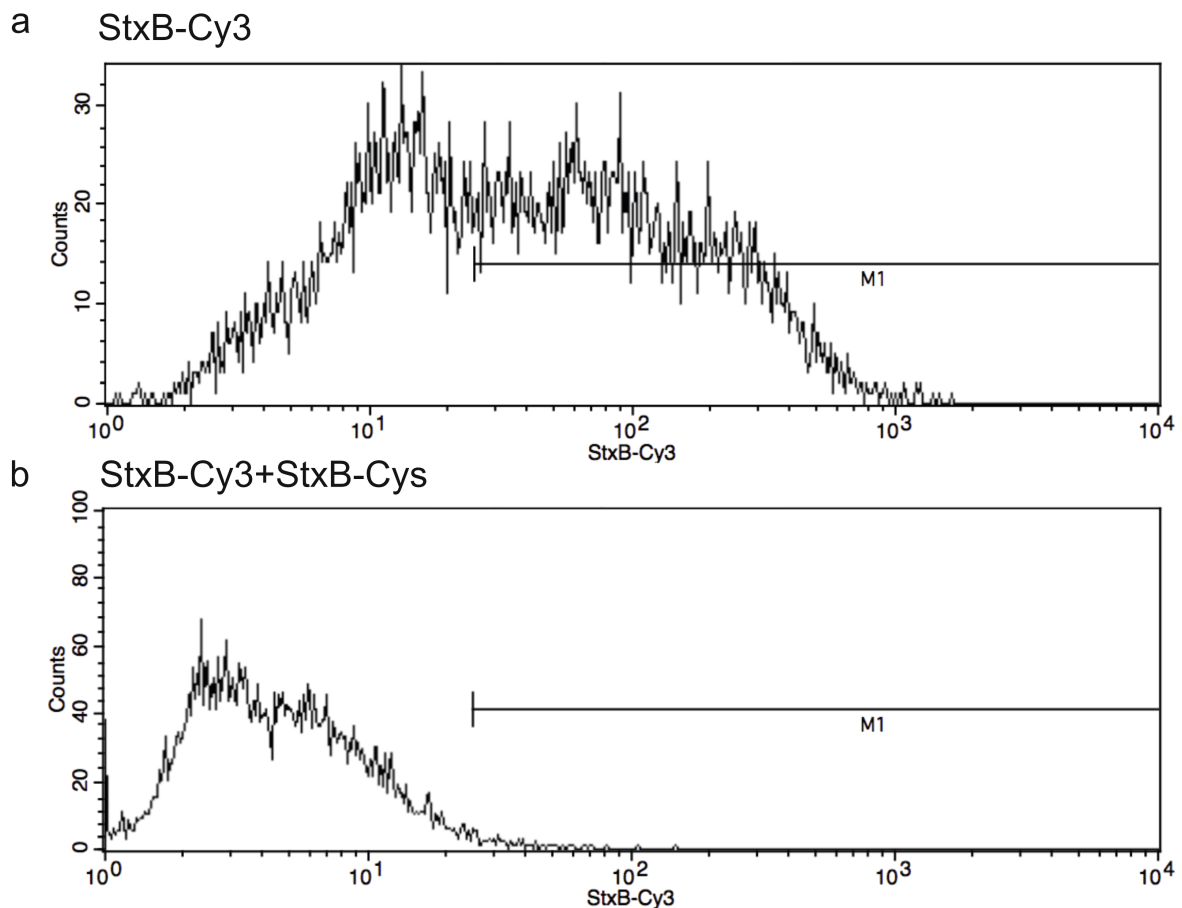


Abbildung 5: Gb₃-Membranfärbung mittels StxB-Cys auf HCT 116-Zellen ist durch ungekoppeltes StxB verhinderbar.

Mittels StxB-Cy3 kann membranäres Gb₃ auf HCT 116-Zellen angefärbt werden (a). Bei Zugabe eines 40-fachen Überschuss ungekoppelten StxB-Cys kann die Membranfärbung fast vollständig unterdrückt werden (b).

Die durchgeführten Versuche führten zur Entscheidung, eine Konzentration von 35 µg/ml StxB-Cy3 für die Färbung von Gb₃ in der Durchflusszytometrie zu verwenden, da hier vom bestmöglichen Kompromiss aus Sensitivität bei erhaltener, hoher Spezifität ausgegangen werden kann.

Die Grenzintensität M1, bei der noch von einer StxB-Cy3 positiven Zelle ausgegangen werden kann, wurde mit den zuvor mittels mehrerer Methoden als Gb₃-negativ beschriebenen DLD-1 Zellen bestimmt. Bei mehreren Messungen durften jeweils nicht mehr als 1% der DLD-1 Zellen in Durchflusszytometrie jenseits dieses Markers klassifiziert sein, was uns als Maß für unspezifische StxB-Cy3-Färbung diente. Zur Abschätzung des Anteils an unspezifischer Färbung der Zelloberfläche wurde Cy3-gekoppeltes Bovines Serumalbumin (BSA) verwendet und bei Bestimmung des Anteils an Gb₃ positiven Zellen einer Linie jeweils vom Anteil der Zellen jenseits des Markers M1 in der StxB-Cy3-Färbung abgezogen.

6.1.2 Gb₃ Biosynthese korreliert mit der A4GALT Ausprägung in Zelllinien sowie in Gewebeproben humaner gastrointestinaler Karzinome

Die Ausprägung von Gb₃ auf der Zelloberfläche gastrointestinaler Karzinomzelllinien wurde mit der mRNA-Expression des Enzyms A4GALT, das den letzten Schritt der Synthese von Gb₃ ausgehend von Laktosylceramid katalysiert, verglichen. Die Messung der Oberflächenexposition erfolgte mittels eines durchflusszytometrischen Vorgehens, bei dem lebende Zellen auf Eis mit Cy3-gekoppeltem StxB inkubiert wurden, um die aktive endozytische Aufnahme von StxB zu unterdrücken und so zeitabhängige Störeinflüsse zu minimieren. Cy3-gekoppeltes bovines Serumalbumin wurde als Kontrolle für unspezifische Färbung herangezogen. Die A4GALT mRNA-Expression wurde mittels qrtPCR quantifiziert.

Abbildung 6 zeigt beispielhaft eine FACS-Analyse der zuvor in laboreigenen Vorarbeiten (Geyer et al., 2016; Maak et al., 2011) als Gb₃-defizient beschriebenen Zelllinie DLD-1 sowie der Gb₃-profizienten Zelllinie HCT 116 bei einer StxB-Cy3 Konzentration von 35 µg/ml.

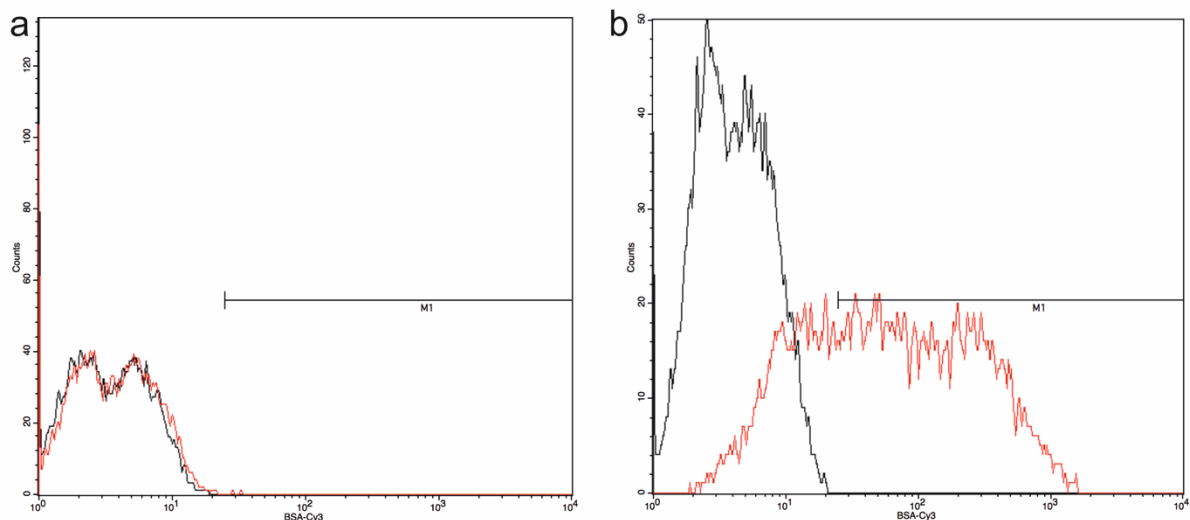


Abbildung 6: Oberflächenexposition von Gb₃ in den Zelllinien DLD-1 und HCT 116 (Histogramm). Lebende DLD-1- (a) und HCT 116- (b) Zellen wurden mittels StxB-Cy3 (rot) und BSA-Cy3 (schwarz) auf Eis gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Als Modell für maligne gastrointestinale Tumoren dienten die etablierten Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und HCT 116, sowie die Magenkarzinomzelllinien AGS, MKN-45 und St3051. AGS und DLD-1 wiesen keine, MKN-45 geringe und HCT 116 sowie St 3051 vergleichsweise hohe Anteile an Gb₃-positiven Zellen auf (Abbildung 7).

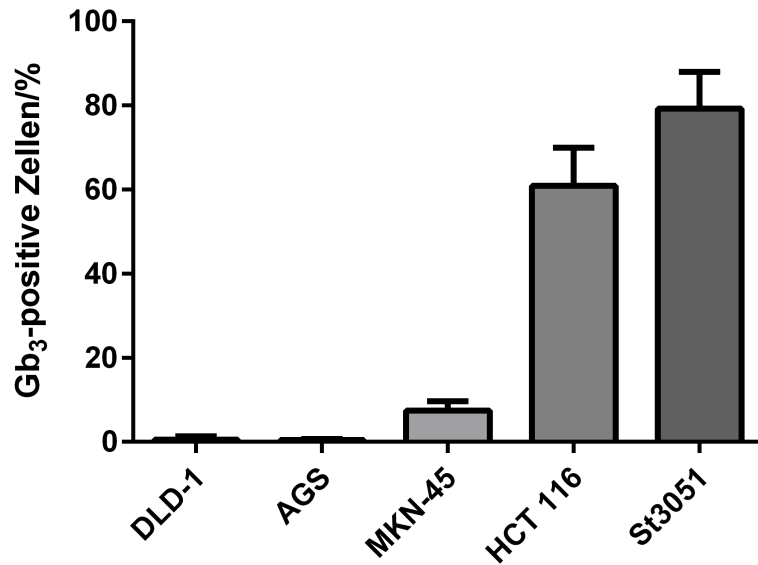


Abbildung 7: Prozentualer Anteil an Gb₃-positiven Zellen verschiedener gastrointestinaler Zelllinien.

Die Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und HCT 116 sowie die Magenkarzinomzelllinien AGS, MKN-45 und St3051 wurden mit StxB-Cy3 auf Eis angefärbt und mittels FACS analysiert. Fehlerbalken entspricht Standardabweichung (SD) von n=3-6 Messungen.

Die Gb₃-defizienten Linien AGS und DLD-1 wiesen keine messbare mRNA-Expression von A4GALT auf. MKN-45 hatte geringe, HCT 116 und St3051 hohe A4GALT Expressionswerte, jeweils in guter Übereinstimmung mit ihrer Gb₃ Membranexposition (Abbildung 8). Genaue Werte für die Gb₃-Oberflächenexposition, sowie A4GALT-mRNA-Expressionswerte können Tabelle 16 entnommen werden.

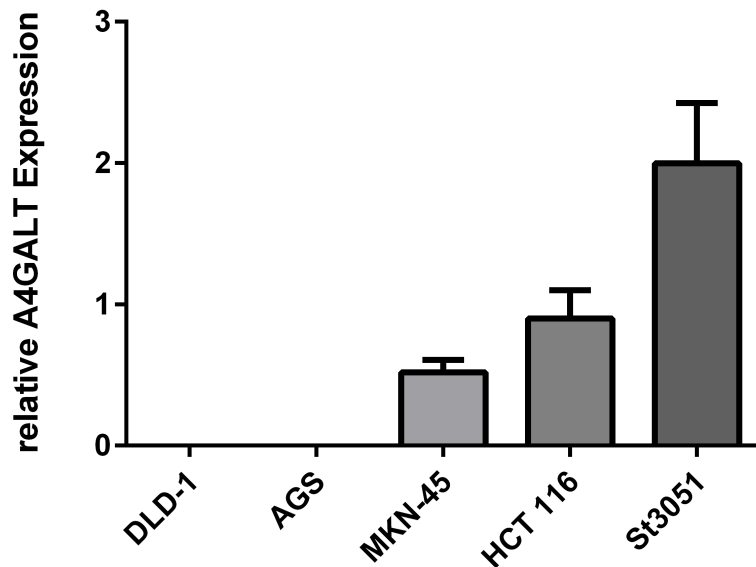


Abbildung 8: Relative A4GALT-mRNA-Expression verschiedener gastrointestinaler Zelllinien.

Mittels qrtPCR wurde die mRNA-Expression des A4GALT-Genes in den Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und HCT 116 sowie den Magenkarzinomzelllinien AGS, MKN-45 und St3051 quantifiziert. Fehlerbalken entspricht SD von n=3-4 Messungen.

Tabelle 16: Mittlere Gb₃-Oberflächenexposition sowie A4GALT-mRNA Expression verschiedener Zelllinien.

Zelllinie	Gb ₃ -Oberflächenexposition in Prozent	Relative A4GALT-mRNA Expression
DLD-1	0,54 ± 0,81 (MW +/- SD)	0
AGS	0,44 ± 0,46	0
MKN-45	7,45 ± 2,23	0,52 ± 0,09
HCT 116	60,8 ± 9,10	0,90 ± 0,20
St3051	79,3 ± 8,74	2,00 ± 0,43

Eine Korrelationsanalyse nach Spearman ergab eine sehr hohe, signifikante Korrelation zwischen A4GALT und Gb₃ Expression von $r=0,9747$ ($p=0,0333$). Anhand der A4GALT Expression ist es bei diesen fünf Modellzelllinien möglich, vorherzusagen, ob und in welchem Umfang eine Ausprägung von Gb₃ vorhanden ist (Abbildung 9).

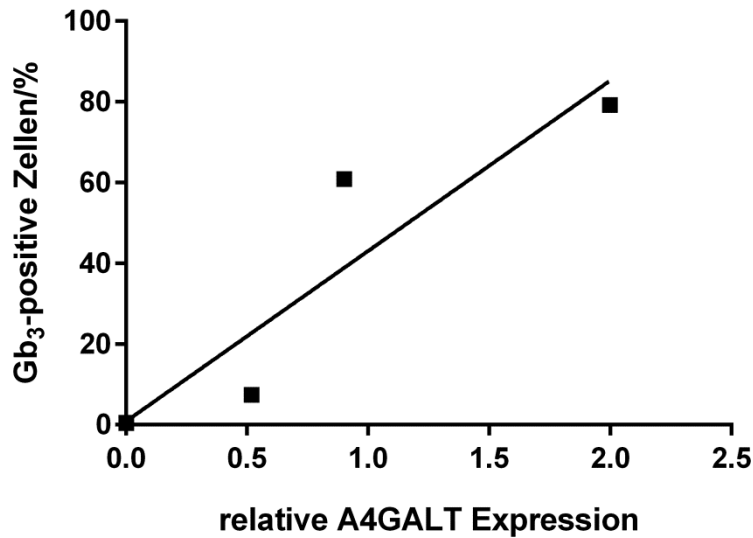


Abbildung 9: Korrelation der A4GALT mRNA-Expression und Gb₃-Oberflächenexposition. Die mittels Durchflusszytometrie quantifizierten Gb₃-Oberflächenexpositionswerte und mittels qrtPCR gewonnenen relativen A4GALT mRNA-Expressionswerte wurden in ein xy-Diagramm eingetragen und eine Regressionsgeraden gezogen. Eine Korrelationsanalyse ergab eine sehr hohe, signifikante Korrelation von A4GALT und Gb₃ Expression ($r=0,9747$, $p=0,0333$).

Danach wurde die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Zellkulturmodell auf Gewebeproben humaner Kolonkarzinome untersucht. Von insgesamt 17 untersuchten Proben wiesen 4 (24%) den niedrigsten im Dreipersonen-Beobachter-Score möglichen Wert von 1 auf (1 entspricht niedriger, 2 mittlerer und 3 hoher Gb₃ Ausprägung). Diese Proben zeigten auch keine detektierbare A4GALT-mRNA-Expression. Die Proben mit vorhandener A4GALT Expression waren dagegen in unterschiedlichem Ausmaß Gb₃-positiv. Unter Berücksichtigung des von uns bisher angewendeten Drei-Personen-Beobachter-Scores wiesen die als Gb₃-positiv klassifizierten Gewebeproben (Score 2 oder 3) signifikant höhere A4GALT-mRNA-Expression auf als diejenigen mit Score 1 ($p=0,049$). Auch zeigte sich ein Trend in Richtung höherer A4GALT-mRNA-Expression der Proben mit Score 3 im Vergleich zu denjenigen mit 2, der allerdings aufgrund der geringen Stichprobengröße in Score 3 ($n=2$) keine Signifikanz erreichte ($p=0,83$) (Abbildung 10).

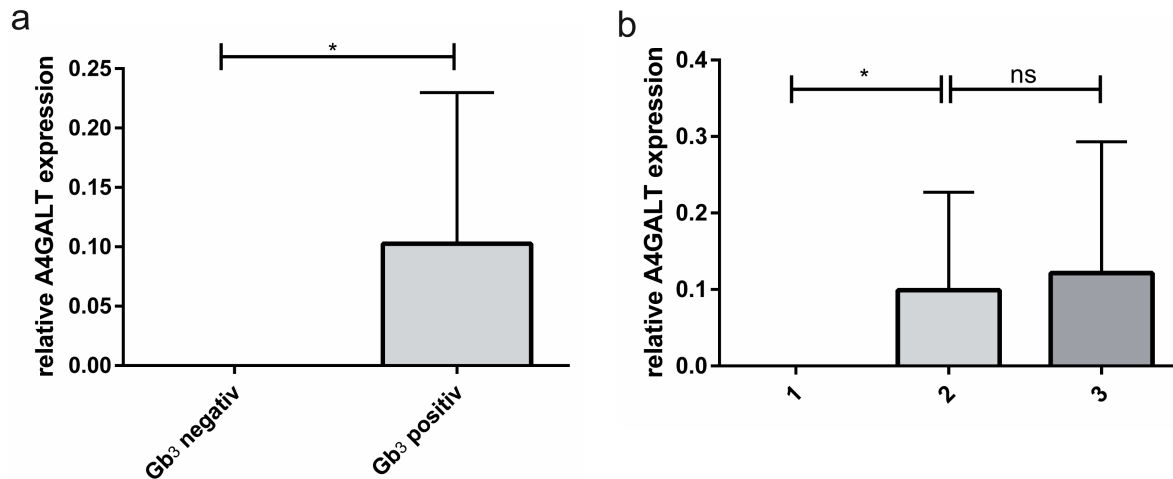


Abbildung 10: Vergleich von A4GALT und Gb₃-Ausprägung in humanen Kolonkarzinomproben.

Im Vergleich zu Gb₃-negativen Proben (Drei-Personen-Beobachter-Score 1, n=4) weisen Gb₃-positive (Score 2 und 3, n=13) signifikant erhöhte A4GALT-mRNA-Expression auf (p=0,049) (a). Zudem ergibt sich ein Trend zu höherer A4GALT-Expression bei höheren Scores, der im Falle von Score 1 (n=4) und 2 (n=11) signifikant ist (p=0,0432), jedoch aufgrund geringer Stichprobengröße im Score 3 (n=2) nicht zwischen Score 2 und 3 (p=0,9744).

6.1.3 Die A4GALT Expression und damit die Gb₃ Biosynthese wird durch epigenetische Mechanismen stillgelegt

Frei verfügbare Datenbanken (TCGA, cBioportal)(Gao et al., 2013) zeigen eine niedrige Frequenz von genomischen Alterationen der A4GALT hinsichtlich Mutationen, Deletionen oder Amplifikationen in Kolorektal-, Magen- und Pankreaskarzinomen, sodass diese alleine als Erklärung für die beobachtete Über- oder Neoexpression von Gb₃ nicht hinreichend sind.

Eine *in silico*-Analyse der genomischen Region der A4GALT hinsichtlich CpG-Inseln mittels MethPrimer (Li & Dahiya, 2002) wies im mutmaßlichen Promotor eine etwa 100 Basenpaare lange CpG-reiche Sequenz auf. Eine zweite, längere CpG-reiche Sequenz in Exon 2 entspricht wahrscheinlich einem zuvor von Westman *et al.* beschriebenen Alu-Repeat (Westman et al., 2014). Abbildung 11 zeigt die Lagebeziehungen der CpG-reichen Sequenzen zum A4GALT-Gen.

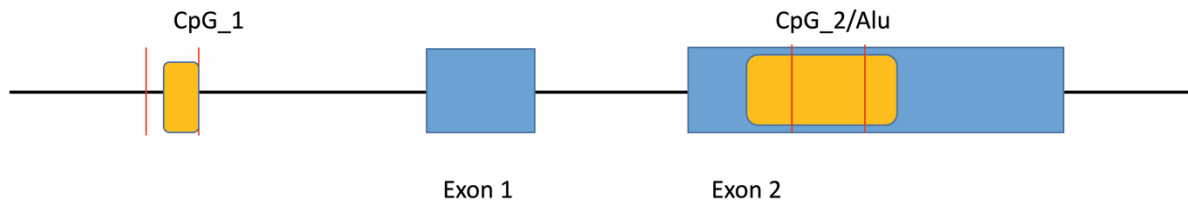


Abbildung 11: Lagebeziehung der CpG-reichen Sequenzen aus der *in silico*-Analyse des humanen A4GALT-Gens (Quelle: ENSEMBL, Version GRCh38).

Die Gensequenz der A4GALT-Region wurde mittels Methprimer(Li & Dahiya, 2002) analysiert und schematisiert dargestellt. Gelbe Boxen entsprechen den CpG-reichen Sequenzen, blaue den Exons. Rote Markierungen entsprechen den bisulfitsequenzierten Bereichen.

Die Methylierung der DNA, insbesondere der Cytosine in CpG-reichen Sequenzen der Genpromoter, ist ein bedeutender epigenetischer Repressionsmechanismus, der zudem eng mit weiteren Regulationsmechanismen wie Chromatinmodifikationen interagiert. (Jin et al., 2011) Hypothetisch sollte im Falle einer epigenetischen Regulation der A4GALT die Expression des Enzyms und damit die des Glykosphingolipids Gb₃ mittels Inhibitoren der CpG-Methylierung sowie der Histondeacetylierung in initial defizienten Zellen wiederhergestellt bzw. die vorhandene A4GALT Expression in gering ausprägenden Zellen erhöht werden können (Abbildung 12).

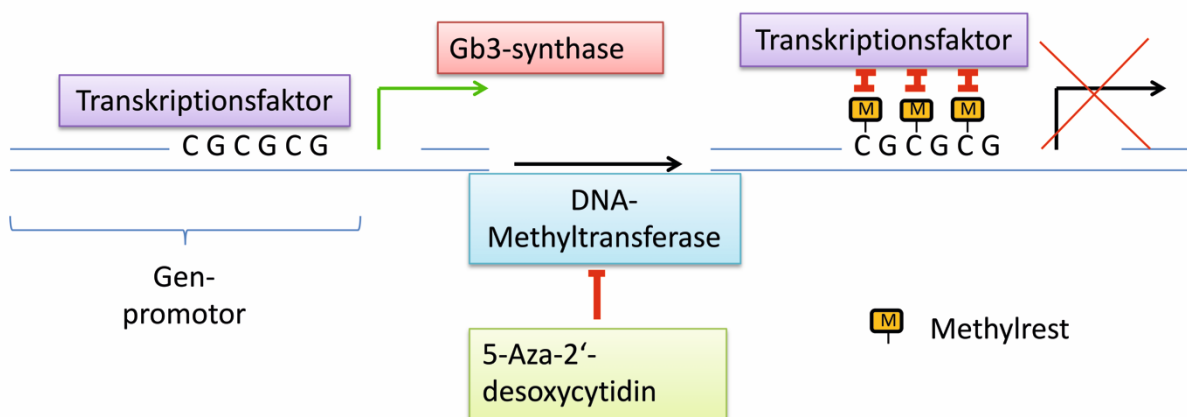


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Genexpressionsrepression durch CpG-Methylierung im Genpromotorbereich.

Methylierung von CpG-Inseln im Genpromotorbereich kann die Genexpression reprimieren. 5-Aza-2'-desoxycytidin inhibiert die DNMT1 und kann so die Promotormethylierung aufheben.

5-Aza-2'-desoxycytidin inhibiert das Enzym DNMT1, das für die Methylierung des in der S-Phase neu gebildeten DNA-Stranges und damit der Erhaltung des Methylierungsmusters sorgt, und verringert somit die auf CpG-Methylierung basierende Genstilllegung (Palii et al., 2008).

Die eng mit der CpG-Methylierung verknüpfte Chromatindichte kann mittels

Histondeacetylaseinhibitoren wie Valproat verringert werden, was ebenfalls eine verminderte Expressionsunterdrückung zur Folge hat (Abbildung 13).

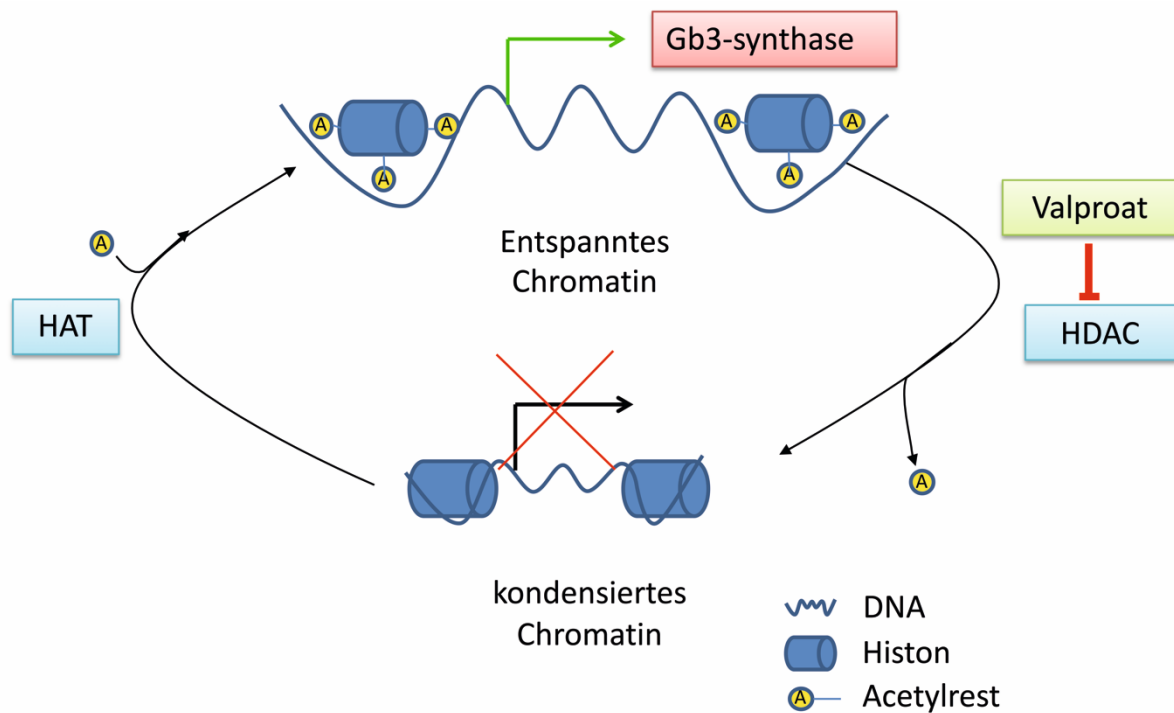


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Genexpressionsrepression durch Chromatinverdichtung.

Positiv geladene Histone können die negativ geladene DNA in unmodifiziertem Zustand eng binden und führen so zu einer kondensierten Chromatinstruktur. Diese verringert die Gentranskriptionsaktivität am entsprechenden Locus. Durch Acetylierung der Histone kann eine weniger starke Bindung der DNA erreicht und so die Transkriptionsaktivität gesteigert werden. Histondeacetylaseinhibitoren wie Valproat hemmen die Deacetylierung der Histone und steigern so Acetylierungsgrad und Genexpression. Abbildung modifiziert nach (Chuang et al., 2009).

Die Zelllinien AGS, DLD-1, MKN-45, HCT 116 und St3051 wurden mit verschiedenen die Epigenetik beeinflussenden Substanzen behandelt. Danach wurde die A4GALT-mRNA-Expression mittels qrtPCR quantifiziert.

Der Einsatz von 1µM 5-Aza-2'desoxycytidine führte in den zunächst A4GALT-defizienten Zelllinien AGS und DLD-1 zu einer Neoexpression des Enzyms, welche sich durch sequentiellen Einsatz von 1mM Valproat noch deutlich steigern ließ. In MKN-45 Zellen führte insbesondere die sequentielle Behandlung mit den beiden genannten Substanzen zu einem signifikanten Anstieg der A4GALT-mRNA-Ausprägung, wohingegen die beiden Substanzen bei HCT 116 und St3051 Zellen keine ausgeprägten Effekte aufwiesen (Abbildung 14).

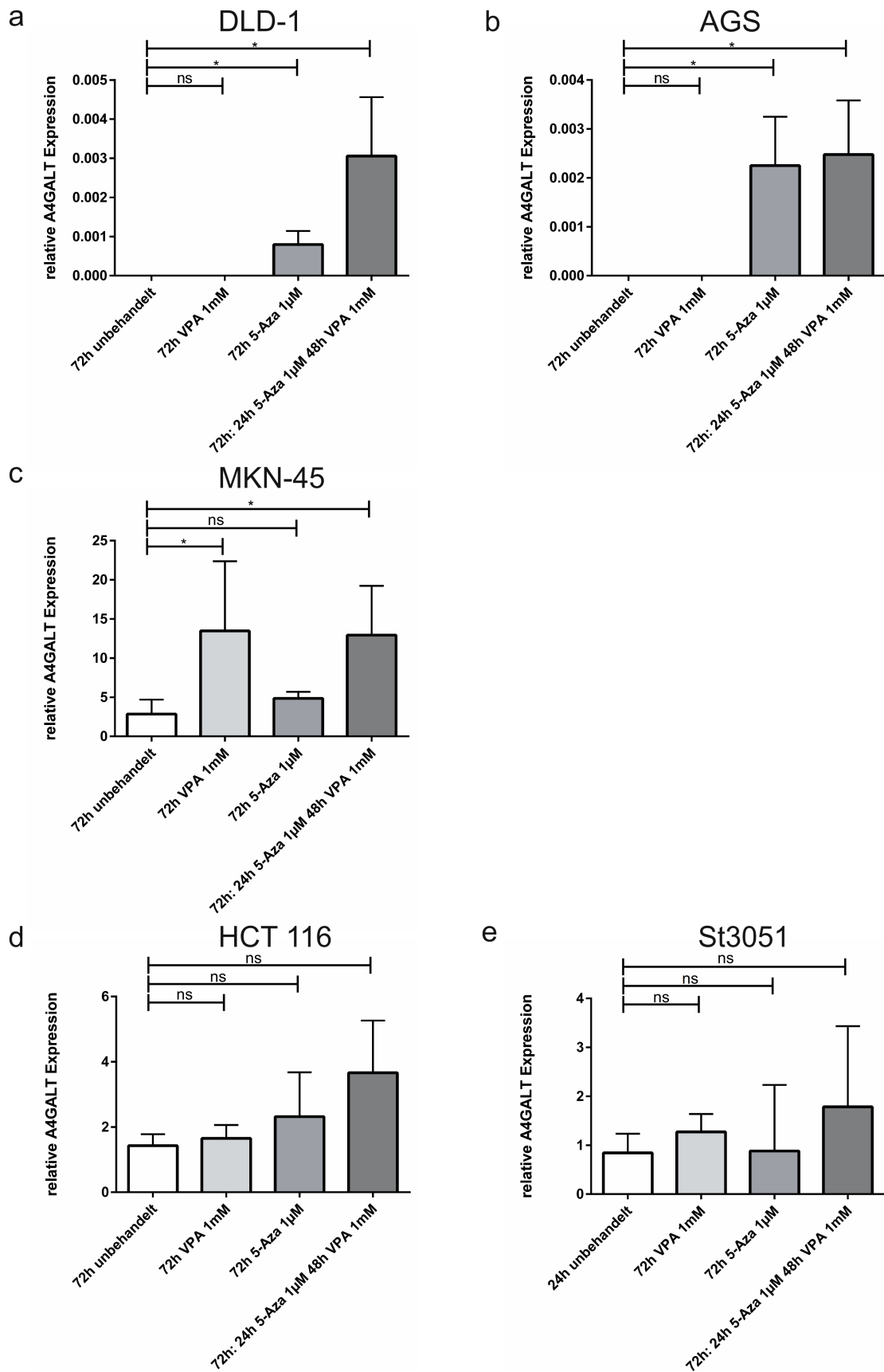


Abbildung 14: mRNA-Expression des A4GALT-Gens nach Behandlung mit epigenetikmodifizierenden Substanzen.

DLD-1 (a), AGS (b), MKN-45 (c), HCT 116 (d) sowie St3051 (e) wurden mit 1mM Valproat oder 1µM 5-Aza-2'-desoxycytidin für 72h bzw. sequentiell 24h mit 1µM 5-Aza-2'-

desoxycytidin und 48h mit 1mM Valproat behandelt. Danach wurde die RNA der Zellen extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mittels qrtPCR die A4GALT-mRNA-Expression quantifiziert. Fehlerbalken entsprechen SD von n=3-4 Messungen.

Danach wurde die Gb₃-Oberflächenexposition durch oben genanntes durchflusszytometrische Vorgehen mittels StxB-Cy3 quantifiziert. Die beiden Gb₃-defizienten Zelllinien AGS und DLD-1 wiesen nach der Behandlung eine „de novo“-Ausprägung von Gb₃, MKN-45 eine signifikant erhöhte Gb₃-Exposition, HCT 116 und St 3051 keine signifikanten Änderungen auf (Abbildung 15).

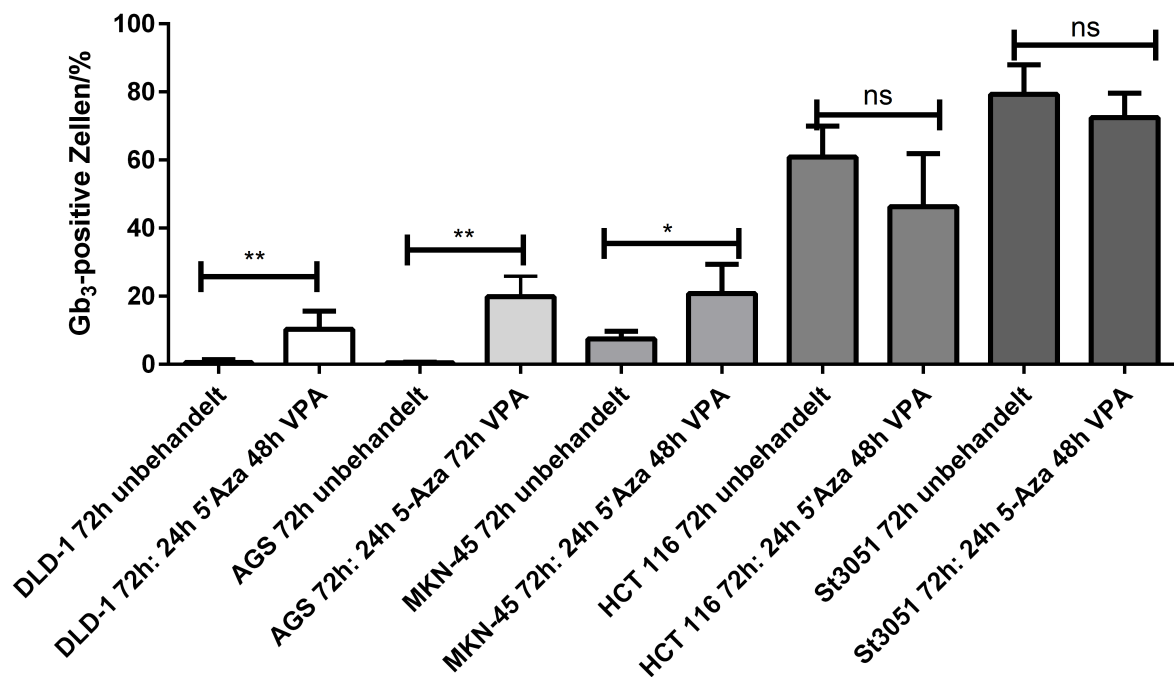


Abbildung 15: Gb₃-Oberflächenexposition nach sequentieller Behandlung mit 1µM 5-Aza-2'-desoxycytidin und 1mM Valproat.

DLD-1, AGS, MKN-45, HCT 116 sowie St3051 wurden sequentiell 24h mit 1µM 5-Aza-2'-desoxycytidin und 48h mit 1mM Valproat bzw. mit deren Lösungsmitteln DMSO und PBS behandelt, danach Gb₃ mit StxB-Cy3 auf Eis gefärbt und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Fehlerbalken entsprechen SD von n=3-7 Messungen.

Abbildung 16 zeigt eine Immunfluoreszenzmikroskopie von Zellen der Linien DLD-1 und AGS, die sequentiell mit 5-Aza-2'-desoxycytidine und Valproat bzw. mit deren Lösungsmitteln DMSO und PBS behandelt wurden. DLD-1 und AGS Zellen zeigen hierbei eine deutliche StxB-Cy3 Färbung nach sequentieller Behandlung mit den epigenetikmodifizierenden Substanzen, was die Daten der Durchflusszytometrie bestätigt. Mittels StxB-Cy3 gefärbtes Gb₃ wird rot, die Nuclei gefärbt mittels DAPI blau dargestellt.

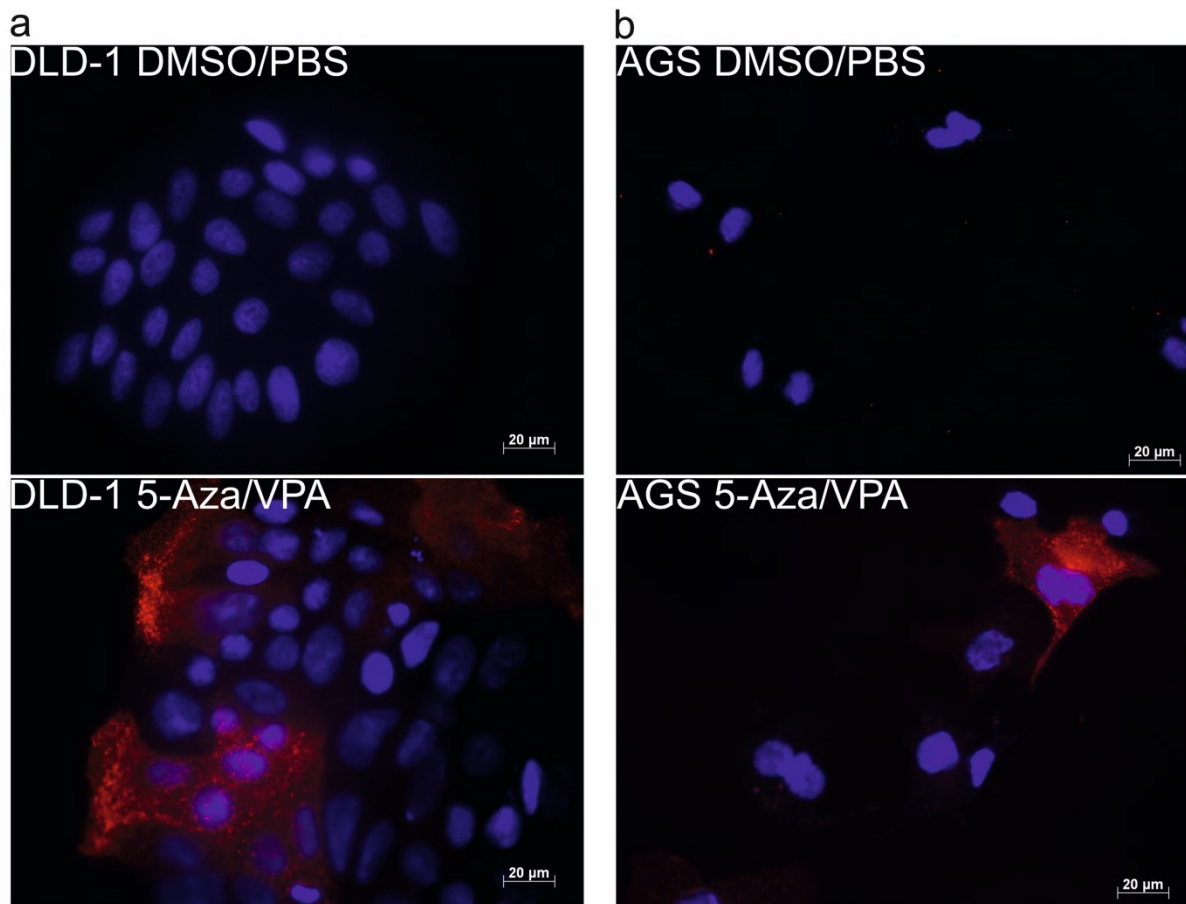


Abbildung 16: Reexpression von Gb₃ nach Behandlung mit 5-Aza-2'-desoxycytidin und Valproat.

DLD-1 (a) und AGS (b) wurden sequentiell 24h mit 1 µM 5-Aza-2'-desoxycytidin und 48h mit 1mM Valproat (unten) bzw. mit deren Lösungsmitteln DMSO und PBS (oben) behandelt, danach Gb₃ mit StxB-Cy3 auf Eis gefärbt und die Zellen immunfluoreszenzmikroskopisch visualisiert. StxB-Cy3 (Gb₃) ist in Rot, DAPI (Nuclei) in Blau dargestellt.

Die im mutmaßlichen Promotor sowie die in Exon 2 gelegene CpG-reichen Sequenzen wurden mittels Bisulfitsequenzierung in unbehandelten DLD-1 sowie St3051 Zellen analysiert. Dabei wiesen die Gb₃-defizienten DLD-1 im Vergleich zu Gb₃-profizienten St3051 Zellen eine diskrete Hypermethylierung der Promotorregion auf, während die Sequenz in Exon 2 eine für Alu-Repeats typische generalisierte Hypermethylierung zeigte (Abbildung 17).

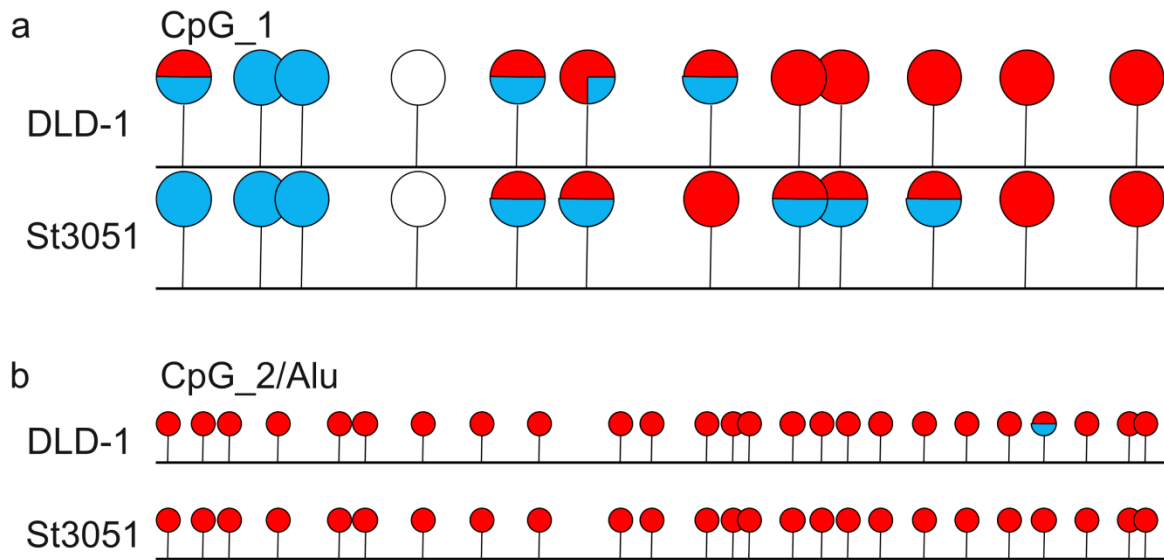


Abbildung 17: Bisulfitsequenzierung der Regionen CpG_1 und CpG_2/Alu.

Bisulfitkonvertierte DNA von DLD-1 (oben), einer Gb₃-negativen, und St3051 (unten), einer Gb₃-positiven Linie, wurde mittels PCR amplifiziert und danach sequenziert (n=3-4). Rote Kreisanteile symbolisieren methylierte, blaue unmethylierte Cytosinbasen. In CpG_1 (a) zeigt sich eine diskrete Hypermethylierung der Cytosinbasen von DLD-1 gegenüber St3051, wohingegen CpG_2 die für ein Alu-Repeat typische generelle Hypermethylierung bei beiden Linien zeigt.

6.1.4 Generierung eines genetischen A4GALT-Defizienzmodells mittels CRISPR/Cas9

Zur weiteren Untersuchung der Relevanz von A4GALT für die Gb₃-Biosynthese sowie zur Erfassung der zellbiologischen Implikationen der Gb₃-Defizienz wurde mittels des CRISPR/Cas9-Systems ein genomischer Knockout des A4GALT-Genes durchgeführt. Cas9 ist eine Endonuklease, die sogenannte „protospacer adjacent motifs“ (PAM-Regionen) in der DNA erkennt und bei Bindung der mitgeführten guideRNA (gRNA bzw. sgRNA) einen DNA-Doppelstrangbruch an den gRNA-Bindungspartnern zwischen Base 17 und 18 der gRNA-Sequenz herbeiführt. Dies führt über nichthomologe Endverbindungen der entstehenden DNA-Fragmente zu kleinen Insertionen oder Deletionen (Indels), sodass es zu einer Leserasterverschiebung des codierenden Bereiches kommen kann, wenn die Indels eine Länge besitzen, die nicht dem Vielfachen von drei Basen entspricht. Dadurch kann es zu frühzeitigem Proteinsynthesestopp durch Entstehung eines neuen Stopcodons kommen. (Ran et al., 2013)

Die gRNA wurden dabei mittels des CRISPR Design Onlinetools erstellt, das eine möglichst hohe Effizienz des Konstruktes bei möglichst geringen unspezifischen Schnittstellen außerhalb der eigentlichen Zielregion sicherstellt. (Zhang, 2015) Essentiell für den genomischen

Knockout bei der Erstellung der gRNA ist weiterhin ein möglichst nah am Beginn der codierenden Sequenz gelegene Schnittstelle, um Restaktivität des entstehenden Proteins auszuschließen. Abbildung 18 zeigt die Bindungsstellen der gRNAs A1 und A2 sowie deren Cas9-Schnittstellen auf dem kodierenden Exon 2 des A4GALT Genes.

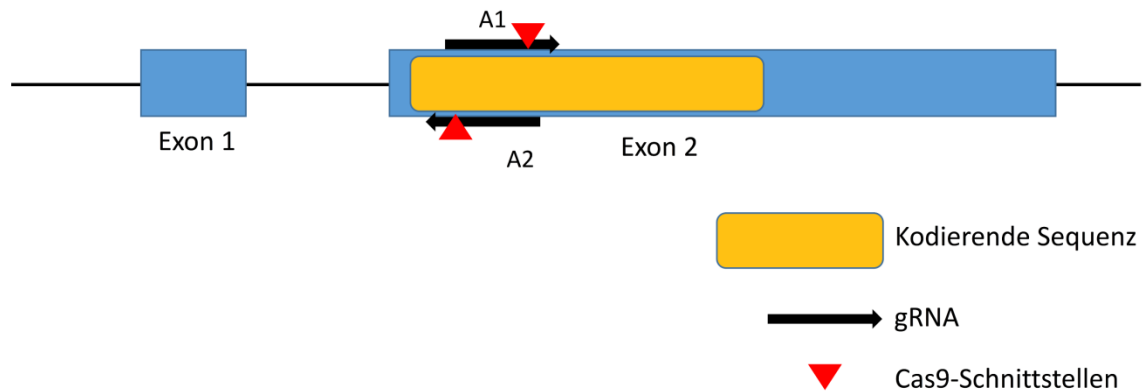


Abbildung 18: Schematische Darstellung der gRNA-Bindungsstellen und Cas9-Schnittstellen im A4GALT-Gen.

gRNA A1 bindet in Leserichtung an eine Sequenz der kodierenden Region in Exon 2, gRNA A2 entgegengesetzt dazu.

Nach Klonierung der gRNAs in das Cas9-Plasmid mit Puromycinresistenzkassette erfolgte die transiente Transfektion in Gb₃-positive HCT 116-Zellen mit nachfolgender Puromycinselektion wie im Methodenteil beschrieben. Anschließend an Selektion und monoklonale Anzucht zur Generierung einzelner Zellklone wurden die zuvor transfizierten und selektierten Zellen mittels Durchflusszytometrie und Next Generation Sequencing analysiert. Dazu wurde zunächst genomische DNA der erzeugten Linien sowie der Ursprungszelllinie HCT 116 extrahiert, die Cas9-Schnittstellen enthaltende Region auf Exon 2 mittels PCR amplifiziert und das entstandene Produkt aus dem Elektrophoresegel aufgereinigt. Das Purifikat wurde an die MGH DNA Core Unit zur Next Generation Sequenzierung übergeben. Bei Klon A1-6 zeigte sich eine 67 Basenpaare lange Insertion auf beiden Allelen, während Klon A2-3 eine heterozygote 1 Basenpaar lange Insertion aufwies. Die Insertionen erfolgten wie erwartet jeweils zwischen Base 17 und 18. In beiden Linien führen diese Veränderungen zu einer Verschiebung des Leserasters und zu einem frühzeitigen Translationsstopp (Abbildung 19).

HCT 116 Wildtyp:

CGGCTTCAAGTTCACGTTTTTCGTCTCCAT**A**CGTGATCTACTGGCACGTTGTGGGAGAGCCCAAGGAGAAAGG
GGCAGCTCTATAACCTGCCAGCAGAGATCCCCTGCCCCACCTTGACACCCCCACCCACCCTCCCACGGCC
CCACTCCAGGCAACATCTTCTTCTGAGACTTCAGACCCGGACCAACCCCAACTTCTGTTCATGTGC
Vorhergesagtes Protein: 347-353 Aminosäuren

Klon A1-6: 67bp Insertion

CGGCTTCAAGTTCACGTTTTTCGTCTCCAT**CACTGATCTACTGGCACGTTCCGTCGTGGTCCCTTATAGTCCATGGT**
GGCACCGGTCCAACCTGAAAAAAGTGATTTTCAGGCAGGTGTGTGGGAGAGCCCAAGGAGAAAGGGCAGCT
CTATAACCTGCCAGCAGAGATCCCCTGCCCCACCTTGACACCCCCACCCACCCTCCCACGGCCCCACTCC
AGGCAACATCTTCTTCTGAGACTTCAGACCCGGACCAACCCCAACTTCTGTTCATGTGC
Vorhergesagtes Protein: 75 Aminosäuren; Leserasterverschiebung

Klon A2-3: 1bp Insertion Allel 1:

CGGCTTCAAGTTCACGTTTTTCGTCTCCAT**CACTGATCTACTGGCACGTT**GTGGGAGAGCCCAAGGAGAAAG
GGCAGCTCTATAACCTGCCAGCAGAGATCCCCTGCCCCACCTTGACACCCCCACCCACCCTCCCACGGC
CCCACTCCAGGCAACATCTTCTTCTGAGACTTCAGACCCGGACCAACCCCAACTTCTGTTCATGTGC
Vorhergesagtes Protein: 53 Aminosäuren; Leserasterverschiebung

Klon A2-3: 1bp Insertion Allel 2:

CGGCTTCAAGTTCACGTTTTTCGTCTCCAT**CGT**TGATCTACTGGCACGTTGTGGGAGAGCCCAAGGAGAAAG
GGCAGCTCTATAACCTGCCAGCAGAGATCCCCTGCCCCACCTTGACACCCCCACCCACCCTCCCACGGC
CCCACTCCAGGCAACATCTTCTTCTGAGACTTCAGACCCGGACCAACCCCAACTTCTGTTCATGTGC
Vorhergesagtes Protein: 53 Aminosäuren; Leserasterverschiebung

Abbildung 19: Next Generation Sequencing der Schnittstellenregionen von gRNA A1 und A2. Genomische DNA von HCT 116 Wildtypzellen sowie der Klone A1-6 und A2-3 wurde extrahiert, die Schnittstellenregionen der Cas9 mittels PCR amplifiziert und die entstehenden Amplicons zur NGS-Analyse an die MGH DNA Core Unit eingesendet. HCT 116 besitzt zwei unterschiedliche A4GALT-Allele, wobei eines statt einem Guanin ein Adenin in der kodierenden Sequenz besitzt. Diese Sequenzabweichung ist in der Literatur als rs11541159 referenziert. Das entstehende Protein besitzt an dieser Stelle ein Methionin statt einem Valin, was anhand von *in silico*-Analysen funktionell toleriert wird. Klon A1-6 besitzt eine homozygote 67 Basenpaare lange Insertion, während Klon A2-3 heterozygote Insertionen mit je einem Basenpaar Länge besitzt. In beiden Fällen führt dies durch Leserasterverschiebungen zu einem vorzeitigen Translationsstopp bei 75 Aminosäuren (A1-6) bzw. 53 Aminosäuren (auf beiden Allelen von A2-3).

Die Gb₃-Oberflächenexposition der Linien wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen und bestätigte die genomische A4GALT-Defizienz auch hinsichtlich des Stoffwechselprodukts des Enzyms. Beide Klone enthielten weniger als 0,4 Prozent an Signalen jenseits des Grenzwertes M1, der mittels Gb₃-defizienten DLD-1 Zellen definiert wurde als weniger als 1 Prozent positiven Signalen, was mutmaßlich unspezifischer Färbung entspricht. Damit waren die Klone per definitionem Gb₃-defizient. Abbildung 20 zeigt Histogramme der Klone A1-6 und A2-3 gegenüber parental HCT 116-Zellen hinsichtlich Intensität der Färbung mit StxB-Cy3.

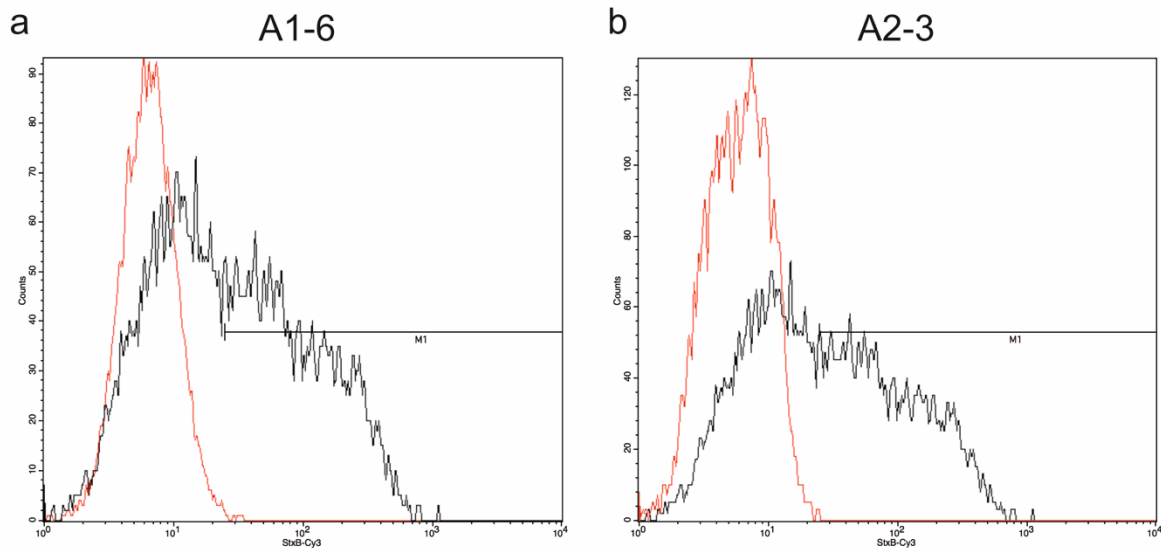


Abbildung 20: Gb₃-Oberflächenexposition der Linien A1-6 und A2-3 im Vergleich zu HCT 116 Wildtypzellen (Histogramme).

Die Zellen wurden mittels StxB-Cy3 auf Eis gefärbt. A1-6 (a) und A2-3 (b) sind jeweils durch rote Linien markiert, HCT 116 Wildtypzellen durch schwarze. A1-6 und A2-3 zeigen keine relevante Gb₃-Oberflächenexposition, die durch Ereignisse jenseits des Markers M1 angezeigt werden.

Die mRNA-Expression des mutierten A4GALT-Transkriptes unterschied sich nicht signifikant von der Expression der Wildtyp-A4GALT unmutierter, parentaler HCT 116 Zellen. Somit gab keinen Hinweis auf sog. „Nonsense-mediated RNA decay“ (Abbildung 21).

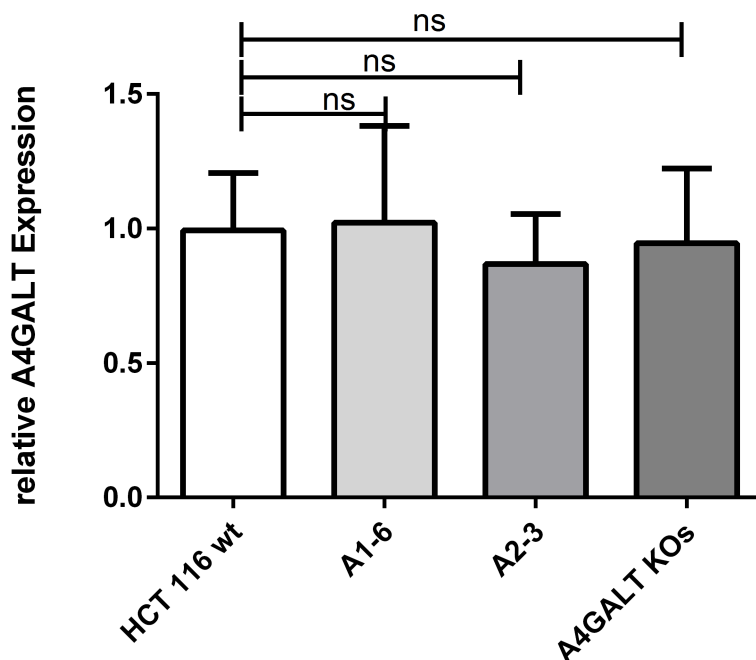


Abbildung 21: Expression der mutierten im Vergleich zu parentaler A4GALT mRNA.

Die mRNA-Expression der mutierten A4GALT-Transkripte unterschied sich nicht signifikant von der mRNA-Expression unmutierter A4GALT in Wildtypzellen. Somit findet sich kein Hinweis auf „Nonsense-mediated RNA decay“. Fehlerbalken entsprechen SD von n=4 Messungen.

6.2 Teil II: Bedeutung von Gb₃ für Entstehung und Progression gastrointestinaler Karzinome

Die Versuche in diesem Abschnitt wurden teils in Zusammenarbeit mit Herrn Chirstoph Barz erarbeitet (Barz, 2020). Entsprechende Ergebnisse werden an dieser Stelle der Vollständigkeit halber kurz beschrieben und werden in einer zukünftigen Arbeiten näher aufgearbeitet, die jeweiligen Abbildungen finden sich im Anhang mit entsprechender Urheber- und Beitragsangabe.

6.2.1 Migration und Invasion der Krebszellen

Mittels der beiden mit CRISPR/Cas9 generierten Linien A1-6 sowie A2-3 wurden vermutete phänotypischen Unterschiede A4GALT- und damit Gb₃-profizienter im Vergleich zu A4GALT- und Gb₃-defizienten Krebszellen untersucht. Migration und Invasion wurden mittels standardisierter Porenigrations-, 2D-Migrations- und Matrigelinvasionstest erfasst.

Bei der Migration durch 8µM durchmessenden Poren des Transwell-Tests zeigte sich eine deutlich und signifikant verminderte Durchwanderungsfähigkeit der A4GALT-defizienten Zelllinien A1-6 und A2-3 im Vergleich zur Ursprungslinie HCT 116 ($p=0,002$). Die Reduktion der Migrationskapazität beider Linien betrug mehr als 85% im Vergleich zu Wildtypzellen (Anhang A 1).

Zweidimensionales Wanderungsverhalten wurde basierend auf einem „Wundheilungstest“ in standardisierten Zellkulturkammern mit zuvor durch Mitomycin C in ihrer Teilungsfähigkeit gehemmten Zellen durchgeführt. Es zeigte sich eine deutlich geringere Migrationgeschwindigkeit, vor allem hinsichtlich A1-6 im Vergleich zur parentalen Linie ($p=0,005$), der auch bei Zusammenfassung von A1-6 und A2-3 Signifikanz erreichte ($p=0,03$). Als Maß für die 2D-Migrationsfähigkeit wurde der Zellfrontabstand nach 19 Stunden relativ zum Ausgangsabstand verwendet, da hier sichergestellt werden konnte, dass sich die Zellfronten gerade so noch an keiner Stelle berührten (Anhang A 2). Zu erwähnen ist, dass die Ausgangsabstände trotz standardisierter Testkammern insbesondere bei den A4GALT-defizienten Linien stark voneinander abwichen sowie die entstehenden Zellfronten ausgangs nicht homogen und glattrandig waren, was die Standardabweichung der Versuchsergebnisse und damit den statistischen Test

beeinflusst haben könnte. Dies könnte durch eine vergleichsweise geringe Zelladhäsionsfähigkeit der A4GALT-defizienten Linien begründet sein.

Invasionskammern kamen zum Einsatz, um das Invasionsverhalten A4GALT-defizienter Zellen in extrazellulärer Matrix zu untersuchen. In diesem Verfahren dringen die Zellen entlang eines Serumgradienten in eine Matrigelmatrix ein, die menschlichem kollagenhaltigem Tumorstroma ähnelt. Die „Knockout“-Klone drangen in signifikant geringerem Ausmaß in die Matrix ein als ihre Ursprungszelllinie ($p=0,01$), die Reduktion betrug 59%. Für sich genommen war aber lediglich die Invasion von Klon A2-3 signifikant vermindert ($p=0,015$), während Klon A1-6 die Signifikanz knapp verfehlte ($p=0,07$) (Anhang A 3).

6.2.2 Proliferation, klonogenes Überleben und Chemotherapieansprechen

Zur weiteren Evaluation der Bedeutung von A4GALT für die Tumorzelle wurden zelluläres Absterben, Proliferation, klonogenes Überleben, verankerungsunabhängiges Zellwachstum sowie Chemotherapieansprechen untersucht.

Um zu untersuchen, ob die Zellen während konventionellen Wachstumsbedingungen unter Vermeidung ausgeprägter Konfluenz eine erhöhte Zelltodrate besitzen, wurde der Anteil an Debris (Zelltrümmer) sowie 7-AAD-positiven Zellen untersucht. Debris ist hierbei als Indikator für spätapoptotischen und nekrotischen Zellzerfall zu betrachten. A1-6 und A2-3 unterschieden sich nicht signifikant von HCT 116 Zellen ($p=0,11$ für A1-6; $p=0,526$ für A2-3 und $p=0,586$ für beide „Knockouts“ zusammengenommen) (Abbildung 22).

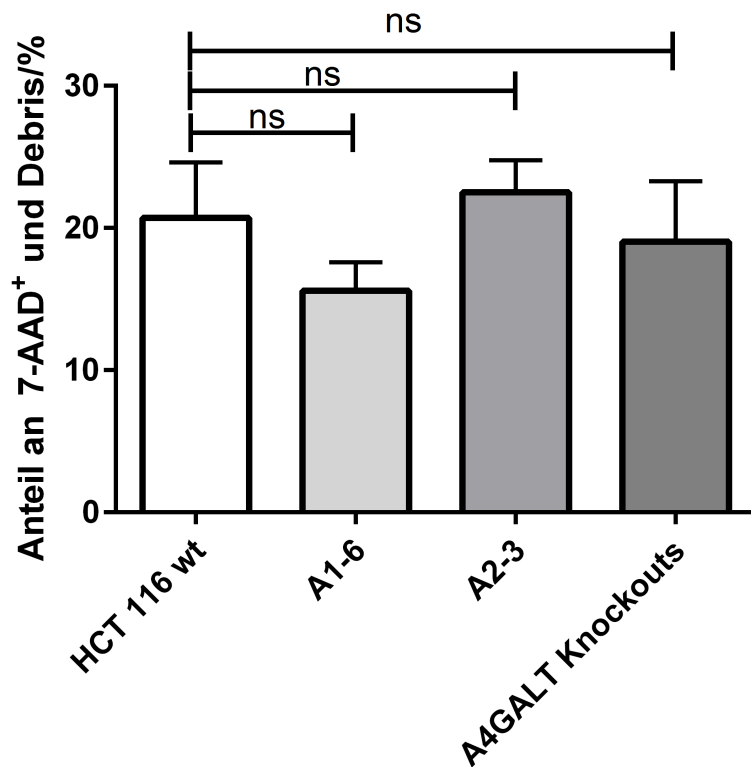


Abbildung 22: Anteil an 7-AAD-positiven Zellen und Zelldebris der Knockoutlinien im Vergleich zu parentalen HCT 116 Zellen.

Linien A1-6 und A2-3 unterschieden sich nicht signifikant ($p=0,11$ für A1-6; $p=0,5263$ für A2-3 und $p=0,5856$ für die Knockouts) im Gehalt an Debris und 7-AAD-positiven Zellen als Indikator für nekrotische und spätapoptotische Zellen ($n=3$).

Ein XTT-Proliferationstest zur Erfassung des Wachstumsverhaltens zeigte keine signifikanten Unterschiede der Linien A1-6 sowie A2-3 und Wildtypzellen ($p=0,7170$ für A1-6 bzw. $p=0,8438$ für A2-3 und $p=0,8781$ für die Knockouts zusammengenommen; Abbildung 23).

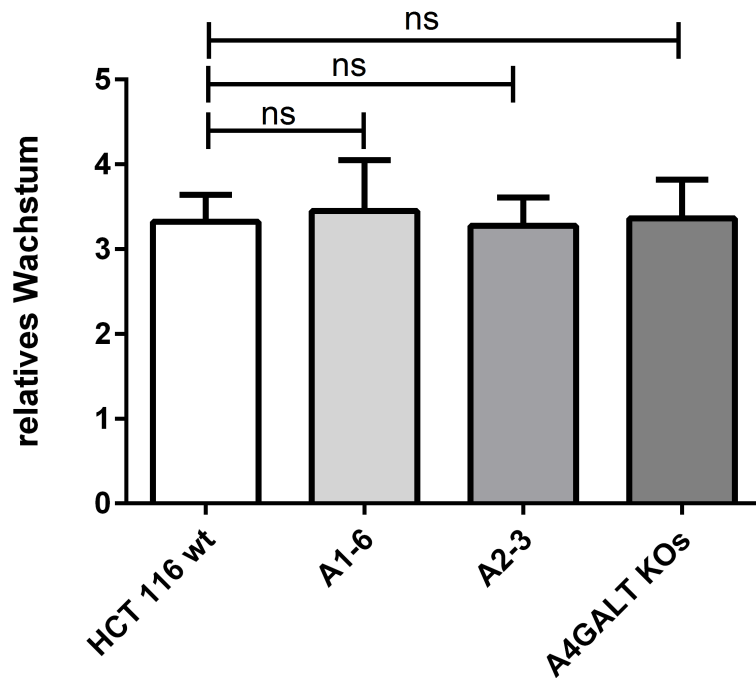


Abbildung 23: Relatives Zellwachstum der Linien A1-6 und A2-3 im Vergleich zu parentalen HCT 116-Zellen.

Das Wachstumsverhalten wurde XTT-basiert nach oben genanntem Vorgehen untersucht. Linien A1-6, A2-3 und beide zusammengenommen unterschieden sich nicht signifikant von HCT 116 Wildtypzellen ($p=0,7170$ für A1-6 bzw. $p=0,8438$ für A2-3 und $p=0,8781$ für die Knockouts zusammengenommen) ($n=4$). Fehlerbalken repräsentieren SD der Messungen.

Die A4GALT-defizienten Klone wiesen einen Trend in Richtung höherer Koloniebildung gegenüber den nicht mutierten Zellen aus, der allerdings keine Signifikanz erreichte, und keine Unterschiede im mittels eines Fokusbildungs oder „Soft Agar“ Tests quantifizierten verankerungsunabhängigen Zellwachstum auf (Anhang A 4 bzw. A 5). Auch die zytotoxische Wirksamkeit von 5-Fluorouracil unterschied sich nicht signifikant zwischen parentalen HCT 116 Zellen und den A4GALT-defizienten Linien (Anhang A 6 und Tabelle T 1)

6.2.3 Auswirkungen des Gb₃-Gehalts auf die Oberflächenexposition der publizierten Interaktionspartner Hsp70 und P-gp

Hypothese für die hier durchgeführten Untersuchungen war, dass eine Erhöhung des Zelloberflächengehalts an Gb₃ einen Anstieg des membranären Proteins Hsp70 zur Folge hat, während eine Verminderung von Gb₃ zur Reduktion von membranärem Hsp70 führt.

Membranäres Hsp70 wurde in Durchflusszytometrie mittels des cmHsp70.1 Antikörpers in den Zelllinien DLD-1 (Gb₃-defizient), MKN-45 (niedrige Gb₃-membranexposition) sowie HCT 116 (hohe Gb₃-membranexposition) quantifiziert.

Auf DLD-1-Zellen wurde die Hsp70 Exposition durch Behandlung mittels 5-Aza-2'-desoxycytidin von initial 72% auf 92% der Zellen signifikant erhöht ($p=0,016$), während es bei Gb₃ zu einer Reexpression auf 10% der Zellen kam ($p=0,012$). Die Magenkrebs-Zelllinie MKN-45 zeigte initial 31% Hsp70-positive Zellen und 7,5% Gb₃-positive Zellen, durch Behandlung erhöhten sich diese Werte signifikant auf 72% bzw. 20,8% ($p=0,0286$ bzw. $p=0,0317$). In HCT 116 Zellen kam es zu einer Steigerung des membranären Hsp70 von 60% auf 80% ($p=0,057$), die sich wie die Gb₃-Membranexpression nicht signifikant veränderte (61% vor bzw. 46% nach Behandlung; $p=0,222$) (Abbildung 24). Tabelle 17 zeigt die Auswirkungen der epigenetischen Behandlung in cmHsp70.1-Gb₃-Doppelfärbung.

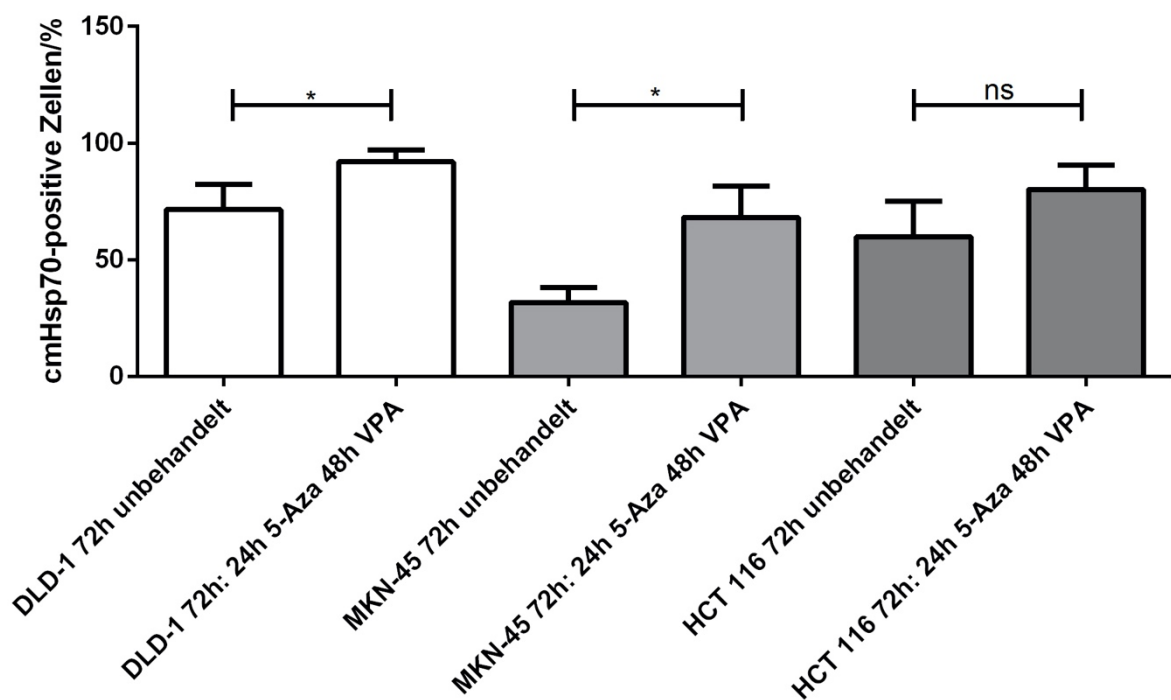


Abbildung 24: Auswirkungen epigenetischer Modifikation auf die membranäre Hsp70-Exposition verschiedener gastrointestinaler Zelllinien.

DLD-1, MKN-45 und HCT 116 Zellen wurden sequentiell für 24h mit 1µM 5-Aza-2'-desoxycytidin und 48h mit 1mM Valproat bzw. mit deren Lösungsmitteln DMSO und PBS behandelt, danach membranäres Hsp70 mit dem cmHsp70.1-Antikörper auf Eis gefärbt und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert (n=4-6). Fehlerbalken entsprechen SD der Messungen.

Tabelle 17: Auswirkungen epigenetischer Modifikation mittels 5-Aza-2'-desoxycytidin und Valproat auf Gb₃, membranäres Hsp70 sowie Koexpression.

↑↑: starke Erhöhung, ↑: diskrete Erhöhung, ↓: diskrete Verminderung, -: keine Veränderung

Zelllinie	cmHsp70.1-positive	Gb ₃ -positive	Doppelt positive
DLD-1	↑↑	↑↑	↑↑
MKN-45	↑↑	↑↑	↑↑
HCT 116	↑	↓	-

Nachfolgend wurde die Auswirkung der stabilen, genetischen A4GALT-Defizienz auf die Exposition von Hsp70 auf der Zelloberfläche als weniger fehleranfällige, da ohne das Chemotherapeutikum 5-Aza-2'-desoxycytidin auskommende, Methode zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen membranärem Hsp70 und Gb₃ herangezogen. In den Linien A1-6 bzw. A2-3 war ein Anteil von 45,0% bzw. 63,0% Hsp70-positiv (die Knockouts zusammengenommen 54,0%), auf der Ursprungszelllinie 57,5%. Weder A1-6 (p=0,25), noch A2-3 (p=0,61) bzw. die A4GALT-defizienten Zellen zusammengenommen (p=0,72) unterschieden sich signifikant von parentalen HCT 116 Zellen hinsichtlich Hsp70 Oberflächenexposition (Abbildung 25).

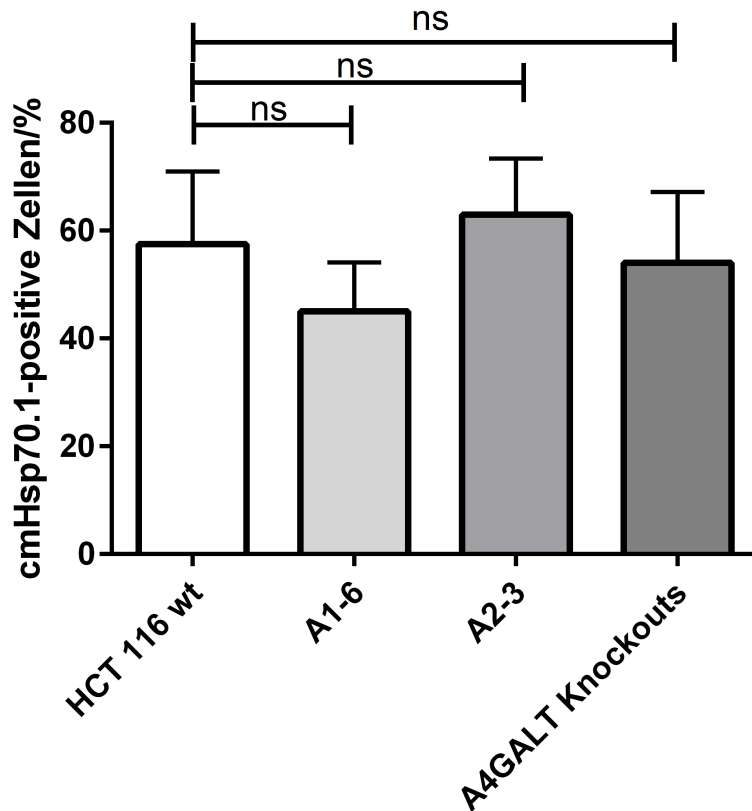


Abbildung 25: Auswirkungen der Gb₃-Defizienz der Linien A1-6 und A2-3 auf die Membranexposition von Hsp70.

Membranäres Hsp70 wurde mit dem cmHsp70.1-Antikörper auf Eis gefärbt und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die durch CRISPR/Cas9 generierten, A4GALT-defizienten Linien weisen keine signifikant unterschiedliche Exposition von Hsp70 auf ihrer Membran auf. Fehlerbalken entsprechen SD von n=3 Messungen.

HCT 116 sowie die A4GALT-defizienten Linien wiesen in einer durchflusszytometrischen Analyse keine Membranexposition des ABC-Transporters und publizierten Gb₃-Interaktionspartner P-gp auf (Abbildung 26).

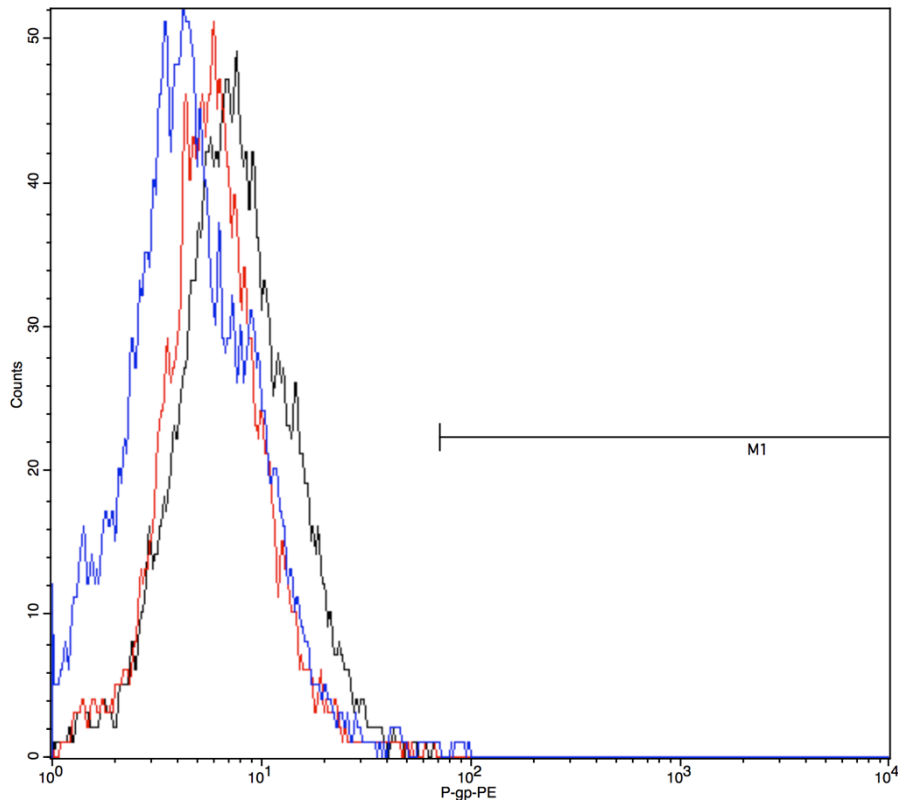


Abbildung 26: Durchflusszytometrische Analyse der P-gp-Membranexposition von HCT 116 sowie den Linien A1-6 und A2-3 (Histogramm). HCT 116 Wildtypzellen (schwarz), A1-6 (rot) und A2-3 (blau) weisen keine mittels Durchflusszytometrie messbare P-gp-Membranexposition auf.

6.2.4 A4GALT-Defizienz und Glykosphingolipidsynthese

A4GALT befindet sich an einem bedeutenden Kreuzungspunkt der Glykosphingolipidbiosynthese. Um etwaige Auswirkungen der epigenetisch bewirkten Reexpression bzw. der genetischen Defizienz von A4GALT zu evaluieren wurde das Schrittmacherenzym der Glykosphingolipidbiosynthese, Glucosylceramidsynthase (GCS), hinsichtlich mRNA-Expression analysiert.

Zur Untersuchung des Effektes der A4GALT und damit der Gb₃-Reexpression auf die GCS wurden DLD-1 Zellen verwendet, die mit 1µM 5-Aza-2'desoxycytidin oder 1mM Valproat bzw. sequentiell 24h mit 1µM 5-Aza-2'desoxycytidin und 48h mit 1mM Valproat behandelt wurden, verwendet. Weder bei Behandlung mit 5-Aza-2'desoxycytidin noch mit Valproat alleine ergab sich eine signifikante Änderung der GCS-Expression. Bei der sequentiellen epigenetischen Behandlung ergab sich jedoch eine deutliche und signifikante Steigerung der GCS-Expression (p=0,043; Abbildung 27).

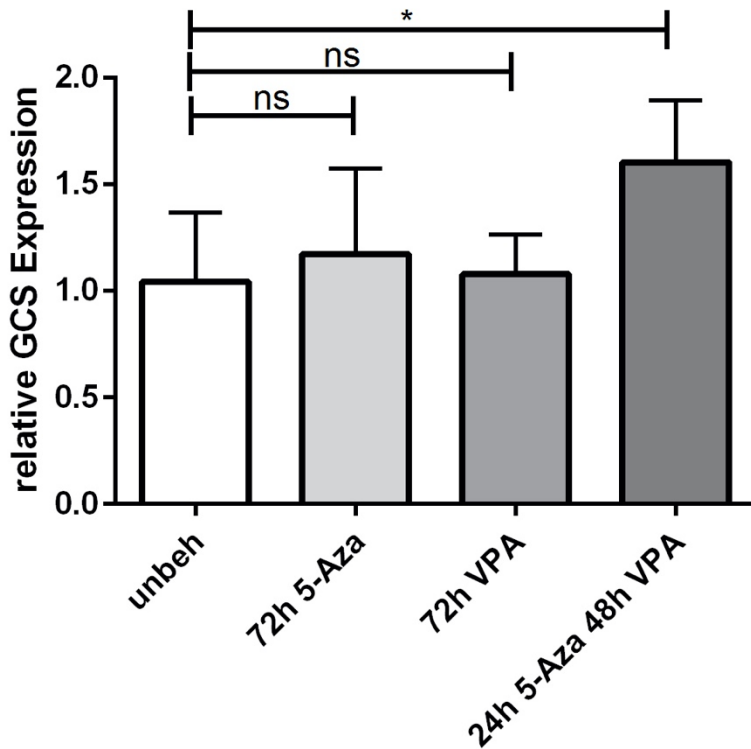


Abbildung 27: Glycosylceramidsynthase(GCS)-mRNA-Expression in A4GALT-defizienten DLD-1 Zellen vor und nach pharmakologischer Epigenetikmodifikation.

Die GCS-mRNA-Expression wurde mittels qrtPCR quantifiziert. Bei sequentieller Behandlung für 24h mit 1 μ M 5-Aza-2'-desoxycytidin und 48h mit 1mM Valproat, wurde die GCS-Expression signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gesteigert ($p=0,043$), während bei alleiniger Behandlung mit 1mM Valproat ($p=0,87$) oder 5-Aza-2'-desoxycytidin ($p=0,63$) keine signifikanten Veränderungen der GCS-Expression auftraten. Die GCS-Expression folgt damit gleichsinnig der zuvor beschriebenen Reexposition von Gb₃ auf der Zelloberfläche. Fehlerbalken entsprechen SD von n=3-4 Messungen.

Danach wurden die Auswirkungen von A4GALT-Defizienz auf die GCS-Expression anhand der Linien A1-6 und A2-3 ergründet. Diese wiesen geringere Glucosylceramidsynthase-mRNA Expression als HCT 116 Wildtypzellen auf, wobei dieser Effekt lediglich für A2-3 Signifikanz erreichte ($p=0,37$ für A1-6 und $p=0,003$ für A2-3). Für beide Knockoutlinien zusammengenommen ergab sich ebenso eine signifikante Reduktion der GCS-Expression ($p=0,048$). Abbildung 28 zeigt die Expression der GCS der beiden Defizienzlinien im Vergleich zu Ursprungslinie.

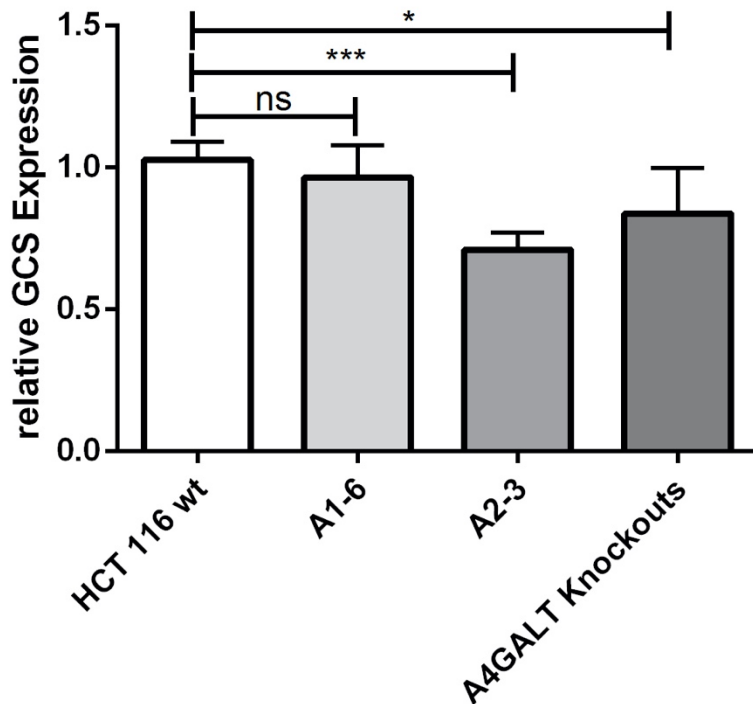


Abbildung 28: Glycosylceramidsynthase(GCS)-mRNA-Expression in den A4GALT-defizienten Linien im Vergleich zu parentalen HCT 116 Zellen.

Die GCS-mRNA-Expression wurde mittels qrtPCR quantifiziert. Insgesamt wiesen die Klone zusammen eine signifikante ($p=0,048$) sowie Klon A2-3 hochsignifikante ($p=0,003$) Reduktion der GCS-mRNA-Expression auf, während Klon A1-6 die Signifikanz verfehlte ($p=0,37$). Fehlerbalken entsprechen SD von $n=4$ Messungen.

Bei epigenetisch bedingter Reexpression von Gb₃, nicht aber bei alleiniger Wiederherstellung der A4GALT Ausprägung, fand somit eine Erhöhung, bei Knockout der A4GALT auf genomischer Ebene und damit Gb₃-Defizienz eine Verringerung der GCS-mRNA-Expression statt.

6.3 Teil III: Zielgerichtete Therapie von gastrointestinalen Tumoren mittels Shiga-Toxinen: in vitro Versuche

6.3.1 Aufnahme von Shiga-Toxin und Ausprägung von Gb₃ in Zelllinien, Gewebeschnitten und Primärkulturen gastrointestinaler Tumoren

Gb₃ wird auf Primärkulturen humaner gastrointestinaler Karzinome exprimiert. Dieser Umstand erlaubt es, die Gb₃-Oberflächenexposition teilungsfähiger Tumorzellen eines Karzinomes sowie deren StxB-Aufnahmekapazität einzuschätzen, ohne Störsignale aus den teils sehr stark Gb₃-positiven Tumorgefäßendothelien zu erhalten.

In Abbildung 29 sind Primärkulturen humaner Kolorektalkarzinome abgebildet, die mittels StxB-Cy3 unter verschiedenen Aufnahmebedingungen und unten angegebenen Antikörpern gefärbt wurden. Deutlich zu sehen ist, dass der Anteil an Zellen mit Gb₃ auf der Oberfläche starken inter- und intraindividuellen Schwankungen unterworfen ist.

Um auszuschließen, dass die durch Primärkultur kultivierte Zellen nicht den bona fide Tumorzellen, sondern Stromazellen wie Fibroblasten entsprechen, kann zusätzlich mit epithelialen Markern wie z.B. EpCAM (epitheliales Zelladhäsionsmolekül) gefärbt werden (Abbildung 29b).

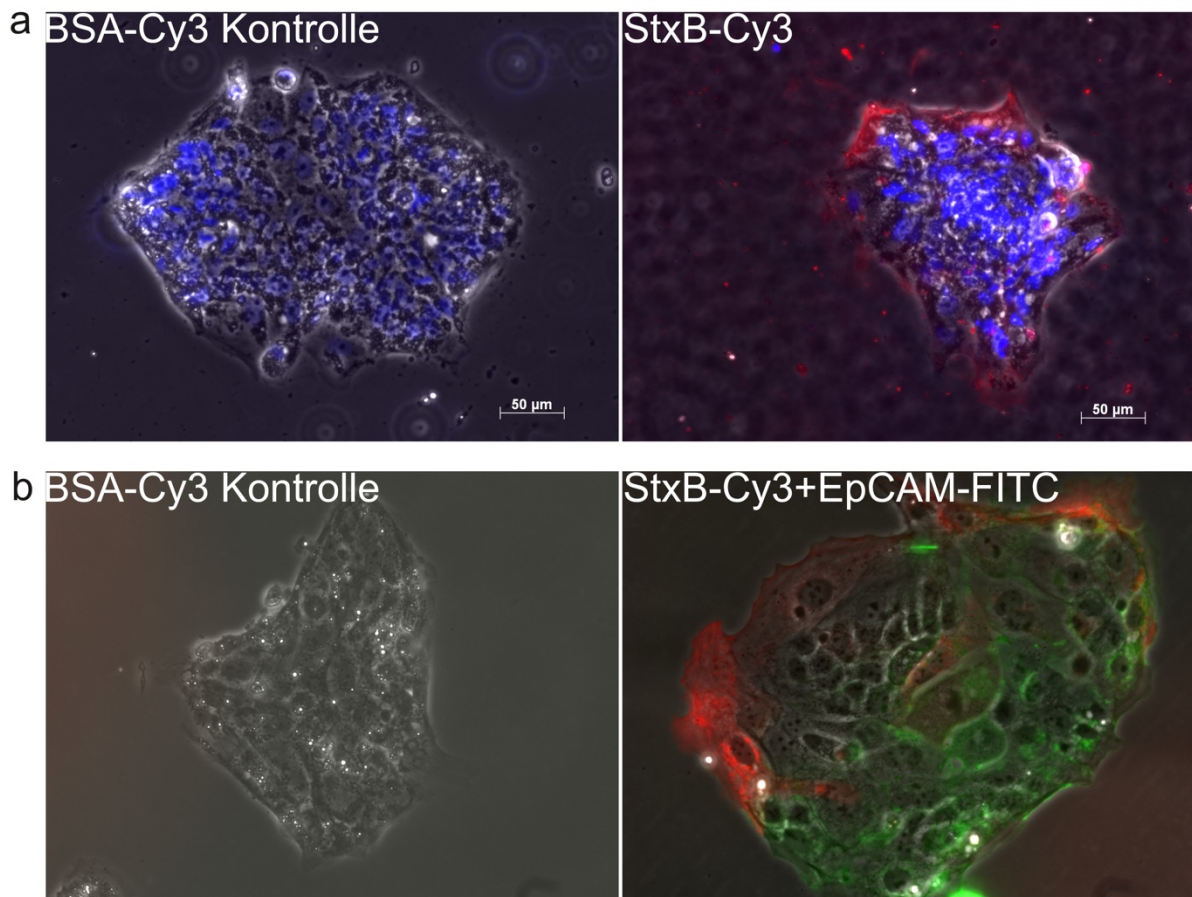


Abbildung 29: Primärkulturen von Tumorproben zweier Patienten mit Kolorektalkarzinom. Färbung von Gb₃ mittels StxB-Cy3 (rot) und Kernfärbung mittels DAPI (blau) (a) sowie von Gb₃ mittels StxB-Cy3 (rot) und EpCAM mittels murinem Anti-EpCAM-Antikörper (grün; b). Aus Kolorektalkarzinomproben wurde eine Primärkultur gemäß oben genannter Anleitung hergestellt. Nach einigen Tagen können die Primärkulturen gefärbt und mittels Immunfluoreszenz betrachtet werden, zur Identifikation epithelialer Zellen dient beispielsweise ein Anti-EpCAM-Antikörper. In Abbildung b wurde auf die DAPI-Färbung verzichtet, um eine Beeinflussung des FITC-Kanales („bleed through“) auszuschließen.

Zudem ist es möglich, die StxB-Aufnahme entlang des sog. retrograden intrazellulären Weges zu überprüfen, wie in Abbildung 30 anhand von HCT 116 Zellen veranschaulicht. Sofern die aktive Aufnahme von StxB durch Kühlung auf Eis unterbunden wird, resultiert eine Membranfärbung der Gb₃-positiven Zellen. Bereits nach 15h erfolgt die Aufnahme in membranernahe endosomale Kompartimente, die sich nach 1h weiter in Richtung Zellkern bewegen. Nach 14h zeigt sich eine Anreicherung im Golgi und perinukleären Kompartimenten, während nach 48h zusätzliche kernnahe und -ferne Strukturen angefärbt werden.

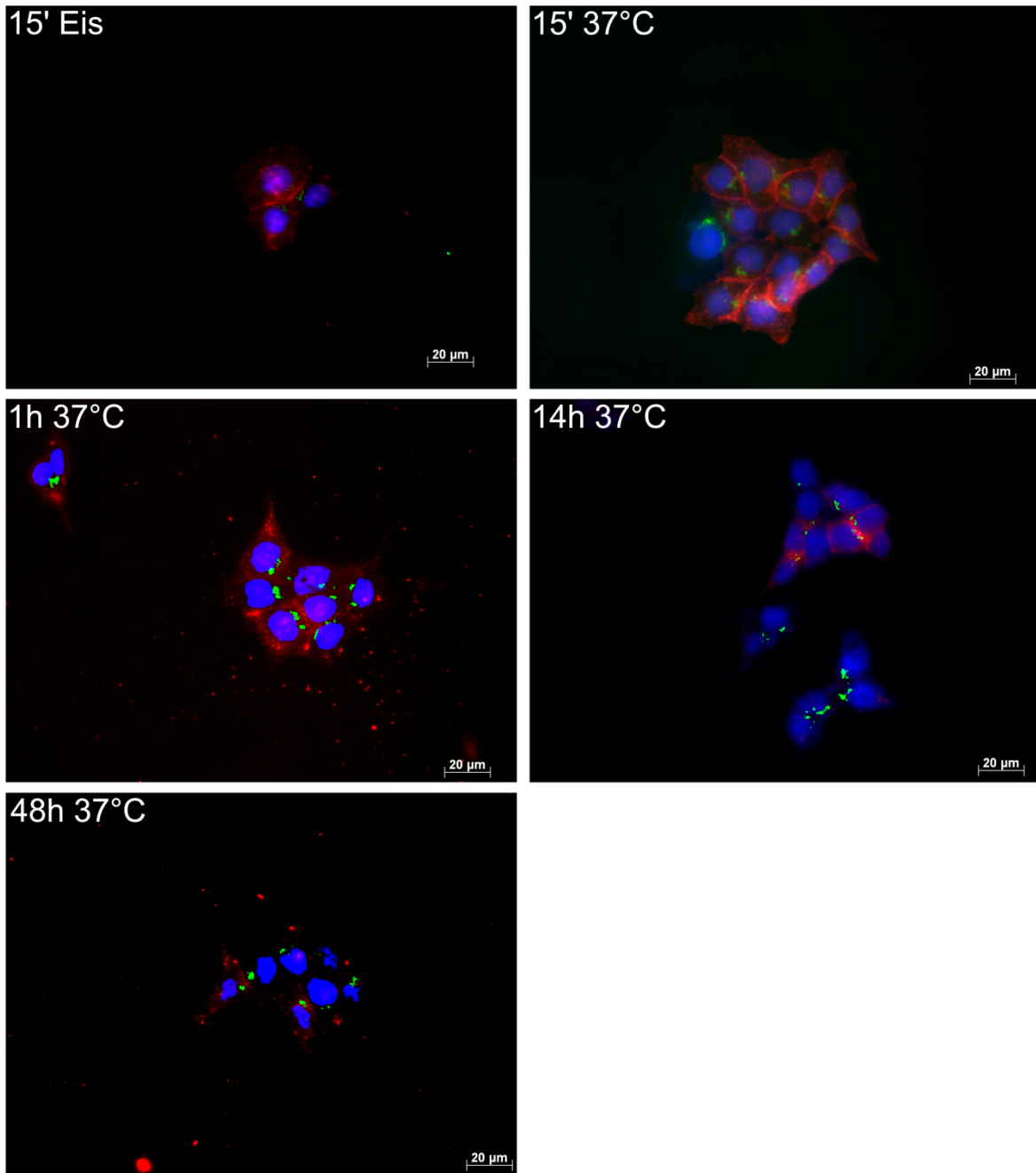


Abbildung 30: Aufnahmekinetik von StxB-Cy3 in HCT 116-Zellen.

Kerne sind in Blau (DAPI), Golgi-Kompartimente in Grün (Anti-Golgin-97), Gb₃ ist in Rot (StxB-Cy3) dargestellt. StxB-Cy3 wird entlang des retrograden Aufnahmeweges in die Zellen aufgenommen: Bei 15 min Inkubation von StxB-Cy3 auf Eis zeigt sich eine Membranfärbung, nach 15 min Inkubation bei 37°C sind erste zelluläre Einschlüsse zu erkennen, die nach 1h weiter in Richtung Zellkern wandern. Bei 14h kommt es zur deutlichen Co-Lokalisation mit kernnahen Golgi-Kompartimenten und nach 48h findet sich StxB-Cy3 neben Golgi-Kompartimenten auch in anderen kernnahen und -fernen Kompartimenten der Zelle.

Eine weitere Möglichkeit zur Abschätzung des Gehalts an Gb₃-positiven Tumorzellen stellt die Färbung von am Mikrotom erstellten Kryoschnitten humanen Karzinomgewebes dar. Mittels Antikörperfärbungen und histologischen Kenntnissen kann zwischen einzelnen

Tumorkompartimenten wie Tumorendothelien, Stroma und Stromazellen, Immun- sowie Karzinomzellen unterschieden werden. Als Beispiel für die heterogene Verteilung von Gb₃ in unterschiedlichen Kompartimenten kann die Gb₃-Ausprägung in Tumor- und Endothelzellen in Abbildung 31 herangezogen werden. Während die qrtPCR basierte Quantifizierung der A4GALT Genexpression zwar wie oben beschrieben eine gute Abschätzung des Gb₃-Gehalts der Probe liefert, erlaubt es diese für eine zukünftige therapeutische Anwendung von funktionalisiertem StxB essentielle Differenzierung nicht.

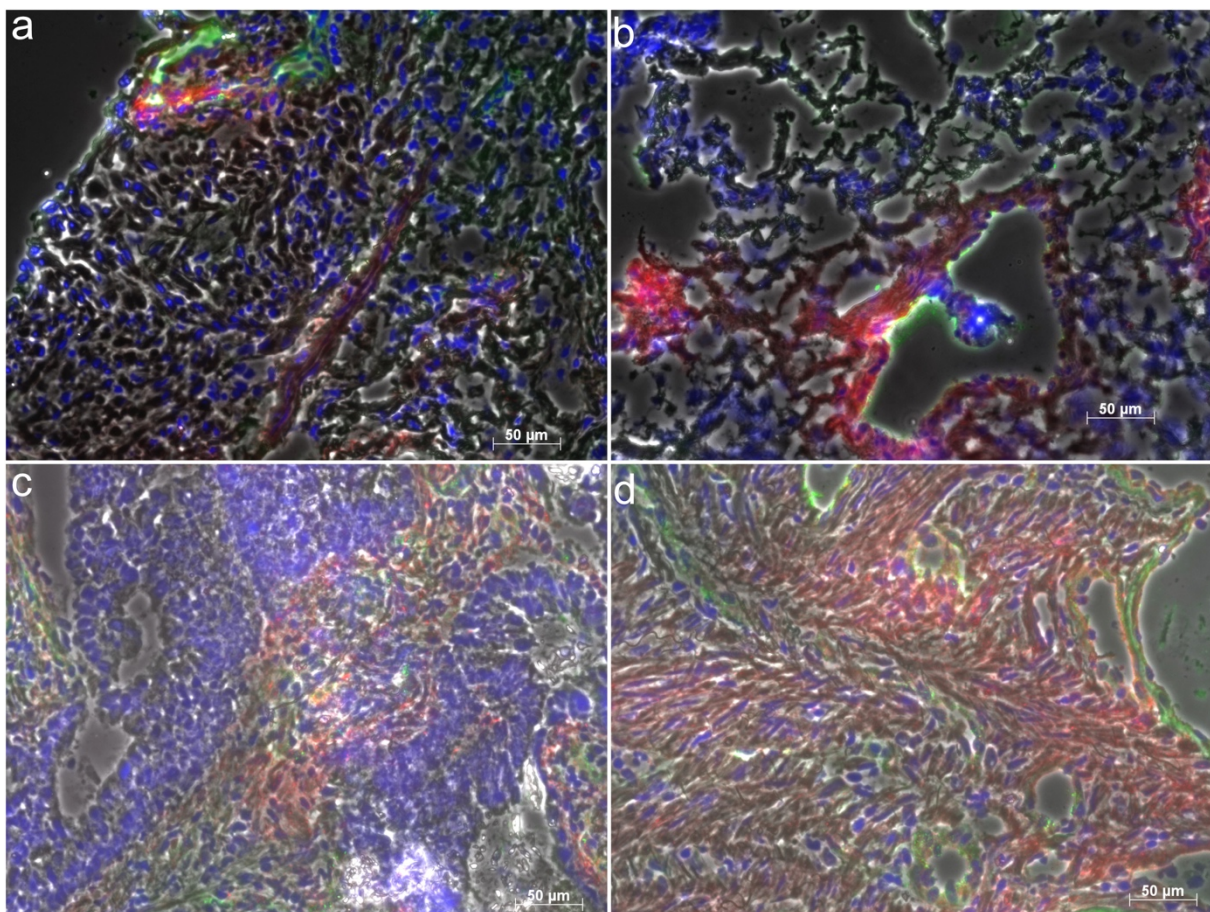


Abbildung 31: Gb₃ ist in unterschiedlichen Tumorkompartimenten lokalisiert. Kryoschnitte humaner Kolorektalkarzinome wurden mittels StxB-Cy3 (rot) und Anti-von-Willebrand-Faktor (vWF, grün) gefärbt. In a zeigt sich eine nahezu ausschließliche Gb₃-Exposition auf vWF-positiven Endothelzellen, in Gewebsschnitt b ist Gb₃-Expression im Blutgefäß (grün) sowie in geringem Ausmaß auch außerhalb zu detektieren. c zeigt allenfalls eine geringe Ausprägung im Endothel sowie eine hohe in den Tumorzellen, während d eine generalisiert starke StxB-Cy3-Färbung sowohl auf den Tumorzellen als auch in Blutgefäßen aufweist.

Um die Überprüfung auf Gb₃-Überexpression schneller und in der klinischen Praxis als Screeningmethode durchführbarer zu gestalten, wurde ein Schnellprotokoll entwickelt, das die Präparation von Schnitten für die Immunfluoreszenzmikroskopie in weniger als 60 Minuten erlaubt

(5.1 Protokolle: Schnellprotokoll für die Gb₃-Detektion mittels StxB-Cy3 auf Zellen und Gefrierschnitten in Immunfluoreszenz).

6.3.2 Behandlung mit Monomethylauristatin E gekoppeltem StxB und bakteriellen Holotoxinen Stx1 und Stx2

Mit dem Mikrotubulipolymerisationshemmer Monomethylauristatin E gekoppeltes StxB wurde als weiterer Therapieansatz anhand der A4GALT-defizienten Klone und parentalen Zellen evaluiert (Abbildung 32). Tabelle 18 gibt Auskunft über die errechneten IC₅₀-Werte der Linien HCT 116, A1-6 sowie A2-3. Zusätzlich wurden die Gb₃-defiziente Linie DLD-1 sowie die Gb₃-profiziente Linie St3051 als interne Kontrolle eingesetzt. Hierbei zeigte sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen A4GALT-defizienten und parentalen HCT 116 sowie Gb₃-profizienten St3051 Zellen. Lediglich die Gb₃-negative Linie DLD-1 wies einen höheren IC₅₀-Wert auf. Die dabei errechneten IC₅₀-Konzentrationen erscheinen jedoch im Vergleich zur Literatur als ausgenommen hoch, sodass unspezifische Aufnahme und Effluxeffekte insbesondere beim Vergleich unterschiedlicher Zelllinien nicht ausgeschlossen werden können.

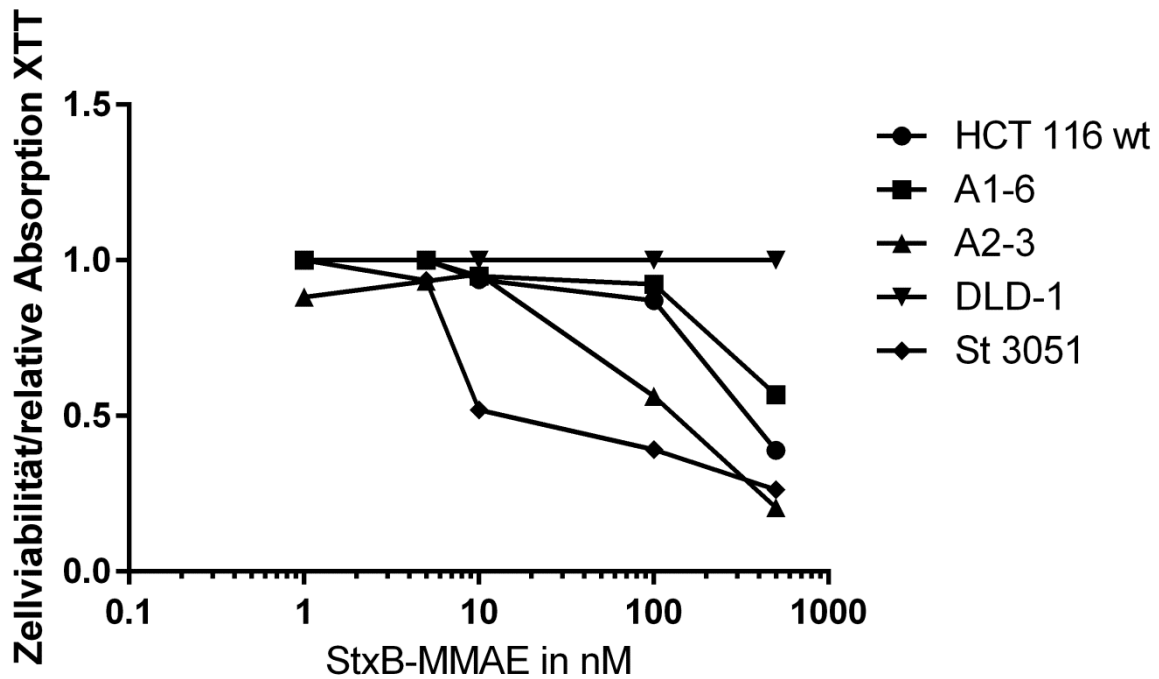


Abbildung 32: Behandlung der A4GALT-defizienten Linien sowie weiterer gastrointestinaler Zelllinien mit Monomethylauristatin E gekoppeltem StxB.

Die Zelllinien HCT 116, A1-6, A2-3, DLD-1 und St3051 wurden mit StxB-MMAE unterschiedlicher Konzentration behandelt und danach mittels eines XTT-basierten Ansatzes analysiert. Die Knockoutlinien zeigten kein wesentlich verändertes Ansprechen gegenüber StxB-MMAE im Vergleich zu ihrer Ursprungszelllinie, während DLD-1 Zellen komplett gegen die StxB-MMAE Behandlung geschützt erschienen. Die Positivkontrolle St3051 als sehr stark Gb₃-ausprägende Zelllinie wies eine Zytotoxizität im Bereich der HCT 116 Wildtyp- und der A4GALT Knockoutzellen auf (n=1).

Tabelle 18: IC₅₀-Werte und deren 95%-KI verschiedener Zelllinien bei Behandlung mit StxB-MMAE.

Zelllinie	IC ₅₀ -Wert in nM	IC ₅₀ -95%-KI in nM
HCT 116	387	245 bis 610
A1-6	711	514 bis 982
A2-3	129	75,5 bis 220
DLD-1	1,43x10 ¹³	Nicht bestimmbar
St3051	35,3	6,32 bis 198

Als Kontrolle diente weiterhin die Behandlung mittels Stx1a und Stx2a und die daraufhin erfolgende Analyse von XTT-basiertem (metabolischem) und klonogenem Zellüberleben, die von Herrn Christoph Barz durchgeführt wurde und freundlicherweise im Anhang abgedruckt werden darf (Anhang Abbildung A 7 und A 8 sowie Tabellen T 2 und T 3). Hierbei waren die

A4GALT-defizienten Klone im Vergleich zu parentalen Zellen vor der zytotoxischen Wirkung von Stx1a geschützt, während Stx2a vergleichbare Toxizität ausübte. (Barz, 2020)

7 Diskussion

Die malignen Tumoren des Gastrointestinaltrakts haben in Deutschland aufgrund ihres sehr frequenten Auftretens eine hohe epidemiologische Relevanz. So stehen die Kolorektalkarzinome bezogen auf ihre Inzidenz bei Frauen an zweiter, bei Männern an dritter Stelle aller malignen Tumoren mit insgesamt über 60.000 Fällen jährlich. Auch Pankreas- mit kumulativ etwa 18.000 und Magenkarzinome mit etwa 15.000 jährlichen Neuerkrankungen bringen eine hohe Krankheitslast für die Allgemeinbevölkerung mit sich. (Kaatsch et al., 2019) Während malignen Entartung durchlaufen die Tumorzellen mehrere Schritte an molekularen Veränderungen, hierbei spielen in erster Linie die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (wie beispielsweise APC) sowie die Aktivierung von Protoonkogenen (wie KRAS) eine entscheidende Rolle. Diese Veränderungen sind insbesondere für Kolorektalkarzinome im Rahmen der sog. Adenom-Karzinom-Sequenz gut charakterisiert (siehe hierzu auch Abschnitt 7.2 Gb₃ in der Tumorbilogie). (Bhalla et al., 2013; Brenner et al., 2014; Fearon & Vogelstein, 1990; Kaatsch et al., 2019; Shiller & Boostrom, 2015) Neben diesen klassischen, in erster Linie signalproteinbasierten Modellen, wird in der Tumorforschung zunehmend dem im Vergleich zu Normalgewebe deutlich abweichenden Krebszellmetabolismus Beachtung geschenkt, sodass dieser auch in als zusätzliches Kennzeichen der Krebsentwicklung analog zu den berühmten „hallmarks of cancer“ beschrieben wurde (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Selbst innerhalb der Tumormetabolismusforschung sind die Lipide jedoch noch vergleichsweise wenig erforscht, wobei es Hinweise gibt, dass insbesondere die GSL und hierbei Gb₃ im Speziellen, neben ihrer Rolle als mögliche Zielstruktur für gezielte Tumorthapien fundamentale Auswirkungen auf die Krebszeleigenschaften haben (hierzu mehr in Kapitel 7.2 Gb₃ in der Tumorbilogie). Am Beispiel von Gb₃ soll im Folgenden zunächst dargestellt werden, wie es zu einem veränderten Lipidexpressionsmuster in Tumorzellen kommen kann, zu welchen Veränderungen der Zelleigenschaften dies führt und wie sich die abberante Gb₃-Expression für gezielte Tumorthapie ausnutzen lässt. Danach wird ein kurzer Ausblick auf weitere Forschung im Bereich der Membranlipide geliefert.

7.1 Regulation der Gb₃-Biosynthese in Tumorzellen

Gb₃ entsteht durch die Aktivität der A4GALT aus Laktosylceramid. Bislang sind verschiedene Faktoren, die die Gb₃ Biosynthese beeinflussen beschrieben, jedoch ist noch kein allgemeiner Mechanismus postuliert worden. (Bodary et al., 2005; Jacewicz et al., 1995; Lala et al., 2000; Obrig et al., 2003; Okuda & Nakayama, 2008; Okuda et al., 2006; Stricklett et al., 2002; van de Kar et al., 1992) Für die Gb₃ Biosynthese scheinen drei Faktoren essentiell zu sein: das Substratangebot an Ceramid, die Expression der GCS als Schlüsselenzym der GSL-Synthese sowie das Vorhandensein der Expression der A4GALT (*Alpha 1,4-Galactosyltransferase*) (Kojima et al., 2000; Liu et al., 2010; Okuda et al., 2006). Die vorliegende Arbeit fokussierte sich vor allem auf letzten, bisher wenig beachteten Faktor.

Die Magenkarzinomzelllinie AGS und die Kolonkarinomzelllinie DLD-1, die keine nachweisbare A4GALT-mRNA-Expression aufweisen, besitzen auch kein Gb₃ auf ihrer Plasmamembran. Des Weiteren korreliert die A4GALT-mRNA-Expression sowohl in etablierten Zelllinien als auch in humanen Kolonkarzinomproben mit dem Ausprägungsgrad von Gb₃. Dieser Umstand veranlasste uns, das humane A4GALT-Gen, das auf dem Chromosom 22 lokalisiert ist, eingehender zu untersuchen.

In silico-Analysen zeigten, dass der mutmaßliche A4GALT-Promotor eine CpG-reiche Sequenz besitzt, sodass als Arbeitshypothese von einer epigenetischen Regulation ausgegangen wurde. Eine zweite, in Exon 2 gelegene CpG-reiche Sequenz wurde einem bereits zuvor beschriebenen Alu-Repeat zugeordnet (Westman et al., 2014). Alu-Repeats weisen im Normalfall einen hohen Methylierungsgrad auf (Luo et al., 2014). Beide Sequenzen wurden mittels Bisulfit-modifizierter DNA-Sequenzierung in den Zelllinien DLD-1 (Gb₃-negativ) und St3051 (Gb₃-positiv) analysiert. Die CpG-Sequenz nahe des Genpromotors wies in DLD-1 eine Hypermethylierung verglichen mit St3051 auf, während die als Alu-Repeat klassifizierte Sequenz in Exon 2 in beiden Linien hypermethyliert war. Die Bisulfitsequenzierungsergebnisse legen eine direkte Hemmung der Transkription via A4GALT-Promotormethylierung nahe.

Durch pharmakologische DNA-Demethylierung mittels 5-Aza-2'-desoxycytidin konnte in initial defizienten AGS und DLD-1 Zellen die Expression von A4GALT induziert und mittels des HDAC Klasse 1-Inhibitors Valproat noch weiter verstärkt werden. Zudem konnte eine (Neo-) Expression von Gb₃ auf der Zellmembran mittels Durchflusszytometrie und

Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Weiterhin führte die Erhöhung der A4GALT-Expression in MKN-45 Zellen mit ursprünglich niedriger, jedoch nicht völlig fehlender Gb₃-Oberflächenexposition zu gesteigerter Ausprägung von Gb₃ auf der Zelloberfläche. Somit kann davon ausgegangen werden, dass es Situationen gibt, in denen A4GALT nicht nur essentiell für die Gb₃-Synthese ist, sondern auch, reguliert über ihre Expression, als Schrittmacherenzym fungiert. Die Linien HCT 116 und St3051, die endogen hohe Mengen an membranärem Gb₃ ausprägen, zeigten hingegen nach pharmakologischer Modifikation des Epigenoms weder auf A4GALT Expressions- noch auf Gb₃-Expositionsebene signifikante Unterschiede zu unbehandelten Kontrollen .

Um ein stabiles und präzises genetisches Modell zur Analyse der A4GALT-Funktion zu generieren, wurden zwei guideRNAs für CRISPR/Cas9-basierte Geneditierung erstellt, die innerhalb der kodierenden Sequenz der A4GALT binden. Die Cas9-Endonuklease induziert Doppelstrangbrüche der genomischen DNA zwischen Base 17 und 18 der gRNA. Durch die Einführung dieser Doppelstrangbrüche kann es zu kleinen Insertionen oder Deletionen im Rahmen der DNA-Reparatur durch nicht-homologe Endverbindung (NHEJ) kommen, die schließlich zu einer Leserasterverschiebung und zu einem vorzeitigen Proteintranslationsstopp führen. (Ran et al., 2013) Die erstellten gRNA-Sequenzen wurden in ein Cas9-tragendes Plasmid mit Puromycinresistenz kloniert. Die monoklonalen, A4GALT-defizienten Linien A1-6 und A2-3 entstanden durch Transfektion der Plasmide, Puromycinbehandlung sowie Selektion und Anzucht einzelner Kolonien. Sie wurden mittels Durchflusszytometrie auf Gb₃-Expression und mittels Next Generation Sequencing (NGS) auf Leserasterverschiebungen im A4GALT-Gen überprüft. Beide Linien waren Gb₃-defizient und wiesen Insertionen zwischen Position 17 und 18 der jeweiligen an die DNA-bindenden gRNA auf. HCT 116 zeigte in der NGS-Analyse einen heterozygoten Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) im Bereich der gRNA-Bindestellen, der als rs11541159 mit einer „minor allele frequency“ von 0,35 im GenomAtlas Ensembl referenziert ist und eine Missensemutation der A4GALT mit einem Austausch von Methionin zu Valin bedingt, die aber als für die A4GALT-Funktion tolerabel eingeschätzt wird (European Bioinformatics Institute, 2017; Zerbino et al., 2017). Interessanterweise war das CRISPR/Cas9-System trotz des SNPs effektiv genug, um eine Gendefizienz zu erhalten.

Damit konnte gezeigt werden, dass A4GALT absolut essentiell für die Gb₃-Expression ist. Zudem wurde nun neben dem bereits zuvor beschriebenen murinen Modell (Okuda et al., 2006) und dem Modell von Jacob et al. in humanen Ovarialzellen (Jacob et al., 2018) eines der ersten

stabilen genetische Modelle für A4GALT-Defizienz in humanen Zelllinien generiert, was in Zukunft die Erprobung Shiga-Toxin-basierter Anwendungen sowie die Erforschung der Rolle von Gb₃ in vivo in Tumorxenotransplantat-Modellen erlaubt.

Mittels unserer experimentell gewonnenen Daten und bisher publizierten Mechanismen kann ein Modell zur Regulation der Gb₃-Expression in Tumorzellen des Gastrointestinaltraktes vorgeschlagen werden: die sich im Entartungsprozess befindliche Zelle, die epithelialen Ursprungs ist (Zelle der Magen- oder Colonschleimhaut, oder des exokrinen Pankreas) exprimiert zunächst noch kein Gb₃, da die A4GALT-Expression fehlt. Im Rahmen der malignen Transformation kommt es häufig zu genetischen, genomischen und epigenetischen Alterationen, insbesondere zu Veränderungen des DNA-Cytosinmethylierungsmusters (Chen & Fang, 2014). Dies kann schließlich zur Neoexpression von A4GALT führen, wahrscheinlich ausgelöst durch Veränderung des Methylierungsgrades der CpG-Sequenz im Promotorbereich der A4GALT und erhöhte Chromatinzugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren. Im Bereich niedriger A4GALT-Expression fungiert die A4GALT aufgrund der Enzymlimitierung als Schrittmacherezym der Gb₃- und Globoserien-GSL-Synthese. Übersteigt die Expression ein gewisses Maß bei gegebenem Substrat, kommt es zu einer Substratlimitierung. Gemeinsam mit dem zur Verfügung stehenden Ceramid in der Zelle führt die GCS letztlich zur Substratversorgung der A4GALT, so dass in diesem Bereich die Expression von GCS und das Angebot an Ceramid entscheidend sind und GCS wie von Liu et al. festgestellt als Schrittmacherezym fungiert. (Liu et al., 2010) P-gp stellt dem Stoffwechselweg durch seine Flippase-Aktivität zusätzliches Glucosylceramid zur Verfügung (Lala et al., 2000). Auf Ebene der LacCerS wird kein weiterer Regulationsschritt erwartet und ist unseres Wissens nach auch kein Mechanismus beschrieben, da zur Akkumulation von Glucosylceramid ohne relevanten alternativen Stoffwechselweg zur Verwertung desselbigen kommen könnte, wohingegen am Kreuzungspunkt nach Laktosylceramid, an dem A4GALT steht, die Abzweigung in Richtung Globo-, Lakto- und Ganglioserie erfolgt und damit alternative Stoffwechselwege zur Verfügung stehen. Abbildung 33 zeigt ein Modell zur Regulation der Gb₃-Biosynthese in Tumorzellen.

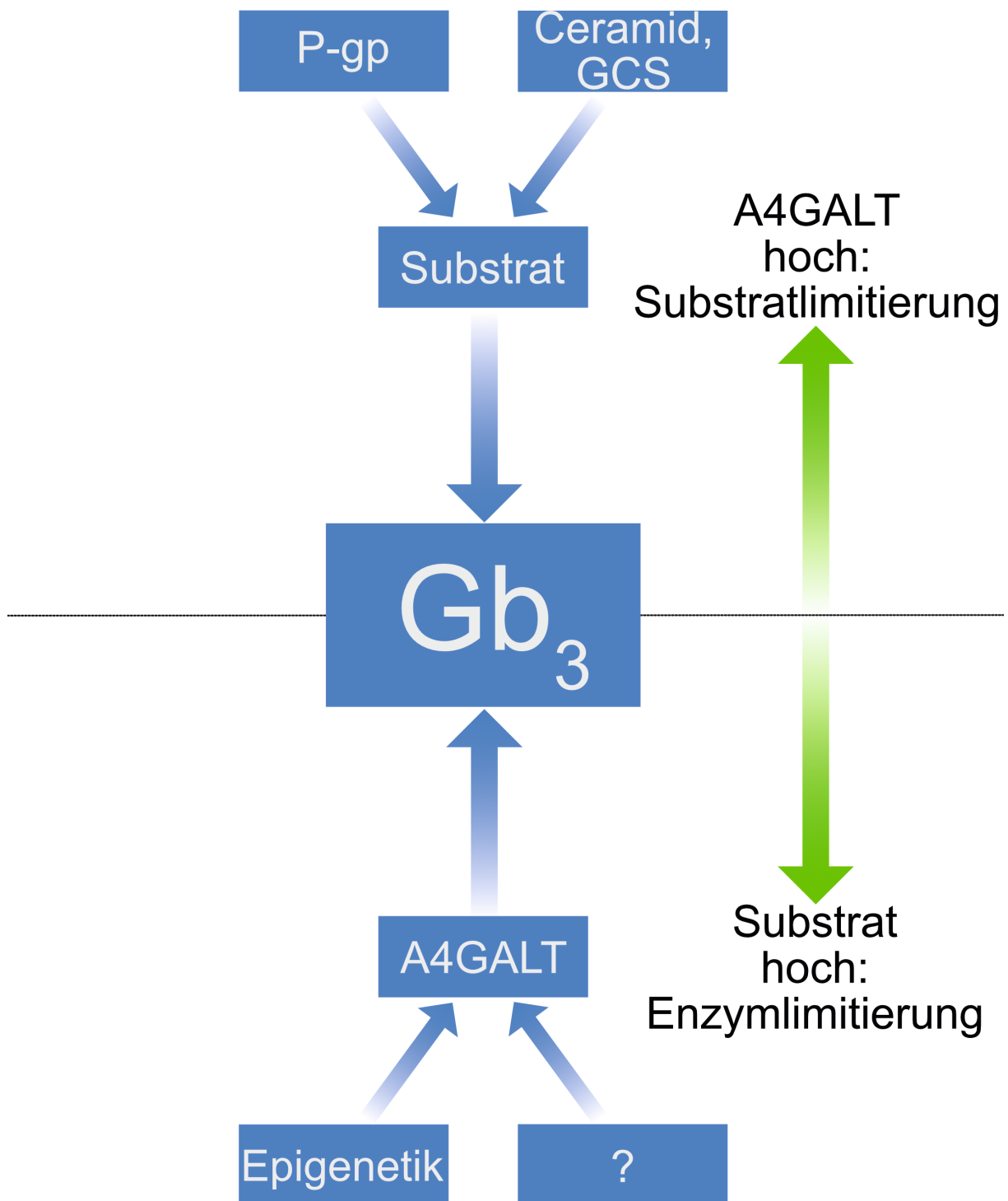


Abbildung 33: Modell zur Regulation der Gb₃-Biosynthese.

Zur Biosynthese von Gb₃ ist die A4GALT zwingend notwendig. Diese wird über epigenetische Faktoren wie CpG-Methylierung und Chromatindichte in ihrer Expression reprimiert. Bei niedrigen Expressionswerten, bei denen Substrat im Überschuss vorliegt, bestimmt die A4GALT-Expression die Gb₃-Biosynthese (Enzymlimitierung). Steigt durch epigenetische oder andere Faktoren die A4GALT-Expression, bestimmt die Menge an zur Verfügung stehendem Substrat (LacCer) die Gb₃-Biosynthese (Substratlimitierung). Hierbei wurden zum einen das Angebot an Ceramid und die Expression des GSL-Schlüsselenzyms GCS als zentralen Faktoren beschrieben, zum anderen die Aktivität und Expression des für GlcCer als Flippase an der Golgimembran fungierenden P-gp. (Liu et al., 2010; Meivar-Levy & Futerman, 1999; Obrig et al., 2003)

Die Regulation auf dieser Ebene kann auch erklären, dass es neben den oben beschriebenen soliden Tumoren zwei unterschiedliche Typen von Burkitt-Lymphomen hinsichtlich der GSL-Ausprägung gibt: einerseits Lymphome, die vorwiegend Globoserien-GSL wie Gb₃ aufweisen, andererseits diejenigen, die vorwiegend Ganglioserien-GSL wie GM₂ und GM₃ besitzen (Taga et al., 1995). Dieser Umstand könnte durch die differenzielle Expression und damit einhergehend unterschiedliche Aktivität der A4GALT zurückzuführen sein. Meivar-Levy und Futerman merkten auch an, dass A4GALT bei niedrigem Substratangebot an LacCer gegenüber den anderen Hexosyltransferasen dominiert, wohingegen das Gegenteil bei hohem Substratangebot der Fall ist (Meivar-Levy & Futerman, 1999).

Die GCS-mRNA-Expression folgt der A4GALT-Aktivität und damit dem Gb₃-Gehalt gleichsinnig. Wird die A4GALT durch CRISPR/Cas9 ausgeknockt, sinkt sie. Wird A4GALT durch epigenetische Agenzien in initial negativen Zellen reexprimiert, kann eine signifikante Steigerung der Expression festgestellt werden. Eine Erklärung könnte sein, dass die Tumorzellen bestrebt sind, die anderen GSL in ihrer Expression konstant zu halten, um bei Wegfall der Globoserie keiner Akkumulation anderer GSL-Spezies mit teils tumorsuppressiven Eigenschaften ausgesetzt zu sein. Diese augenscheinlich sehr enge Regulation macht es umso erstaunlicher, dass die Gb₃-Expression in verschiedenen Tumoren derselben Entität so großen Schwankungen unterworfen ist.

7.2 Gb₃ in der Tumorbilogie

Gb₃ wird in verschiedenen soliden Tumorentitäten überexprimiert, wohingegen seine physiologische Expression auf wenige Gewebe begrenzt ist. Vorbefunde unserer Arbeitsgruppe, sowie unabhängige Befunde haben wie eingangs beschrieben eine Gb₃-Überexpression in mehr als 50% der gastrointestinalen Karzinome aus Magen, Pankreas und Kolorektum festgestellt. (Distler et al., 2009; Falguieres et al., 2008; Geyer et al., 2016; Kovbasnjuk et al., 2005; Maak et al., 2011; Storck et al., 2012) Dieser Umstand legt nahe, dass hohe Gb₃-Spiegel entarteten Zellen einen Selektionsvorteil bieten und mit Tumorinitiation und/oder -progression verknüpft sind.

In den von uns untersuchten Tumorproben konnte gleichwohl keine eindeutig signifikante Korrelation mit prognostischen, klinischen oder pathologischen Parametern gezogen werden, weshalb wir die mittels CRISPR/Cas9 erstellten, A4GALT und Gb₃-defizienten HCT 116 Klone A1-6 und A2-3 zur kausalen Untersuchung der tumorbilogischen Rolle heranzogen. Da diese Befunde zum Teil in Zusammenarbeit mit Herrn Christoph Barz erhoben wurden und an anderer Stelle noch ausführlicher diskutiert werden, soll im Folgenden lediglich eine kurze Diskussion der Ergebnisse erfolgen (Barz, 2020). Zunächst wurden die Auswirkungen der Gb₃-Defizienz auf Proliferation und Zellwachstum untersucht, mittels verschiedener *in vitro* Verfahren: klonogenes Überleben, adhäsionsunabhängiges Wachstum sowie mitochondriale Aktivität (XTT-Assay). Der Test auf klonogenes Überleben stellt eine Möglichkeit dar, die Fähigkeit zur Bildung von monoklonalen Kolonien mittels eines *in vitro*-Modells zu objektivieren. Hierbei zeigten sich im Vergleich zu Wildtypzellen keine signifikanten Unterschiede. Adhäsionsunabhängiges Wachstum in einer Agarosematrix („Softagar“) bildet die Fähigkeit von Tumorzellen ab, unabhängig von der Adhäsion an solide Strukturen Absiedlungen zu bilden, was eines der zentralen Kennzeichen von malignen Tumoren darstellt (Borowicz et al., 2014). Auch dabei wiesen Gb₃-defiziente HCT 116 Klone keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu parental HCT 116 Zellen auf. Die Proliferation der Zellen wurde durch ein XTT-basiertes Verfahren gemessen. HCT 116 A1-6 sowie A2-3 mit A4GALT-Knockout zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Gb₃-profizienten Ursprungszelllinie. Die Gb₃-Defizienz hatte weiterhin keine Auswirkungen auf das Ansprechen gegen das in der Therapie gastrointestinaler Karzinome breit etablierte Nukleotidanalogen 5-Fluorouracil (5-FU) in verschiedenen Testverfahren (XTT-Proliferationsversuche und klonogenes Überleben). Liu et al. beschrieben dagegen eine erhöhte Chemotherapieresistenz Gb₃-positiver Zellen, vermittelt durch

Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalweges und Pgp-Überexpression. (Liu et al., 2010) Die hier erstellten Klone sowie HCT 116 Wildtypzellen wiesen jedoch keine mittels FACS nachweisbare Pgp-Expression auf. 5-FU ist zwar kein Substrat von Pgp, allerdings wurde eine relevante Resistenzerhöhung durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg beschrieben (Noda et al., 2009). Diese Daten weisen in Zusammenschau mit fehlender klinischer Evidenz für Chemotherapie-resistenz gastrointestinaler Karzinome durch Gb₃-Expression darauf hin, dass die Erhöhung der Chemotherapieresistenz durch Gb₃ tumorentitäts- bzw. zelllinienspezifisch ist.

Die publizierten Bindungspartner P-gp und membranäres Hsp70 wurden mittels Durchflusszytometrie auf Gb₃-profizienten und -defizienten Zellen gemessen und danach verglichen. Es zeigte sich, dass HCT 116-Zellen keine messbare Pgp-Membranexposition aufweisen. Auch der Anteil an Zellen mit membranärem Hsp70 unterschied sich nicht signifikant zwischen Wildtypzellen und A4GALT-Knockoutmodell. Dagegen konnte auf Zellen mit niedrigem (MKN-45) oder fehlendem Gb₃ (DLD-1) auf der Membran mittels epigenetischen Agentien nicht nur ein Anstieg der Membranexposition von Gb₃ erzielt, sondern auch eine signifikante Erhöhung des Anteils an Zellen mit membranärem Hsp70 verzeichnet werden, wohingegen Zellen mit hohem membranärem Gb₃ (HCT 116) keine signifikanten Unterschiede aufweisen. Dies spricht eher für eine Co-Regulation von Gb₃ und membranärem Hsp70 bei *in vitro*-Modellen gastrointestinaler Karzinome auf Basis epigenetischer Mechanismen als der von Gehrman et al. beschriebenen direkten membranären Ankerfunktion von Gb₃ für Hsp70 (Gehrman et al., 2008).

Die Migrationsfähigkeit der Gb₃-defizienten Zellen wurde mittels eines Transwellmigrations- und eines wundheilungsbasierten 2D-Migrationstests untersucht. Die Transwellmigration war stark vermindert. So wiesen die A4GALT-defizienten Zellen nahezu 80% weniger die Poren durchwandernde Zellen auf als die Ausgangszelllinie. Auch in der 2D-Migration zeigte sich eine deutlich abgeschwächte Wanderungsfähigkeit der A4GALT-defizienten Linien. Die Invasionstendenz der Zellen wurde mittels Matrigelinvasionskammern getestet und war bei den Gb₃-defizienten Linien abgeschwächt im Vergleich zu Wildtypzellen. (Barz, 2020) Kovbasnjuk et al. beschrieben eine Rolle von Gb₃ für die metastatische Transformation von Kolonkarzinomzellen und erhöhte Invasivität von Normalepithelzellen, die mit A4GALT transfiziert wurden, sowie von mittels Durchflusszytometrie anhand der Gb₃-Exposition selektierten Zellen einer heterogenen, Gb₃ exprimierenden Zelllinie. Die Invasivität wurde mittels eines

Transwelltests erfasst, was unserer Ansicht nach allerdings eine Methode zur Erfassung der Migrationsfähigkeit darstellt. (Kovbasnjuk et al., 2005)

Durch *in vivo*-Daten ist eine Rolle für die Entstehung metastatischer gastrointestinaler Tumoren nicht eindeutig belegbar. In einer früheren Studie der Arbeitsgruppe zeigten Kolorektalkarzinome unabhängig von ihrem UICC- und Metastasierungsstatus erhöhte Gb₃-Expression (Falguières et al., 2008). Der Gb₃-Gehalt von Lebermetastasen im Vergleich zum Primarius war nicht signifikant verändert. Auch bei Pankreas- und Magenkarzinomen konnten keine steigenden Mengen an Gb₃ bei fortschreitenden und metastasierten Stadien der untersuchten Tumoren nachgewiesen werden. Auffällig war jedoch die hohe Diskrepanz zwischen benignen kolorektalen Adenomen und Karzinomen, sodass eine mögliche Rolle im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz diskutiert wird. (Falguières et al., 2008; Geyer et al., 2016; Maak et al., 2011)

Migration und Invasion spielen nicht nur in der Entstehung hämatogener und lymphogener Fernmetastasen eine essentielle Rolle, sondern auch bei der Invasion maligner Karzinome in das umliegende Gewebe. Dysplastische Zellen müssen physiologische Barrieren überwinden, um als invasive Karzinome zu gelten. Im Falle von Kolorektalkarzinomen stellen diese Barrieren neben der Basalmembran auch die *lamina muscularis mucosae* dar. (Rubio & Delinassios, 2010) Um genannte Barrieren überwinden zu können, ist die untersuchte Invasions- und Durchwanderungsfähigkeit essentiell. Auf Basis unseres *in vitro*-Modells für Gb₃-Defizienz, der Gb₃-Expression in gastrointestinalen Tumorproben und der Daten zur Expressionsregulation der A4GALT kann ein Modell für die Rolle von Gb₃ im Rahmen des Initiationsprozesses invasiver Karzinome am Beispiel kolorektaler Karzinome formuliert werden.

Die kolorektale Adenom-Karzinomsequenz beginnt typischer Weise auf dem Boden einer somatischen (erworbenen) oder in seltenen Fällen einer Keimbahn-Mutation des Tumorsuppressorgens APC. Erfolgt nun eine Deaktivierung des zweiten Allels von APC, kommt es zu einer Deregulation des Wnt/ β -Catenin-Signalweges und konsekutiv zu einer erhöhten Expression von proliferationsfördernden Transkriptionsfaktoren wie MYC und Cyclin D1. Durch die deregulierte Proliferation werden Mutationen von Protoonkogenen wie KRAS sowie schließlich der Verlust von weiteren Tumorsuppressoren wie p53 begünstigt. Weitere, weit weniger gut systematisierte Faktoren wie schwerwiegende chromosomale Alterationen führen nun zur Entstehung eines invasiven Karzinoms. (Bhalla et al., 2013; Brenner et al., 2014; Fearon &

Vogelstein, 1990; Shiller & Boostrom, 2015) In diesem letzten, weniger gut charakterisierten Schritt vom Adenom zum Karzinom könnte die auf epigenetischen Veränderungen fußende Neoexpression von A4GALT zu verorten sein. Diese ermöglicht durch Expression von Gb₃ und damit einhergehender steigender Invasions- und Migrationsfähigkeit die Durchdringung der Basallamina und der *lamina muscularis mucosae*. Obgleich dieses Modell mit Erkenntnissen aus *in vitro*- und *ex vivo*-Experimenten kompatibel ist und durch Indizien gestützt wird, sind noch weitere Untersuchungen, beispielsweise im Rahmen eines Tiermodells, vonnöten, um eindeutige Evidenz zu generieren. Weiterhin sollte untersucht werden, inwiefern das Vorliegen eines CIMP(CpG-island methylator phenotype)-Subtyps die Expression von A4GALT in humanen Kolorektalkarzinomen beeinflusst.

Einen Teil seiner Funktionen könnte Gb₃ auch durch die Verschiebung der GSL-Homöostase erhalten. So beschrieben Meivar-Levy und Futerman das Überwiegen der Gb₃-Synthese gegenüber anderen GSL bei niedrigem Substratangebot, während bei hohem Substratangebot eher die Gangliosidsynthese dominiert. (Meivar-Levy & Futerman, 1999) Diesen GSL werden unterschiedliche Rollen für Tumorzellen zugeschrieben. Während Gb₃ und GSL der Globoserie mit Invasivität, der Expression von Matrix-Metalloproteasen (MMP) und Chemotherapieresistenz verknüpft sind, haben Ganglioside antiproliferative (GM₃), immunmodulatorische und metastasierungshemmende (GD1a) Eigenschaften. Die Ausgangssubstanz Ceramid fördert Apoptose, induziert COX-2-bedingte Inflammation und bewirkt Wachstumsarrest. (Bharti & Singh, 2003; Choi et al., 2008; W. H. Kim et al., 2000; Kovbasnjuk et al., 2005; Liu et al., 2010; Min et al., 2004; Patwardhan & Liu, 2011; Pewzner-Jung et al., 2010; Phillips et al., 2007; Subbaramaiah et al., 1998; Van Slambrouck & Steelant, 2007; L. Wang et al., 2006) Somit wirken Ceramid und die Ganglioserien-GSL tumorsuppressiv, während die Gb₃ und die Globoserien-GSL zugeschriebenen Eigenschaften Tumorinitiation und –progression fördern. Abbildung 34 zeigt den Zusammenhang von Ceramid, Globo- und Ganglioserie sowie deren unterschiedliche Funktionen und verdeutlicht die Bedeutung der GSL-Homöostase.

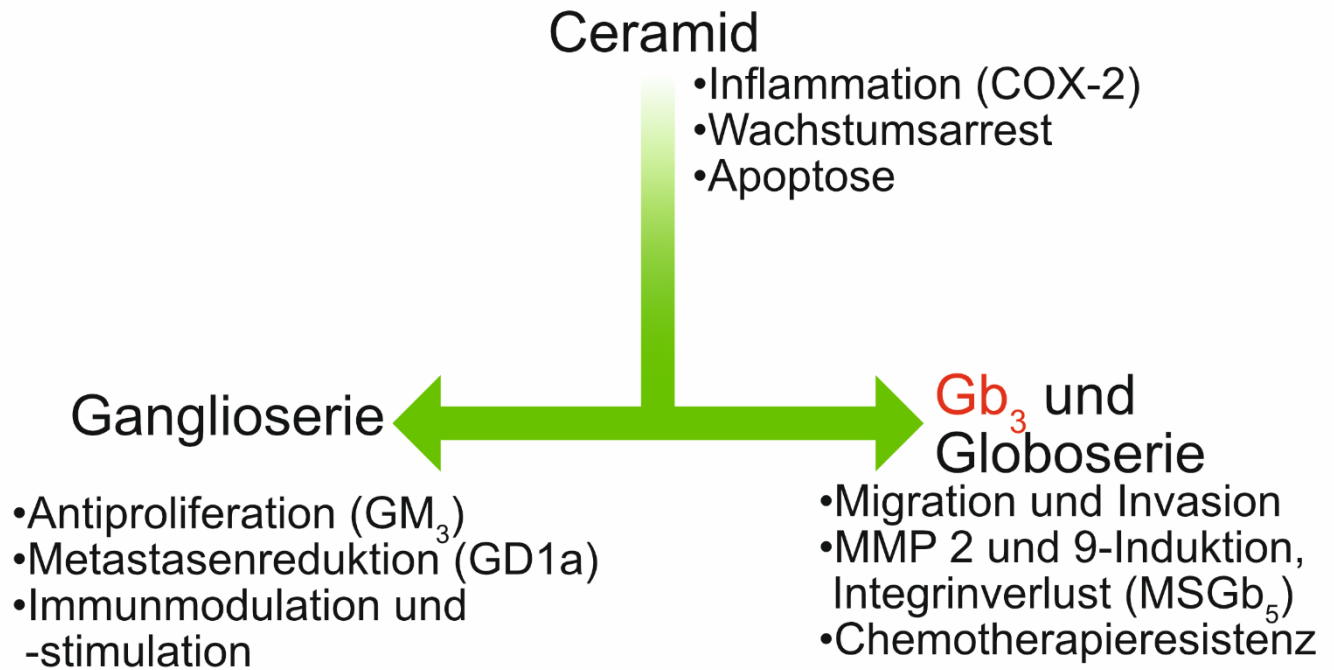


Abbildung 34: Glykosphingolipidhomöostase und Rolle für maligne Tumoren. Globo- und Ganglioserien-GSL sowie Ceramid nehmen diametral unterschiedliche Rollen für maligne Tumoren ein. Während die meisten Ganglioserien-GSL sowie Ceramid tumorsupprimierende Eigenschaften haben, fördern Gb₃ und die Globoserien-GSL Tumorinitiation und -progression. Abbildung verändert nach einem Übersichtsartikel von Patwardhan und Liu. (Patwardhan & Liu, 2011)

7.3 Gb₃ als Zielstruktur biomedizinischer Anwendungen

Um einzuschätzen, ob Tumoren für Shiga-Toxin- oder StxB-basierten Therapieansätzen zugänglich sind, muss valide nachgewiesen werden, dass (für StxB-erreichbares) Gb₃ auf der Oberfläche der Tumorzellen bzw. der Tumorgefäße ausgeprägt wird. Membranäres Cholesterol kann Gb₃ maskieren, sodass es nicht mehr von StxB gebunden werden kann (D. Lingwood et al., 2011). Dies schränkt den Einsatz von Nachweismethoden für Gb₃ deutlich ein. Massenspektrometrische Ansätze können zwar sehr sensitiv und zum Teil ortsauflösend Gb₃-Konzentrationen messen, jedoch nicht den Grad der Maskierung. Somit sind lediglich Methoden geeignet, bei denen Gb₃ direkt durch StxB visualisiert wird.

Es muss zwingend zwischen einzelnen Tumorkompartimenten unterschieden werden: Gb₃ kann sich auf Tumorzellen, infiltrierenden Immunzellen, Tumorgefäßen sowie im Tumorstroma befinden. Diese Unterscheidung kann mittels Färbung spezifischer Oberflächen-Marker durch spezifische Antikörper (bspw. Zellen epithelialer Natur: EpCAM, Endothelien: von-Willebrand-Faktor) und histologischer Kenntnisse getroffen werden. Somit stellt die Immunfluoreszenzmikroskopie eine der gegenwärtig sichersten und sensitivsten Methode zur Evaluierung der Eignung eines bestimmten Tumors für eine Shiga-Toxin- oder StxB-basierten Therapie dar. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein Schnellprotokoll entwickelt, mit dem Gb₃ StxB-basiert innerhalb einer Stunde nachgewiesen werden kann. Mittels Primärkultur von Karzinomzellen kann zusätzlich die Gb₃-Ausprägung und das Aufnahmeverhalten von StxB von teilungsfähigen, lebenden Tumorzellen zeitnah eingeschätzt werden. Weiterhin wäre ein durchflusszytometrischer Ansatz denkbar, bei dem durch Färbung spezifischer Oberflächenmarker sowie der Zellbeschaffenheit zwischen Kompartimenten unterschieden werden sowie Gb₃ mit StxB markiert werden kann. Allerdings ist die FACS-basierte Analyse von Tumoren sehr zeitaufwändig, benötigt zudem Frischgewebe, das zumeist zunächst unter anderem durch Proteaseverdau in Einzelzellen aufgespalten werden, was die Oberflächenfärbung gewisser Membranproteine selektiv beeinflussen kann und damit die Aussagekraft des Tests deutlich schmälert. Einen neueren und durch die Visualisierung von Gb₃-Vorläufern, -Abkömmlingen sowie verwandten GSL detaillierteren Ansatz mit vergleichbarer Sensitivität stellt die massenspektrometrische, MALDI-2-basierte und damit im Mikrometerbereich ortsauflösende GSL-Messung dar, die in Kombination mit histologischen Färbemethoden paralleler Gewebsschnitte

in der Zukunft weitere Aufschlüsse über Lipidmetabolismus im Tumor sowie Rolle verschiedener GSL-Serien geben kann (Bien et al., 2020).

An StxB gekoppelte Chemotherapeutika bieten gegenüber Shiga-Holotoxinen den Vorteil, dass neben der Gb₃-Spezifität auch eine selektive Zytotoxizität auf sich schnell teilende Zellen ausgeübt werden wird, während ruhende Zellen weniger geschädigt werden. Wir und andere haben bereits den Einsatz von StxB-SN38 für Colon-, Magen-, und Pankreaskarzinomzellen erfolgreich erprobt. (El Alaoui et al., 2007; Geyer et al., 2016; Maak et al., 2011) Einen neueren Ansatz für die StxB-basierte Therapie stellt MMAE gekoppeltes StxB dar, einem Auristatinderivat, das seine zytostatischen Eigenschaften durch Hemmung der Polymerisation von Mikrotubuli ausübt. Während Batische et al. einen ausgeprägt zytotoxischen Effekt auf stark Gb₃-positive HT-29-Zellen beschrieben, konnten in der vorliegenden Arbeit dieser Effekt nicht für andere gastrointestinale Krebszelllinien nachvollzogen werden, wobei der IC₅₀-Werte für HCT 116-Zellen um das bis zu 1000-fache von den für HT-29 publizierten abwich. (Batische et al., 2015) Zudem wiesen die A4GALT-defizienten Klone vergleichbare IC₅₀-Werte auf wie die Ursprungszelllinie. Denkbar wäre, dass die MMAE-bedingte Zelltodinduktion zelllinienspezifisch ist und HCT 116-Zellen dagegen vergleichsweise resistent sind. Dies stellt den Einsatz von StxB-MMAE für gastrointestinale Karzinome aber zumindest in Frage.

Einen alternativen Ansatz stellen Shiga-Toxin Holotoxine dar, die ebenfalls zelltyp- und gewebsspezifische Wirkungen besitzen. Vero-Zellen sind wesentlich sensitiver gegenüber Stx1a sind, wohingegen Stx2a mit den schwereren Pathologien sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen verknüpft ist. (Johannes & Römer, 2010; Melton-Celsa, 2014) Während sich die Zytotoxizität von StxB-gekoppelten Chemotherapeutika *in vitro* im nano- bzw. mikromolaren Bereich bewegt, liegt sie bei dem Holotoxin Stx1a für HCT 116 Zellen deutlich darunter im hohen picomolaren Bereich. Die Humantoxizität von Shiga-Toxinen, insbesondere bezogen auf das glomeruläre Nierenendothel, hängt auch maßgeblich von der Aktivierung des Komplementsystems im alternativen Weg ab. (Karpman & Tati, 2016; Zoja et al., 2017) Hierbei kann die Menge an Molekülen, die an endotheliales Gb₃ gebunden ist, entscheidend für Komplementaktivierung und Toxizität sein. Bisher ist es unbekannt, ob auch StxB durch Bindung an Gb₃ alleine Komplementaktivierung in relevantem Ausmaß bewirken kann. Sofern dies der Fall ist, könnte dasjenige Konstrukt die geringsten Nebenwirkungen haben, von dem am wenigsten für die gewünschte Wirkung eingesetzt werden muss, was nach derzeitigem Stand die Shiga-Toxin-Holotoxine sind.

7.4 Zukunft und Ausblick für die Shiga-Toxin-basierte Tumorthherapie und -diagnostik

Gezielte Therapie- und Diagnostikansätze, die die spezifische Ausprägung von Gb₃ auf Tumorzellen und –gefäßen ausnutzen, zeigen herausragendes Potential. Durch bakterielle Shiga-Toxin steht ein natürlicher Vektor für Chemotherapeutika und Kontrastmitteln zur Verfügung, der die zellbiologisch vorteilhafte retrograde Aufnahmeroute beschreiten kann und so ohne lysosomale Degradierung in die Zelle aufgenommen und in die unmittelbare Umgebung des Zellkerns transportiert wird.

Anti-Gb₃-Antikörper wurden im Mausmodell erfolgreich zur Angiogenesehemmung und Verringerung von Metastasen ausgehend von Gb₃-defizienten Tumortransplantaten getestet. Dieser Umstand beruht unter anderem auf der Überexpression von Gb₃ auf proliferativen Endothelzellen. (Desselle et al., 2012) Eine ähnliche Rolle könnte zukünftig funktionalisiertem StxB zukommen, sodass dieses unabhängig vom Gb₃-Expressionsstatus der Tumorzellen *in vivo* eingesetzt werden könnte.

StxB-basierte Ansätze sind allerdings noch nicht ausreichend auf *in vivo*-Wirksamkeit und -Toxizität untersucht. Unseres Wissens nach wurden noch keine Studien zum Einsatz StxB-gekoppelter Chemotherapeutika im Tiermodell veröffentlicht, gleichwohl beschreiben Batisse et al. im Artikel zur Generierung von Auristatin-gekoppeltem StxB für StxB-SN38 lediglich „moderate“ Effekte auf murine Tumorexotransplantate bei der maximal tolerierten Dosis (Batisse et al., 2015). Weiterhin muss beachtet werden, dass die Toxizität von Shiga-Toxin stark zwischen einzelnen Säugetierspezies schwankt. Während beim Menschen Stx2a mit den schwersten Krankheitsverläufen assoziiert ist, ist dies bei Schweinen Stx2e (Johannes & Römer, 2010). Dies verringert die Aussagekraft von Tiermodellen. Für StxB und verschiedene Varianten der B-Untereinheit gibt es leider bisher noch gar keine Daten zur Toxizität im Menschen oder im Tiermodell. Beachtet werden sollte auch, dass ein großer Teil der Schädigung durch Shiga-Toxine über Reaktionen der humoralen, angeborenen Immunabwehr vermittelt wird (Zoja et al., 2017). Ein geeignetes Tiermodell sollte also ein intaktes Immunsystem aufweisen, was den Einsatz von Tumorexotransplantaten erschweren dürfte.

Toxizitätsprobleme können sich beim Menschen auch für Nieren und ZNS ergeben, die zentrale Schädigungsorte des durch Shiga-Toxine ausgelösten HUS sind. Insofern könnte eine Kombination aus systemischer und lokaler Therapie große Toxizitätsvorteile aufweisen: StxB wurde so bereits als Vektor für photosensitivierende Substanzen beschrieben, sodass durch selektive Bestrahlung des Tumors Shiga-Toxin-sensitives Gewebe ausgespart werden kann (Amessou et al., 2008).

Zur Umgehung der systemischen Toxizität von Shiga-Toxin-basierten Therapien scheint auch eine Kombination mit anderen experimentell erprobten neuartigen Verfahren sinnvoll. Goldnanopartikel könnten in Zukunft gleichzeitig zur Evaluation einer Shiga-Toxin- oder StxB-basierenden Anwendung und zur eigentlichen Therapie eingesetzt werden. So könnten funktionalisierte Goldnanopartikel als Kontrastmittel für MRT-Bildgebung fungieren und dazu dienen, durch Anregung mittels photothermaler Therapie in einem örtlich stark begrenzten Bereich selektiv Tumorzellen zu zerstören (Amessou et al., 2008; Huang et al., 2008). Die von uns mittels CRISPR/Cas9-basierter Genomeditierung erstellten Gb₃-defizienten Linien können in einem zukünftigen Tiermodell zur Erprobung Shiga-Toxin- und StxB-basierender Ansätze verwendet werden.

7.5 Membranlipide maligner Tumoren – ein vielversprechendes Forschungsfeld

Die Erforschung der Rolle von Membranlipiden in malignen Tumoren steht noch weitgehend am Anfang verglichen mit den Erkenntnissen über andere Biomoleküle wie DNA, RNA oder Proteine (Snaebjornsson et al., 2020). Neben experimentellen Erkenntnissen werden auch methodische Fortschritte nötig sein, um das Zusammenspiel von membranären Lipiden und Proteinen und den Geschehnissen im Zellinnern besser zu verstehen. Vielversprechende Ansätze stellen hierbei massenspektrometrische Shotgun-Lipidomics-Ansätze dar, die in hoher Detailtiefe eine Vielzahl unterschiedlicher Lipidspezies darstellen können (Y. Wang et al., 2020). So konnte nachgewiesen werden, dass auch der Grad der Entättigung der mit Membranlipiden funktionalisierten Fettsäuren wichtige Auswirkungen auf die Tumorzellbiologie und ihre malignen Eigenschaften hat und dass Tumorzellen gängige Stoffwechselwege mit hoher Plastizität umgehen können, um einer gezielten, diesen Umstand adressierenden Therapie zu entgehen (Vriens et al., 2019).

MALDI-2-basierte, ortsauflösende Massenspektrometrie dagegen bietet erstmals zusätzlich die Möglichkeit, den Lipidmetabolismus in Kleinstkompartimenten einzelner Zellverbände in humanem Krebsgewebe zu untersuchen, sodass neben differentiellen und hochgradig heterogenen Krebszellregionen auch die tumoröse Mikroumgebung (wie beispielsweise Blutgefäße und Stroma) experimentell besser fassbar werden (Bien et al., 2020; Soltwisch et al., 2015), die eine bedeutende Rolle in der Krebsentstehung und -progression einnimmt (Peck & Schulze, 2019).

Auch der Lipidmetabolismus einzelner Zellen lässt sich massenspektrometrisch mittels entsprechend präparierten Lipidspezies näher ergründen – mit der Einschränkung, dass lediglich lebende Zellen und nicht natives, in Biobanken archiviertes Material wie beispielsweise Patientengewebe, durch diese Methodik untersucht werden kann. (Thiele et al., 2019)

Subzellulär (und damit außerhalb des Auflösungsgrades der beschriebenen Ansätze) scheinen insbesondere die „lipid rafts“ zwar als örtlich hoch organisierte Einheiten der Zellmembran äußerst relevante Aufgaben zu erfüllen, können aber aktuell nur schwer experimentell fassbar gemacht werden. Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass es nicht nur relevant ist, ob gewisse Lipide Bestandteil der Zellmembran sind, sondern auch wo sie lokalisiert sind und wie ihre Organisationsstruktur beschaffen ist. Diese Vorstellung geht weit über das bisher als

Modell verbreitete Flüssig-Mosaik-Modell hinaus und stellt experimentelle Herausforderungen an die Wissenschaft. (D. Lingwood & Simons, 2010)

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass sich auch epigenetische Faktoren auf die Membranbeschaffenheit auswirken können und letztlich darüber den Phänotyp einer Krebszelle mitbestimmen wie am Beispiel des Migrations- und Invasionsverhaltens verdeutlicht. Solche Einflussfaktoren spielen bislang in allgemein anerkannten Modellen der Tumorigenese - wenn überhaupt - eine sehr untergeordnete Rolle. Gerade für die Aussagekraft bioinformatischer Modelle, in der eine Vielzahl unterschiedlichster Faktoren und Informationen berücksichtigt werden kann und nicht mehr auf eine möglichst übersichtliche Menge an Eingangsdaten wie in konventionellen Modellen geachtet werden muss, können solche Zusammenhänge deutlich an Relevanz gewinnen. Zudem stellen die beschriebenen methodischen Fortschritte der vergangenen Jahre neue experimentelle Wege bereit, die bisher noch nicht vollends ausgeschöpft wurden. Membranlipide und Gb₃ im Besonderen bleiben somit ein auch zukünftig interessantes und noch weitgehend unbestelltes Feld in der Tumorforschung, dem dringend ausreichend Interesse gewidmet werden sollte.

8 Zusammenfassung

Deutsch

Das Membranlipid Gb₃, der Rezeptor für bakterielle Shiga-Toxine, stellt eine vielversprechende Zielstruktur auf der Oberfläche gastrointestinaler Karzinomzellen dar, dessen Rolle trotz nachgewiesener Überexpression noch weitgehend unklar ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Gb₃-Biosynthese auf Basis epigenetischer Mechanismen über das Enzym A4GALT reguliert wird und Migrations- sowie Invasionsfähigkeit von Tumorzellen erhöht. Mittels eines CRISPR-Cas9-basierten Modells für A4GALT-Defizienz in humanen Kolonkarzinomzellen wurden gezielte Therapieansätze *in vitro* evaluiert. Das Modell erlaubt zukünftig die Untersuchung gezielter Shiga-Toxin-basierter Therapien und der Rolle von Gb₃ für maligne Tumoren *in vivo*.

English

The membrane lipid Gb₃, the cellular receptor for bacterial Shiga-Toxins, is a promising target present on the surface of many gastrointestinal cancer cells. Despite its frequent overexpression in cancer, the role of Gb₃ is currently largely unknown. It could be demonstrated that Gb₃-biosynthesis is regulated by epigenetic mechanisms via the enzyme A4GALT, and that Gb₃ expression enhances invasiveness and migration of cancer cells. Using a CRISPR/Cas9-based model for A4GALT deficiency, targeted tumor therapies were evaluated *in vitro*. The cellular model enables future research on Shiga-Toxin-based therapy and the role of Gb₃ for malignant cells in the context of a living organisms.

9 Literaturverzeichnis

- Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I. & Gottesman, M. M. (1999). Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39, 361-398.
- Amessou, M., Carrez, D., Patin, D., Sarr, M., Grierson, D. S., Croisy, A., ... Johannes, L. (2008). Retrograde delivery of photosensitizer (TPPp-O-beta-GluOH)₃ selectively potentiates its photodynamic activity. *Bioconjug Chem*, 19(2), 532-538.
- Ando, R., Tokuda, N., Yamamoto, T., Ikeda, K., Hashimoto, N., Taguchi, R., ... Furukawa, K. (2016). Immunization of A4galt-deficient mice with glycosphingolipids from renal cell cancers resulted in the generation of anti-sulfoglycolipid monoclonal antibodies. *Glycoconj J*, 33(2), 169-180.
- Arab, S. & Lingwood, C. A. (1998). Intracellular targeting of the endoplasmic reticulum/nuclear envelope by retrograde transport may determine cell hypersensitivity to verotoxin via globotriaosyl ceramide fatty acid isoform traffic. *J Cell Physiol*, 177(4), 646-660.
- Arab, S., Murakami, M., Dirks, P., Boyd, B., Hubbard, S. L., Lingwood, C. A. & Rutka, J. T. (1998). Verotoxins inhibit the growth of and induce apoptosis in human astrocytoma cells. *J Neurooncol*, 40(2), 137-150.
- Arab, S., Russel, E., Chapman, W. B., Rosen, B. & Lingwood, C. A. (1997). Expression of the verotoxin receptor glycolipid, globotriaosylceramide, in ovarian hyperplasias. *Oncol Res*, 9(10), 553-563.
- Barz, C. (2020). Veränderter Lipidmetabolismus bei Tumoren: Auswirkungen auf Therapieresistenz und Tumorbilogie [unveröffentlichtes Manuskript].
- Basu, D. & Tumer, N. E. (2015). Do the A subunits contribute to the differences in the toxicity of Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2? *Toxins (Basel)*, 7(5), 1467-1485.
- Batisse, C., Dransart, E., Ait Sarkouh, R., Brulle, L., Bai, S. K., Godefroy, S., ... Schmidt, F. (2015). A new delivery system for auristatin in STxB-drug conjugate therapy. *Eur J Med Chem*, 95, 483-491.
- Beddoe, T., Paton, A. W., Le Nours, J., Rossjohn, J. & Paton, J. C. (2010). Structure, biological functions and applications of the AB5 toxins. *Trends Biochem Sci*, 35(7), 411-418.
- Behnam-Motlagh, P., Tyler, A., Grankvist, K. & Johansson, A. (2010). Verotoxin-1 treatment or manipulation of its receptor globotriaosylceramide (gb3) for reversal of multidrug resistance to cancer chemotherapy. *Toxins (Basel)*, 2(10), 2467-2477.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. (2013a). *Stryer Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. (2013b). *Stryer Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Bhalla, A., Zulfqar, M., Weindel, M. & Shidham, V. B. (2013). Molecular diagnostics in colorectal carcinoma. *Clin Lab Med*, 33(4), 835-859.
- Bharti, A. C. & Singh, S. M. (2003). Inhibition of macrophage nitric oxide production by gangliosides derived from a spontaneous T cell lymphoma: the involved mechanisms. *Nitric Oxide*, 8(1), 75-82.
- Bien, T., Perl, M., Machmuller, A. C., Nitsche, U., Conrad, A., Johannes, L., ... Dreisewerd, K. (2020). MALDI-2 Mass Spectrometry and

- Immunohistochemistry Imaging of Gb3Cer, Gb4Cer, and Further Glycosphingolipids in Human Colorectal Cancer Tissue. *Anal Chem*.
- Bodary, P. F., Shen, Y., Vargas, F. B., Bi, X., Ostenso, K. A., Gu, S., ... Eitzman, D. T. (2005). Alpha-galactosidase A deficiency accelerates atherosclerosis in mice with apolipoprotein E deficiency. *Circulation*, 111(5), 629-632.
- Borowicz, S., Van Scoyk, M., Avasarala, S., Karuppusamy Rathinam, M. K., Tauler, J., Bikkavilli, R. K. & Winn, R. A. (2014). The soft agar colony formation assay. *J Vis Exp*(92), e51998.
- Brenner, H., Kloor, M. & Pox, C. P. (2014). Colorectal cancer. *Lancet*, 383(9927), 1490-1502.
- Chen, H. M. & Fang, J. Y. (2014). Epigenetic Biomarkers for the Early Detection of Gastrointestinal Cancer. *Gastrointest Tumors*, 1(4), 201-208.
- Choi, H. J., Chung, T. W., Kim, S. J., Cho, S. Y., Lee, Y. S., Lee, Y. C., ... Kim, C. H. (2008). The AP-2alpha transcription factor is required for the ganglioside GM3-stimulated transcriptional regulation of a PTEN gene. *Glycobiology*, 18(5), 395-407.
- Chuang, D. M., Leng, Y., Marinova, Z., Kim, H. J. & Chiu, C. T. (2009). Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends Neurosci*, 32(11), 591-601.
- Couture, O., Dransart, E., Dehay, S., Nemati, F., Decaudin, D., Johannes, L. & Tanter, M. (2011). Tumor delivery of ultrasound contrast agents using Shiga toxin B subunit. *Mol Imaging*, 10(2), 135-143.
- De La Vega Elena, C. D., Hellberg, A., Bonetti, S., Gonzalez, C. A., Chialina, S., Raillon, M. A., ... Olsson, M. L. (2009). [A rare blood group: p phenotype]. *Medicina (B Aires)*, 69(6), 651-654.
- De Rosa, M. F., Ackerley, C., Wang, B., Ito, S., Clarke, D. M. & Lingwood, C. (2008). Inhibition of multidrug resistance by adamantylgb3, a globotriaosylceramide analog. *J Biol Chem*, 283(8), 4501-4511.
- Desselle, A., Chaumette, T., Gaugler, M. H., Cochonneau, D., Fleurence, J., Dubois, N., ... Paris, F. (2012). Anti-Gb3 monoclonal antibody inhibits angiogenesis and tumor development. *PLoS One*, 7(11), e45423.
- Distler, U., Souady, J., Hulsewig, M., Drmic-Hofman, I., Haier, J., Friedrich, A. W., ... Müthing, J. (2009). Shiga toxin receptor Gb3Cer/CD77: tumor-association and promising therapeutic target in pancreas and colon cancer. *PLoS One*, 4(8), e6813.
- El Alaoui, A., Schmidt, F., Amessou, M., Sarr, M., Decaudin, D., Florent, J. C. & Johannes, L. (2007). Shiga toxin-mediated retrograde delivery of a topoisomerase I inhibitor prodrug. *Angew Chem Int Ed Engl*, 46(34), 6469-6472.
- European Bioinformatics Institute. (2017). rs11541159 SNP. Heruntergeladen am 21.12.2017 von http://dec2017.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=22:42_693343-42694343;v=rs11541159;vdb=variation;vf=6719867
- Falguières, T., Maak, M., von Weyhern, C., Sarr, M., Sastre, X., Poupon, M. F., ... Janssen, K. P. (2008). Human colorectal tumors and metastases express Gb3 and can be targeted by an intestinal pathogen-based delivery tool. *Mol Cancer Ther*, 7(8), 2498-2508.
- Falguières, T., Maak, M., von Weyhern, C., Sarr, M., Sastre, X., Poupon, M. F., ... Janssen, K. P. (2008). Human colorectal tumors and metastases express Gb3 and can be targeted by an intestinal pathogen-based delivery tool. *Mol Cancer Ther*, 7(8), 2498-2508.

- Falguieres, T., Mallard, F., Baron, C., Hanau, D., Lingwood, C., Goud, B., ... Johannes, L. (2001). Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol Biol Cell*, 12(8), 2453-2468.
- Fearon, E. R. & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759-767.
- Fraser, M. E., Chernaia, M. M., Kozlov, Y. V. & James, M. N. (1994). Crystal structure of the holotoxin from *Shigella dysenteriae* at 2.5 Å resolution. *Nat Struct Biol*, 1(1), 59-64.
- Friedrich, L., Stangl, S., Hahne, H., Kuster, B., Kohler, P., Multhoff, G. & Skerra, A. (2010). Bacterial production and functional characterization of the Fab fragment of the murine IgG1/λ monoclonal antibody cmHsp70.1, a reagent for tumour diagnostics. *Protein Eng Des Sel*, 23(4), 161-168.
- Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., ... Schultz, N. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*, 6(269), p11.
- Garred, O., van Deurs, B. & Sandvig, K. (1995). Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J Biol Chem*, 270(18), 10817-10821.
- Gehrmann, M., Liebisch, G., Schmitz, G., Anderson, R., Steinem, C., De Maio, A., ... Multhoff, G. (2008). Tumor-specific Hsp70 plasma membrane localization is enabled by the glycosphingolipid Gb3. *PLoS One*, 3(4), e1925.
- Gehrmann, M., Stangl, S., Kirschner, A., Foulds, G. A., Sievert, W., Doss, B. T., ... Multhoff, G. (2012). Immunotherapeutic targeting of membrane Hsp70-expressing tumors using recombinant human granzyme B. *PLoS One*, 7(7), e41341.
- Geyer, P. E., Maak, M., Nitsche, U., Perl, M., Novotny, A., Slotta-Huspenina, J., ... Janssen, K. P. (2016). Gastric adenocarcinomas express the glycosphingolipid Gb3/CD77: Targeting of gastric cancer cells with Shiga toxin B-subunit. *Mol Cancer Ther*.
- Giussani, P., Tringali, C., Riboni, L., Viani, P. & Venerando, B. (2014). Sphingolipids: key regulators of apoptosis and pivotal players in cancer drug resistance. *Int J Mol Sci*, 15(3), 4356-4392.
- Hagel, C., Krasemann, S., Löffler, J., Puschel, K., Magnus, T. & Glatzel, M. (2015). Upregulation of Shiga toxin receptor CD77/Gb3 and interleukin-1β expression in the brain of EHEC patients with hemolytic uremic syndrome and neurologic symptoms. *Brain Pathol*, 25(2), 146-156.
- Hamamura, K., Hamajima, K., Yo, S., Mishima, Y., Furukawa, K., Uchikawa, M., ... Togari, A. (2019). Deletion of Gb3 Synthase in Mice Resulted in the Attenuation of Bone Formation via Decrease in Osteoblasts. *Int J Mol Sci*, 20(18).
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hausman, S. Z. & Burns, D. L. (1993). Binding of pertussis toxin to lipid vesicles containing glycolipids. *Infect Immun*, 61(1), 335-337.
- Head, B. P., Patel, H. H. & Insel, P. A. (2014). Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1838(2), 532-545.
- Heath-Engel, H. M. & Lingwood, C. A. (2003). Verotoxin sensitivity of ECV304 cells in vitro and in vivo in a xenograft tumour model: VT1 as a tumour neovascular marker. *Angiogenesis*, 6(2), 129-141.

- Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. (2008). Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers Med Sci*, 23(3), 217-228.
- Huang, X., Schurman, N., Handa, K. & Hakomori, S. (2017). Functional role of glycosphingolipids in contact inhibition of growth in a human mammary epithelial cell line. *FEBS Lett*, 591(13), 1918-1928.
- Ishitoya, S., Kurazono, H., Nishiyama, H., Nakamura, E., Kamoto, T., Habuchi, T., ... Yamamoto, S. (2004). Verotoxin induces rapid elimination of human renal tumor xenografts in SCID mice. *J Urol*, 171(3), 1309-1313.
- Jacewicz, M. S., Acheson, D. W., Mobassaleh, M., Donohue-Rolfe, A., Balasubramanian, K. A. & Keusch, G. T. (1995). Maturational regulation of globotriaosylceramide, the Shiga-like toxin 1 receptor, in cultured human gut epithelial cells. *J Clin Invest*, 96(3), 1328-1335.
- Jacewicz, M. S., Mobassaleh, M., Gross, S. K., Balasubramanian, K. A., Daniel, P. F., Raghavan, S., ... Keusch, G. T. (1994). Pathogenesis of Shigella diarrhea: XVII. A mammalian cell membrane glycolipid, Gb3, is required but not sufficient to confer sensitivity to Shiga toxin. *J Infect Dis*, 169(3), 538-546.
- Jacob, F., Alam, S., Konantz, M., Liang, C. Y., Kohler, R. S., Everest-Dass, A. V., ... Heinzelmann-Schwarz, V. (2018). Transition of Mesenchymal and Epithelial Cancer Cells Depends on alpha1-4 Galactosyltransferase-Mediated Glycosphingolipids. *Cancer Res*, 78(11), 2952-2965.
- Janssen, K. P., Vignjevic, D., Boisgard, R., Falguieres, T., Bousquet, G., Decaudin, D., ... Johannes, L. (2006). In vivo tumor targeting using a novel intestinal pathogen-based delivery approach. *Cancer Res*, 66(14), 7230-7236.
- Jin, B., Li, Y. & Robertson, K. D. (2011). DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer*, 2(6), 607-617.
- Johannes, L. & Römer, W. (2010). Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. *Nat Rev Microbiol*, 8(2), 105-116.
- Johansson, D., Andersson, C., Moharer, J., Johansson, A. & Behnam-Motlagh, P. (2010). Cisplatin-induced expression of Gb3 enables verotoxin-1 treatment of cisplatin resistance in malignant pleural mesothelioma cells. *Br J Cancer*, 102(2), 383-391.
- Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S., Luttmann, S., Waldeyer-Sauerland, M., ... Wienecke, A. (2019). *Krebs in Deutschland 2015/2016* Vol. 12. (pp. 16ff.). Heruntergeladen am 09.04.2020
- Kalisiak, A., Minniti, J. G., Oosterwijk, E., Old, L. J. & Scheinberg, D. A. (1991). Neutral glycosphingolipid expression in B-cell neoplasms. *Int J Cancer*, 49(6), 837-845.
- Karpman, D. & Tati, R. (2016). Complement contributes to the pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int*, 90(4), 726-729.
- Keusch, G. T., Acheson, D. W., Aaldering, L., Erban, J. & Jacewicz, M. S. (1996). Comparison of the effects of Shiga-like toxin 1 on cytokine- and butyrate-treated human umbilical and saphenous vein endothelial cells. *J Infect Dis*, 173(5), 1164-1170.
- Keusch, J. J., Manzella, S. M., Nyame, K. A., Cummings, R. D. & Baenziger, J. U. (2000). Cloning of Gb3 synthase, the key enzyme in globo-series glycosphingolipid synthesis, predicts a family of alpha 1, 4-glycosyltransferases conserved in plants, insects, and mammals. *J Biol Chem*, 275(33), 25315-25321.
- Kiarash, A., Boyd, B. & Lingwood, C. A. (1994). Glycosphingolipid receptor function is modified by fatty acid content. Verotoxin 1 and verotoxin 2c preferentially

- recognize different globotriaosyl ceramide fatty acid homologues. *J Biol Chem*, 269(15), 11138-11146.
- Kim, H. J. & Bae, S. C. (2011). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Transl Res*, 3(2), 166-179.
- Kim, M., Binnington, B., Sakac, D., Fernandes, K. R., Shi, S. P., Lingwood, C. A. & Branch, D. R. (2011). Comparison of detection methods for cell surface globotriaosylceramide. *J Immunol Methods*, 371(1-2), 48-60.
- Kim, W. H., Kang, K. H., Kim, M. Y. & Choi, K. H. (2000). Induction of p53-independent p21 during ceramide-induced G1 arrest in human hepatocarcinoma cells. *Biochem Cell Biol*, 78(2), 127-135.
- Kojima, Y., Fukumoto, S., Furukawa, K., Okajima, T., Wiels, J., Yokoyama, K., ... Furukawa, K. (2000). Molecular cloning of globotriaosylceramide/CD77 synthase, a glycosyltransferase that initiates the synthesis of globo series glycosphingolipids. *J Biol Chem*, 275(20), 15152-15156.
- Koressaar, T. & Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23(10), 1289-1291.
- Kovbasnjuk, O., Mourtazina, R., Baibakov, B., Wang, T., Elowsky, C., Choti, M. A., ... Donowitz, M. (2005). The glycosphingolipid globotriaosylceramide in the metastatic transformation of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(52), 19087-19092.
- LaCasse, E. C., Bray, M. R., Patterson, B., Lim, W. M., Perampalam, S., Radvanyi, L. G., ... Garipey, J. (1999). Shiga-like toxin-1 receptor on human breast cancer, lymphoma, and myeloma and absence from CD34(+) hematopoietic stem cells: implications for ex vivo tumor purging and autologous stem cell transplantation. *Blood*, 94(8), 2901-2910.
- Lala, P., Ito, S. & Lingwood, C. A. (2000). Retroviral transfection of Madin-Darby canine kidney cells with human MDR1 results in a major increase in globotriaosylceramide and 10(5)- to 10(6)-fold increased cell sensitivity to verocytotoxin. Role of p-glycoprotein in glycolipid synthesis. *J Biol Chem*, 275(9), 6246-6251.
- Leitlinienprogramm Onkologie, (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe & AWMF). (2013). *S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0, 2013, AWMF*. Heruntergeladen am 11.12.2017 von <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>
- Leitlinienprogramm Onkologie, (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe & AWMF). (2014). *S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1 D. K. e. V. u. D. K. e. V. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) (Hrsg.)*. Heruntergeladen am 11.12.2017 von <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>
- Li, L. C. & Dahiya, R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*, 18(11), 1427-1431.
- Lingwood, C. A. (2011). Glycosphingolipid functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(7).
- Lingwood, C. A., Binnington, B., Manis, A. & Branch, D. R. (2010). Globotriaosyl ceramide receptor function - where membrane structure and pathology intersect. *FEBS Lett*, 584(9), 1879-1886.
- Lingwood, D., Binnington, B., Rog, T., Vattulainen, I., Grzybek, M., Coskun, U., ... Simons, K. (2011). Cholesterol modulates glycolipid conformation and receptor activity. *Nat Chem Biol*, 7(5), 260-262.

- Lingwood, D. & Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327(5961), 46-50.
- Liu, Y. Y., Gupta, V., Patwardhan, G. A., Bhinge, K., Zhao, Y., Bao, J., ... Jazwinski, S. M. (2010). Glucosylceramide synthase upregulates MDR1 expression in the regulation of cancer drug resistance through cSrc and beta-catenin signaling. *Mol Cancer*, 9, 145.
- Louise, C. B., Kaye, S. A., Boyd, B., Lingwood, C. A. & Obrig, T. G. (1995). Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: effect of sodium butyrate on sensitivity of human umbilical vein endothelial cells to Shiga toxin. *Infect Immun*, 63(7), 2766-2769.
- Lund, N., Olsson, M. L., Ramkumar, S., Sakac, D., Yahalom, V., Levene, C., ... Branch, D. R. (2009). The human P(k) histo-blood group antigen provides protection against HIV-1 infection. *Blood*, 113(20), 4980-4991.
- Luo, Y., Lu, X. & Xie, H. (2014). Dynamic Alu methylation during normal development, aging, and tumorigenesis. *Biomed Res Int*, 2014, 784706.
- Maak, M., Nitsche, U., Keller, L., Wolf, P., Sarr, M., Thiebaud, M., ... Janssen, K. P. (2011). Tumor-specific targeting of pancreatic cancer with Shiga toxin B-subunit. *Mol Cancer Ther*, 10(10), 1918-1928.
- Mangency, M., Richard, Y., Coulaud, D., Tursz, T. & Wiels, J. (1991). CD77: an antigen of germinal center B cells entering apoptosis. *Eur J Immunol*, 21(5), 1131-1140.
- McDonald, G., Deepak, S., Miguel, L., Hall, C. J., Isenberg, D. A., Magee, A. I., ... Jury, E. C. (2014). Normalizing glycosphingolipids restores function in CD4+ T cells from lupus patients. *J Clin Invest*, 124(2), 712-724.
- Meisen, I., Friedrich, A. W., Karch, H., Witting, U., Peter-Katalinic, J. & Muthing, J. (2005). Application of combined high-performance thin-layer chromatography immunostaining and nanoelectrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry to the structural characterization of high- and low-affinity binding ligands of Shiga toxin 1. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 19(24), 3659-3665.
- Meivar-Levy, I. & Futerman, A. H. (1999). Up-regulation of neutral glycosphingolipid synthesis upon long term inhibition of ceramide synthesis by fumonisin B1. *J Biol Chem*, 274(8), 4607-4612.
- Melton-Celsa, A. R. (2014). Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr*, 2(4), EHEC-0024-2013.
- MGH CCIB DNA Core. (2017). *CRISPR Sequencing: Sample Submission*. Heruntergeladen am 31.10.20172017 von https://dnacore.mgh.harvard.edu/new-cgi-bin/site/pages/crispr_sequencing_pages/crispr_sequencing_submission.jsp
- Min, K. J., Pyo, H. K., Yang, M. S., Ji, K. A., Jou, I. & Joe, E. H. (2004). Gangliosides activate microglia via protein kinase C and NADPH oxidase. *Glia*, 48(3), 197-206.
- Mobassaleh, M., Koul, O., Mishra, K., McCluer, R. H. & Keusch, G. T. (1994). Developmentally regulated Gb3 galactosyltransferase and alpha-galactosidase determine Shiga toxin receptors in intestine. *Am J Physiol*, 267(4 Pt 1), G618-624.
- Moehler, M., Al-Batran, S. E., Andus, T., Anthuber, M., Arends, J., Arnold, D., ... Awmf. (2011). [German S3-guideline "Diagnosis and treatment of esophagogastric cancer"]. *Z Gastroenterol*, 49(4), 461-531.
- Murakami, N., Kuhnel, A., Schmid, T. E., Ilicic, K., Stangl, S., Braun, I. S., ... Multhoff, G. (2015). Role of membrane Hsp70 in radiation sensitivity of tumor cells. *Radiat Oncol*, 10, 149.

- Müthing, J., Schweppe, C. H., Karch, H. & Friedrich, A. W. (2009). Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury. *Thromb Haemost*, 101(2), 252-264.
- Nitsche, U., Maak, M., Schuster, T., Kunzli, B., Langer, R., Slotta-Huspenina, J., ... Rosenberg, R. (2011). Prediction of prognosis is not improved by the seventh and latest edition of the TNM classification for colorectal cancer in a single-center collective. *Ann Surg*, 254(5), 793-800; discussion 800-791.
- Noda, T., Nagano, H., Takemasa, I., Yoshioka, S., Murakami, M., Wada, H., ... Monden, M. (2009). Activation of Wnt/beta-catenin signalling pathway induces chemoresistance to interferon-alpha/5-fluorouracil combination therapy for hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, 100(10), 1647-1658.
- Nudelman, E., Kannagi, R., Hakomori, S., Parsons, M., Lipinski, M., Wiels, J., ... Tursz, T. (1983). A glycolipid antigen associated with Burkitt lymphoma defined by a monoclonal antibody. *Science*, 220(4596), 509-511.
- Obrig, T. G., Louise, C. B., Lingwood, C. A., Boyd, B., Barley-Maloney, L. & Daniel, T. O. (1993). Endothelial heterogeneity in Shiga toxin receptors and responses. *J Biol Chem*, 268(21), 15484-15488.
- Obrig, T. G., Seaner, R. M., Bentz, M., Lingwood, C. A., Boyd, B., Smith, A. & Narrow, W. (2003). Induction by sphingomyelinase of shiga toxin receptor and shiga toxin 2 sensitivity in human microvascular endothelial cells. *Infect Immun*, 71(2), 845-849.
- Ohyama, C., Fukushi, Y., Satoh, M., Saitoh, S., Orikasa, S., Nudelman, E., ... Hakomori, S. (1990). Changes in glycolipid expression in human testicular tumor. *Int J Cancer*, 45(6), 1040-1044.
- Okuda, T. & Nakayama, K. (2008). Identification and characterization of the human Gb3/CD77 synthase gene promoter. *Glycobiology*, 18(12), 1028-1035.
- Okuda, T., Tokuda, N., Numata, S., Ito, M., Ohta, M., Kawamura, K., ... Furukawa, K. (2006). Targeted disruption of Gb3/CD77 synthase gene resulted in the complete deletion of globo-series glycosphingolipids and loss of sensitivity to verotoxins. *J Biol Chem*, 281(15), 10230-10235.
- Palii, S. S., Van Emburgh, B. O., Sankpal, U. T., Brown, K. D. & Robertson, K. D. (2008). DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B. *Mol Cell Biol*, 28(2), 752-771.
- Park, S. Y., Kwak, C. Y., Shayman, J. A. & Kim, J. H. (2012). Globoside promotes activation of ERK by interaction with the epidermal growth factor receptor. *Biochim Biophys Acta*, 1820(7), 1141-1148.
- Patwardhan, G. A. & Liu, Y. Y. (2011). Sphingolipids and expression regulation of genes in cancer. *Prog Lipid Res*, 50(1), 104-114.
- Peck, B. & Schulze, A. (2019). Lipid Metabolism at the Nexus of Diet and Tumor Microenvironment. *Trends Cancer*, 5(11), 693-703.
- Perl, M., Gehrmann, M., Nitsche, U., Multhoff, G., Johannes, L. & Janssen, K. P. (2016). *The Shiga Toxin receptor Gb3/CD77, a promising therapeutic target in gastrointestinal cancer, is epigenetically regulated* 24th Biennial EACR Congress, Manchester, UK
- Perl, M., Geyer, P., Johannes, L. & Janssen, K.-P. (2015). *Targeted therapy of gastrointestinal tumors based on the Shiga Toxin B receptor Gb3 (CD77)* 5th Munich Biomarker Conference, Munich
- Pewzner-Jung, Y., Brenner, O., Braun, S., Laviad, E. L., Ben-Dor, S., Feldmesser, E., ... Futerman, A. H. (2010). A critical role for ceramide synthase 2 in liver

- homeostasis: II. insights into molecular changes leading to hepatopathy. *J Biol Chem*, 285(14), 10911-10923.
- Phillips, D. C., Hunt, J. T., Money Penny, C. G., Maclean, K. H., McKenzie, P. P., Harris, L. C. & Houghton, J. A. (2007). Ceramide-induced G2 arrest in rhabdomyosarcoma (RMS) cells requires p21Cip1/Waf1 induction and is prevented by MDM2 overexpression. *Cell Death Differ*, 14(10), 1780-1791.
- Ramkumar, S., Sakac, D., Binnington, B., Branch, D. R. & Lingwood, C. A. (2009). Induction of HIV-1 resistance: cell susceptibility to infection is an inverse function of globotriaosyl ceramide levels. *Glycobiology*, 19(1), 76-82.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A. & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 8(11), 2281-2308.
- Rawat, S. S., Johnson, B. T. & Puri, A. (2005). Sphingolipids: modulators of HIV-1 infection and pathogenesis. *Biosci Rep*, 25(5-6), 329-343.
- Robert Koch Institut. (2011). *Bericht: Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch*. Heruntergeladen am 14.12.2017 von http://edoc.rki.de/documents/rki_ab/reeFNxULvsdZo/PDF/262b4Pk2TGGs.pdf
- Robert Koch Institut. (2015a). *EHEC-Erkrankung: RKI-Ratgeber für Ärzte*. Heruntergeladen am 10.12.2017 von https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_EHEC.html#doc2374530bodyText23
- Robert Koch Institut. (2015b). *Shigellose: RKI-Ratgeber für Ärzte*. Heruntergeladen am 10.12.2017 von https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Shigellose.html
- Robinson, L. A., Hurley, R. M., Lingwood, C. & Matsell, D. G. (1995). Escherichia coli verotoxin binding to human paediatric glomerular mesangial cells. *Pediatr Nephrol*, 9(6), 700-704.
- Römer, W., Berland, L., Chambon, V., Gaus, K., Windschiegel, B., Tenza, D., ... Johannes, L. (2007). Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature*, 450(7170), 670-675.
- Rubio, C. A. & Delinassios, J. G. (2010). Invasive carcinomas may arise in colorectal adenomas with high-grade dysplasia and with carcinoma in situ. *Int J Clin Exp Med*, 3(1), 41-47.
- Salhia, B., Rutka, J. T., Lingwood, C., Nutikka, A. & Van Furth, W. R. (2002). The treatment of malignant meningioma with verotoxin. *Neoplasia*, 4(4), 304-311.
- Sandvig, K., Bergan, J., Dyve, A. B., Skotland, T. & Torgersen, M. L. (2010). Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin. *Toxicon*, 56(7), 1181-1185.
- Sandvig, K., Garred, O., Prydz, K., Kozlov, J. V., Hansen, S. H. & van Deurs, B. (1992). Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature*, 358(6386), 510-512.
- Sandvig, K., Olsnes, S., Brown, J. E., Petersen, O. W. & van Deurs, B. (1989). Endocytosis from coated pits of Shiga toxin: a glycolipid-binding protein from *Shigella dysenteriae* 1. *J Cell Biol*, 108(4), 1331-1343.
- Sandvig, K. & van Deurs, B. (1996). Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol Rev*, 76(4), 949-966.
- Saxena, S. K., O'Brien, A. D. & Ackerman, E. J. (1989). Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28 S RNA when microinjected into *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*, 264(1), 596-601.
- Schiffmann, R. (2015). Fabry disease. *Handb Clin Neurol*, 132, 231-248.

- Shiller, M. & Boostrom, S. (2015). The molecular basis of rectal cancer. *Clin Colon Rectal Surg*, 28(1), 53-60.
- Snaebjornsson, M. T., Janaki-Raman, S. & Schulze, A. (2020). Greasing the Wheels of the Cancer Machine: The Role of Lipid Metabolism in Cancer. *Cell Metab*, 31(1), 62-76.
- Soltwisch, J., Kettling, H., Vens-Cappell, S., Wiegelmann, M., Muthing, J. & Dreisewerd, K. (2015). Mass spectrometry imaging with laser-induced postionization. *Science*, 348(6231), 211-215.
- Stangl, S., Gehrman, M., Riegger, J., Kuhs, K., Riederer, I., Sievert, W., ... Multhoff, G. (2011). Targeting membrane heat-shock protein 70 (Hsp70) on tumors by cmHsp70.1 antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(2), 733-738.
- Stimmer, L., Dehay, S., Nemati, F., Massonnet, G., Richon, S., Decaudin, D., ... Johannes, L. (2014). Human breast cancer and lymph node metastases express Gb3 and can be targeted by STxB-vectorized chemotherapeutic compounds. *BMC Cancer*, 14, 916.
- Storck, W., Meisen, I., Gianmoena, K., Plager, I., Kouzel, I. U., Bielaszewska, M., ... Müthing, J. (2012). Shiga toxin glycosphingolipid receptor expression and toxin susceptibility of human pancreatic ductal adenocarcinomas of differing origin and differentiation. *Biol Chem*, 393(8), 785-799.
- Stricklett, P. K., Hughes, A. K., Ergonul, Z. & Kohan, D. E. (2002). Molecular basis for up-regulation by inflammatory cytokines of Shiga toxin 1 cytotoxicity and globotriaosylceramide expression. *J Infect Dis*, 186(7), 976-982.
- Subbaramaiah, K., Chung, W. J. & Dannenberg, A. J. (1998). Ceramide regulates the transcription of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of extracellular signal-regulated kinase/c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem*, 273(49), 32943-32949.
- Taga, S., Mangeney, M., Tursz, T. & Wiels, J. (1995). Differential regulation of glycosphingolipid biosynthesis in phenotypically distinct Burkitt's lymphoma cell lines. *Int J Cancer*, 61(2), 261-267.
- Taki, T. & Ishikawa, D. (1997). TLC blotting: application to microscale analysis of lipids and as a new approach to lipid-protein interaction. *Anal Biochem*, 251(2), 135-143.
- Tesh, V. L. (2010). Induction of apoptosis by Shiga toxins. *Future Microbiol*, 5(3), 431-453.
- Thiele, C., Wunderling, K. & Leyendecker, P. (2019). Multiplexed and single cell tracing of lipid metabolism. *Nat Methods*, 16(11), 1123-1130.
- Tran, T., Diniz, M. O., Dransart, E., Gey, A., Merillon, N., Lone, Y. C., ... Tartour, E. (2016). A Therapeutic Her2/neu Vaccine Targeting Dendritic Cells Preferentially Inhibits the Growth of Low Her2/neu-Expressing Tumor in HLA-A2 Transgenic Mice. *Clin Cancer Res*, 22(16), 4133-4144.
- Trofa, A. F., Ueno-Olsen, H., Oiwa, R. & Yoshikawa, M. (1999). Dr. Kiyoshi Shiga: discoverer of the dysentery bacillus. *Clin Infect Dis*, 29(5), 1303-1306.
- Uchida, H., Kiyokawa, N., Horie, H., Fujimoto, J. & Takeda, T. (1999). The detection of Shiga toxins in the kidney of a patient with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Res*, 45(1), 133-137.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. & Rozen, S. G. (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*, 40(15), e115.
- van de Kar, N. C., Monnens, L. A., Karmali, M. A. & van Hinsbergh, V. W. (1992). Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin

- receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: implications for the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome. *Blood*, 80(11), 2755-2764.
- Van Slambrouck, S. & Steelant, W. F. (2007). Clustering of monosialyl-Gb5 initiates downstream signalling events leading to invasion of MCF-7 breast cancer cells. *Biochem J*, 401(3), 689-699.
- Vega, V. L., Rodriguez-Silva, M., Frey, T., Gehrman, M., Diaz, J. C., Steinem, C., ... De Maio, A. (2008). Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *J Immunol*, 180(6), 4299-4307.
- Vingert, B., Adotevi, O., Patin, D., Jung, S., Shrikant, P., Freyburger, L., ... Tartour, E. (2006). The Shiga toxin B-subunit targets antigen in vivo to dendritic cells and elicits anti-tumor immunity. *Eur J Immunol*, 36(5), 1124-1135.
- Vollmers, H. P., Stulle, K., Dammrich, J., Pfaff, M., Papadopoulos, T., Betz, C., ... Muller-Hermelink, H. K. (1993). Characterization of four new gastric cancer cell lines. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 63(6), 335-343.
- Vriens, K., Christen, S., Parik, S., Broekaert, D., Yoshinaga, K., Talebi, A., ... Fendt, S. M. (2019). Evidence for an alternative fatty acid desaturation pathway increasing cancer plasticity. *Nature*, 566(7744), 403-406.
- Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J. & Kowalska, T. (2008). *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. Boca Raton: CRC Press.
- Waldek, S. & Feriozzi, S. (2014). Fabry nephropathy: a review - how can we optimize the management of Fabry nephropathy? *BMC Nephrol*, 15, 72.
- Wang, L., Takaku, S., Wang, P., Hu, D., Hyuga, S., Sato, T., ... Yamagata, T. (2006). Ganglioside GD1a regulation of caveolin-1 and Stim1 expression in mouse FBJ cells: augmented expression of caveolin-1 and Stim1 in cells with increased GD1a content. *Glycoconj J*, 23(5-6), 303-315.
- Wang, Y., Hinz, S., Uckermann, O., Honscheid, P., von Schonfels, W., Burmeister, G., ... Zeissig, S. (2020). Shotgun lipidomics-based characterization of the landscape of lipid metabolism in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1865(3), 158579.
- Westman, J. S., Hellberg, A., Peyrard, T., Thuresson, B. & Olsson, M. L. (2014). Large deletions involving the regulatory upstream regions of A4GALT give rise to principally novel P1PK-null alleles. *Transfusion*, 54(7), 1831-1835.
- Wiels, J., Fellous, M. & Tursz, T. (1981). Monoclonal antibody against a Burkitt lymphoma-associated antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(10), 6485-6488.
- Windschiegl, B., Orth, A., Römer, W., Berland, L., Stechmann, B., Bassereau, P., ... Steinem, C. (2009). Lipid reorganization induced by Shiga toxin clustering on planar membranes. *PLoS One*, 4(7), e6238.
- Zerbino, D. R., Achuthan, P., Akanni, W., Amode, M. R., Barrell, D., Bhai, J., ... Flicek, P. (2017). Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res*.
- Zhang, F. (2015). *CRISPR Design*. Heruntergeladen am 15.08.2017 von <http://crispr.mit.edu>
- Zoja, C., Buelli, S. & Morigi, M. (2017). Shiga toxin triggers endothelial and podocyte injury: the role of complement activation. *Pediatr Nephrol*.

10 Tabellen und Abbildungen

10.1 Tabellen

Tabelle 1: AB ₅ -Toxine und ihre zellulären Glykanrezeptoren (nach Beddoe et al., 2010 und Hausman & Bruns, 1993)	8
Tabelle 2: Shiga-Toxin-Varianten und ihre Unterschiede modifiziert nach Johannes und Römer (Johannes & Römer, 2010)	9
Tabelle 3: Überblick über den Einsatz Shiga-Toxin-basierter biomedizinischer Anwendungen	14
Tabelle 4: Vergleich unterschiedlicher Gb ₃ -Detektionsmethoden.....	20
Tabelle 5: Physiologische Expression von Gb ₃ in humanen Geweben	23
Tabelle 6: Gb ₃ -Überexpression in humanen Tumorproben. Abkürzungen: PDAC: pankreatisch duktales Adenokarzinom, BL: Burkitt-Lymphom, DHL: Diffus-Histiozytäres-Lymphom, DPDL: diffuse, poorly differentiated lymphoma (diffus schlechtdifferenziertes Lymphom)	24
Tabelle 7: Erhöhte Biosynthese von Gb ₃ und vorgeschlagener Wirkmechanismus in der Literatur.....	28
Tabelle 8: Primer und UPL-Sonden zur Bestimmung der mRNA-Genexpression mittels Roche LightCycler II.....	42
Tabelle 9: Antikörper und Proteine zur durchflusszytometrischen Analyse lebender Zellen.	43
Tabelle 10: Epigenetikmodifizierende Substanzen: Konzentrationen, Lösungsmittel, Wirkmechanismus.....	44
Tabelle 11: Antikörper und Bindeproteine für Immunfluoreszenzmikroskopie.....	49
Tabelle 12: Primer zur Bisulfidsequenzierung der A4GALT-Region.....	55
Tabelle 13: Zytotoxische Substanzen zum Einsatz in Viabilitätstests und zur Überprüfung des klonogenen Überlebens.....	59
Tabelle 14: Mittels Primer3 erstellte Primer zur Amplifizierung der Cas9-Schnittstellenregion.	69
Tabelle 15: Patientencharakteristik und Tumorstadien.....	70
Tabelle 16: Mittlere Gb ₃ -Oberflächenexposition sowie A4GALT-mRNA Expression verschiedener Zelllinien.....	78

Tabelle 17: Auswirkungen epigenetischer Modifikation mittels 5-Aza-2'deoxyctidin und Valproat auf Gb ₃ , membranäres Hsp70 sowie Koexpression.....	95
Tabelle 18: IC ₅₀ -Werte und deren 95%-KI verschiedener Zelllinien bei Behandlung mit StxB-MMAE.....	105

10.2 Abbildungen

Abbildung 1: Retrograder und endolysosomaler Aufnahmeweg von Shiga-Toxin (Abbildung erstellt von Herrn PD Dr. Matthias Maak).....	11
Abbildung 2: Gb ₃ Biosynthese und verwandte Glykosphingolipide	17
Abbildung 3: Schematische Darstellung der zu synthetisierenden Oligosequenzen zur Klonierung in das Cas9-Plasmid.....	64
Abbildung 4: Titration von StxB-Cy3 zur Bestimmung der idealen Konzentration bei durchflusszytometrischer Quantifizierung von Gb ₃	74
Abbildung 5: Gb ₃ -Membranfärbung mittels StxB-Cys auf HCT 116-Zellen ist durch ungekoppeltes StxB verhinderbar.	75
Abbildung 6: Oberflächenexposition von Gb ₃ in den Zelllinien DLD-1 und HCT 116 (Histogramm). Lebende DLD-1- (a) und HCT 116- (b) Zellen wurden mittels StxB-Cy3 (rot) und BSA-Cy3 (schwarz) auf Eis gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.	76
Abbildung 7: Prozentualer Anteil an Gb ₃ -positiven Zellen verschiedener gastrointestinaler Zelllinien.....	77
Abbildung 8: Relative A4GALT-mRNA-Expression verschiedener gastrointestinaler Zelllinien.....	78
Abbildung 9: Korrelation der A4GALT mRNA-Expression und Gb ₃ -Oberflächenexposition.	79
Abbildung 10: Vergleich von A4GALT und Gb ₃ -Ausprägung in humanen Kolonkarzinomproben.	80
Abbildung 11: Lagebeziehung der CpG-reichen Sequenzen aus der <i>in silico</i> -Analyse des humanen A4GALT-Gens (Quelle: ENSEMBL, Version GRCh38).....	81
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Genexpressionsrepression durch CpG-Methylierung im Genpromotorbereich.	81
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Genexpressionsrepression durch Chromatinverdichtung.	82
Abbildung 14: mRNA-Expression des A4GALT-Gens nach Behandlung mit epigenetikmodifizierenden Substanzen.	83
Abbildung 15: Gb ₃ -Oberflächenexposition nach sequentieller Behandlung mit 1µM 5-Aza-2'-desoxycytidin und 1mM Valproat.	84

Abbildung 16: Reexpression von Gb ₃ nach Behandlung mit 5-Aza-2'desoxycytidin und Valproat.....	85
Abbildung 17: Bisulfitsequenzierung der Regionen CpG_1 und CpG_2/Alu.....	86
Abbildung 18: Schematische Darstellung der gRNA-Bindungsstellen und Cas9-Schnittstellen im A4GALT-Gen.....	87
Abbildung 19: Next Generation Sequencing der Schnittstellenregionen von gRNA A1 und A2.	88
Abbildung 20: Gb ₃ -Oberflächenexposition der Linien A1-6 und A2-3 im Vergleich zu HCT 116 Wildtypzellen (Histogramme).	89
Abbildung 21: Expression der mutierten im Vergleich zu parentaler A4GALT mRNA.	89
Abbildung 22: Anteil an 7-AAD-positiven Zellen und Zelldebris der Knockoutlinien im Vergleich zu parentalen HCT 116 Zellen.	92
Abbildung 23: Relatives Zellwachstum der Linien A1-6 und A2-3 im Vergleich zu parentalen HCT 116-Zellen.	93
Abbildung 24: Auswirkungen epigenetischer Modifikation auf die membranäre Hsp70-Exposition verschiedener gastrointestinaler Zelllinien.	94
Abbildung 25: Auswirkungen der Gb ₃ -Defizienz der Linien A1-6 und A2-3 auf die Membranexposition von Hsp70.	96
Abbildung 26: Durchflusszytometrische Analyse der P-gp-Membranexposition von HCT 116 sowie den Linien A1-6 und A2-3 (Histogramm).	97
Abbildung 27: Glycosylceramidsynthase(GCS)-mRNA-Expression in A4GALT-defizienten DLD-1 Zellen vor und nach pharmakologischer Epigenetikmodifikation.	98
Abbildung 28: Glycosylceramidsynthase(GCS)-mRNA-Expression in den A4GALT-defizienten Linien im Vergleich zu parentalen HCT 116 Zellen.	99
Abbildung 29: Primärkulturen von Tumorproben zweier Patienten mit Kolorektalkarzinom.	101
Abbildung 30: Aufnahmekinetik von StxB-Cy3 in HCT 116-Zellen.....	102
Abbildung 31: Gb ₃ ist in unterschiedlichen Tumorkompartimenten lokalisiert.	103
Abbildung 32: Behandlung der A4GALT-defizienten Linien sowie weiterer gastrointestinaler Zelllinien mit Monomethylauristatin E gekoppeltem StxB.	105
Abbildung 33: Modell zur Regulation der Gb ₃ -Biosynthese.	111
Abbildung 34: Glykosphingolipidhomöostase und Rolle für maligne Tumoren.....	117

11 Publikationen

Posterpräsentationen (als Erstautor)

Perl, M., Geyer, P., Johannes, L. & Janssen, K.-P. (2015). Targeted therapy of gastrointestinal tumors based on the Shiga Toxin B receptor Gb3 (CD77) *5th Munich Biomarker Conference*, München, DE

Perl, M., Gehrman, M., Nitsche, U., Multhoff, G., Johannes, L. & Janssen, K. P. (2016). The Shiga Toxin receptor Gb3/CD77, a promising therapeutic target in gastrointestinal cancer, is epigenetically regulated *24th Biennial EACR Congress*, Manchester, UK, DOI: 10.1016/S0959-8049(16)61070-5

Wissenschaftliche Artikel

Geyer, P. E., Maak, M., Nitsche, U., Perl, M., Novotny, A., Slotta-Huspenina, J., Dransart, E., Holtorf, A., Johannes, L., Janssen, K. P. (2016). Gastric adenocarcinomas express the glycosphingolipid Gb3/CD77: Targeting of gastric cancer cells with Shiga toxin B-subunit. *Mol Cancer Ther.*

Bien, T.* , Perl, M.* , Machmüller, A., Nitsche, U., Conrad, A., Johannes, L., Müthing, J., Soltwitsch, J., Janssen, K.P.# , Dreisewerd, K.# (2020). MALDI-2 Mass Spectrometry and Immunohistochemistry Imaging of Gb3Cer, Gb4Cer, and Further Glycosphingolipids in Human Colorectal Cancer Tissue. *Anal Chem.*

*.# gleichwertig beitragende Erst- und Letztautoren

12 Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Hervorzuheben ist die sehr gute Betreuung durch meinen Doktorvater, Prof. Klaus-Peter Janßen, der mir für jedes wissenschaftliche Problem sein Ohr lieh. Ebenso wertvoll waren die Einblicke in richtige Umgangsweisen beim Gespräch mit potentiellen Kooperationspartnern, in den Reviewprozess von wissenschaftlichen Artikeln und in Verhandlungen mit verschiedenen Institutionen innerhalb und außerhalb der Fakultät. Lieber Klaus, ich denke ich konnte in meiner Zeit bei dir im Labor viele wichtige Erfahrungen gewinnen, von denen ich in Zukunft nur profitieren kann.

Prof. Bernhard Holzmann und PD Melanie Laschinger möchte ich für die Diskussionen und Anregungen zum Projekt im Laufe meiner wissenschaftlichen Tätigkeit danken.

Professor Gabriele Multhoff und PD Mathias Gehrman danke ich für die Unterstützung während meiner Arbeit. Liebe Gaby, lieber Matthias, ich bin mir bewusst, dass dies weit über die vorgesehene Mentorenfunktion hinausgeht und möchte dies nochmals betonen!

PD Matthias Maak danke ich für die visuelle Unterstützung. Vielen Dank für die herausragende Abbildung und deine Anmerkungen zum Projekt. Auch möchte ich mich bei dir, Matthias, und dir, Phillipp Geyer, für die gute Übergabe des Projekts bedanken.

Ein großer Dank geht an meine „Mitreiter“ im Labor, die mir nicht nur Arbeitskollegen, sondern auch Freunde wurden und in guten wie weniger guten Zeiten wissenschaftlich und persönlich beistanden. Vor allem dir, Fabian Franke und dir, Andi Sperlich, habe ich es mit zu verdanken, dass ich nie die Freude am Forschen und ins Labor zu gehen verloren habe. Die nächtlichen Experimente (mit und ohne Anführungszeichen!) mit Fabian werde ich stets in freudiger Erinnerung behalten. Christoph Barz, dir soll ein ebenso großer Dank gelten. Nicht nur hast du mein Projekt mit Freude übernommen, sondern du hast auch Stimmung wie Arbeitsfreude im Labor durch deine positive Art bereichert. Christian Stöß, dir möchte ich für die Gespräche und die Aufmunterungen danken, die mir dabei halfen, festzustellen, in welche Richtung es mich in Zukunft zieht.

Widya Johannes und Anja Conrad möchte ich für die gute technische Unterstützung danken, die mir während meiner Zeit im Labor gewährt wurde. Ohne deinen großartigen Einsatz, Widya, wäre mir der Einstieg im Labor deutlich schwerer gefallen. Ebenso möchte ich mich bei dir für die wunderbare, für mich teils kulinarisch komplett unbekannte Verpflegung bedanken!

Auch unseren zahlreichen Masterstudenten gilt ein großer Dank für die gute Zeit. Johannes Müller, mit dem ich nicht nur angeregte Gespräche über unterschiedliche naturwissenschaftliche Fragestellungen führen könnte, sondern der auch sein umfangreiches Wissen in Proteinbiochemie zu meiner Unterstützung einsetzte, möchte ich gesondert erwähnen: Vielen Dank, Johannes!

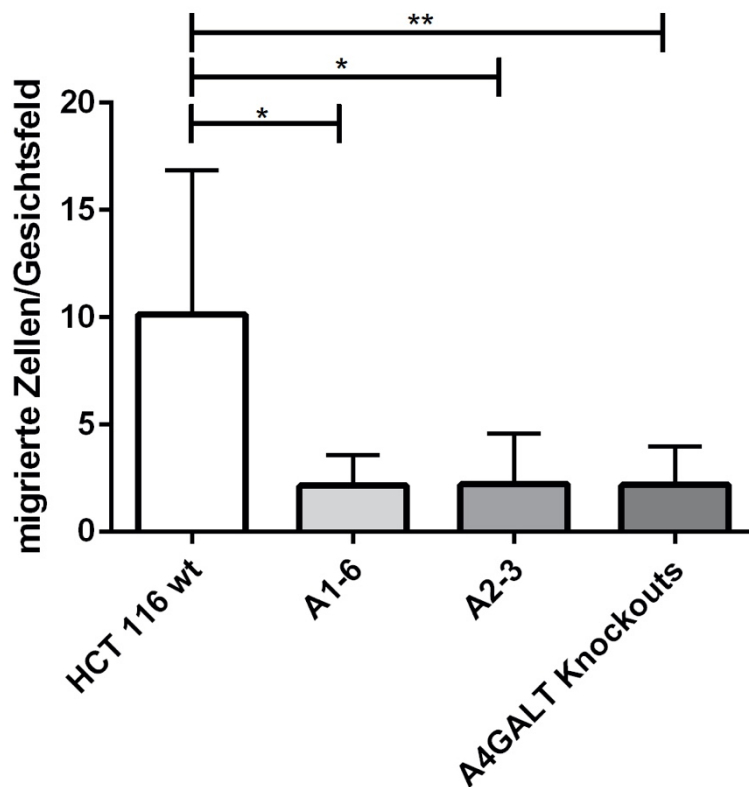
Für die finanzielle Unterstützung muss ich mich bei der Fakultät für Medizin, der DocGS und der TUMGS der Technischen Universität München sowie der Studienstiftung des Deutschen Volkes bedanken.

Auch dem geneigten Leser sei für sein Interesse an meiner Arbeit gedankt.

Der meiste Dank aber gilt meinen Eltern, die mich während meines gesamten Studiums in allen Belangen in nicht beschreibbarem Maß unterstützt haben. Mama, Papa, vielen Dank dafür!

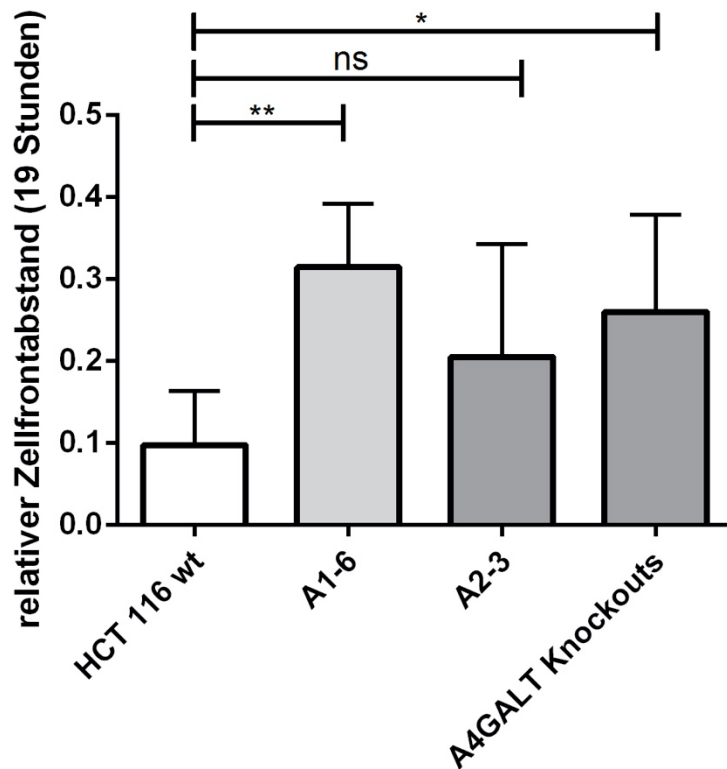
Anhang

Gemeinsam erarbeitete Tabellen und Abbildungen in diesem Abschnitt wurden unter freundlicher Genehmigung von Herrn Christoph Barz der Vollständigkeit halber abgedruckt und werden an anderer Stelle noch näher diskutiert (Barz, 2020). Die jeweiligen Urheber- und Beteiligungsangaben finden sich in der Abbildungsbeschriftung.



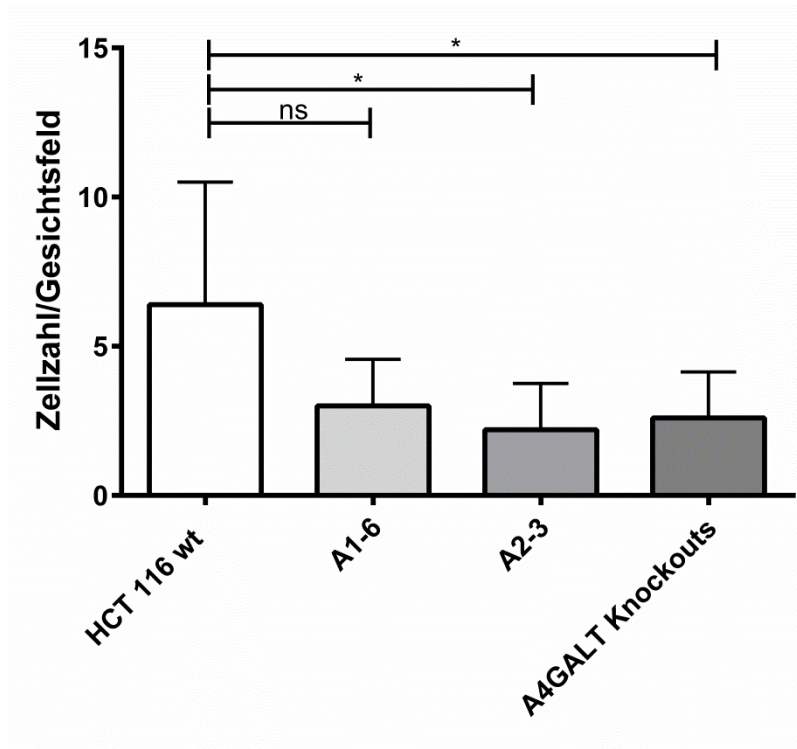
A 1: Migration der Linien A1-6 und A2-3 im Vergleich zu parentalen HCT 116 durch 8 μ M große Poren im Transwelltest.

Die Linien A1-6 ($p=0,017$) und A2-3 ($p=0,034$) wiesen eine signifikant reduzierte Migrationsfähigkeit gegenüber der Ursprungszelllinie HCT 116 auf, dies galt auch bei Zusammenfassung beider Klone ($p=0,002$). Bei beiden Zellklone betrug die Verringerung der Migrationsfähigkeit jeweils etwa 80 Prozent. Fehlerbalken repräsentieren SD von $n=7$ Messungen. Die Daten zur Transwellmigration wurden zum Teil von Herrn Christoph Barz erhoben. (Barz, 2020)



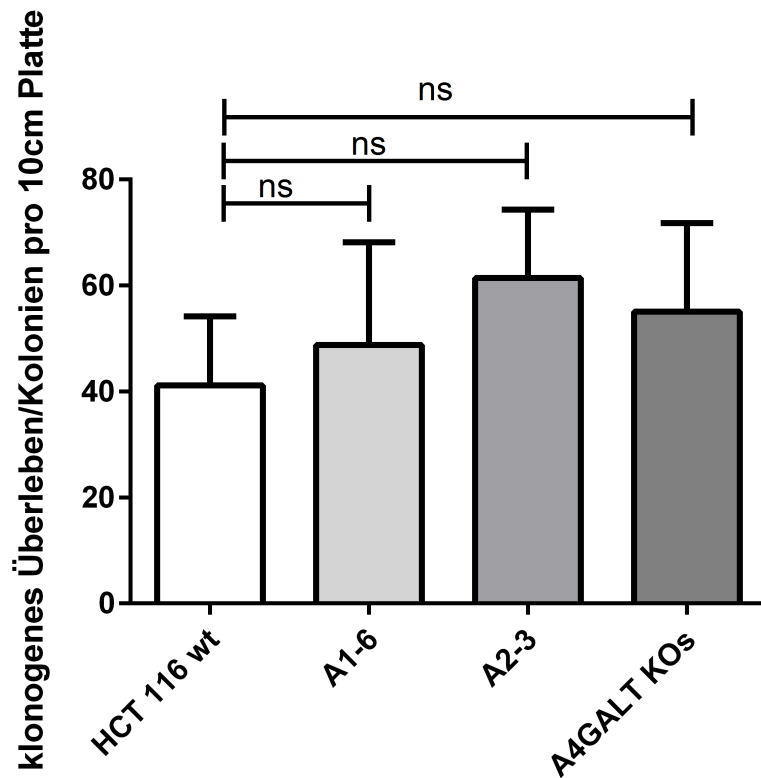
A 2: Wundheilungstest zur Messung des zweidimensionalen Migrationsverhaltens A4GALT-defizienter Zellen (Barz, 2020).

Die Zellen wurden in standardisierten Wundheilungskammern ausgebracht und nach Anwachsen mittels Mittomycin C in ihrem Wachstum gehemmt, um proliferationsbedingtes Fortschreiten der Zellfronten auszuschließen. Nach 0h und 19h wurde der Zellfrontabstand lichtmikroskopisch bestimmt, zueinander ins Verhältnis gesetzt und schließlich zwischen den einzelnen Linien verglichen. A4GALT-Knockouts zusammengenommen wiesen ebenso eine signifikant verringerte 2D-Migrationskapazität auf ($p=0,03$) wie die Linie A1-6 ($0,005$) alleine, während A2-3 alleine keine Signifikanz erreichte ($p=0,21$). Balken repräsentieren SD von $n=4$ Messungen. Die Daten zur zweidimensionalen Migration wurden von Herrn Christoph Barz erhoben.



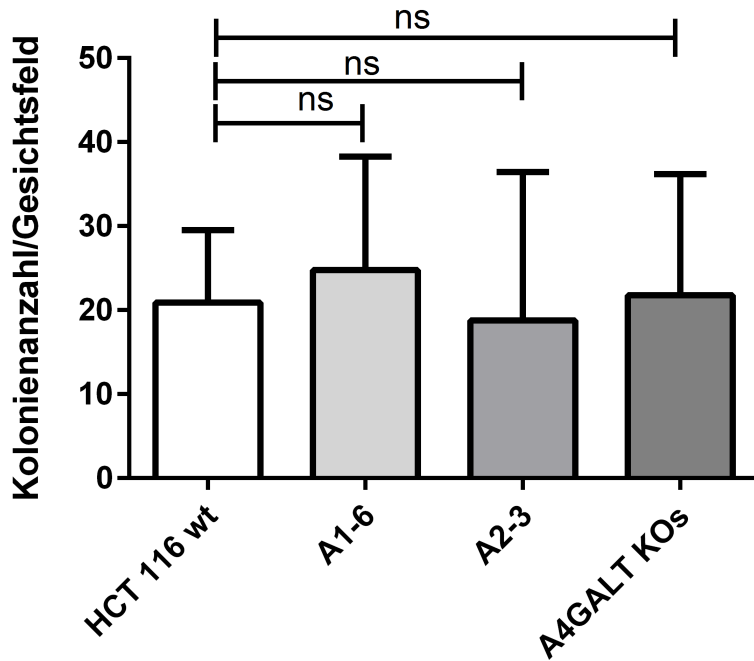
A 3: Matrigelinvasion der Linien A1-6 und A2-3 im Vergleich zu parentalen HCT 116 Zellen (Barz, 2020).

A1-6 und A2-3 wiesen verminderte Invasionsfähigkeit im Vergleich zu ihrer Ursprungszelllinie HCT116 auf. Dabei verfehlte Klon A1-6 knapp die Signifikanz ($p=0,07$). Beide Klone zusammengekommen weisen jedoch ebenfalls eine signifikante Verminderung der Invasionsfähigkeit um 59% auf ($p=0,01$) ($n=6$). Fehlerbalken repräsentieren SD von $n=7$ Messungen. Die Daten zur Matrigelinvasion wurden von Herrn Christoph Barz erhoben.



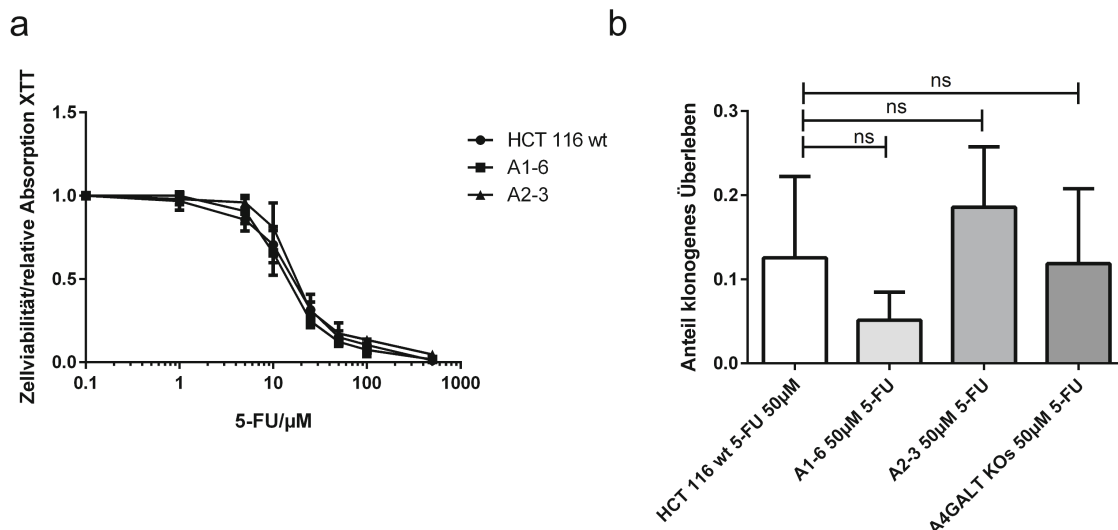
A 4: Klonogenes Überleben der A4GALT-defizienten Linien A1-6 und A2-3 im Vergleich zur parentalen Zelllinie HCT 116.

100 Zellen wurden auf einer 10cm Platte ausgebracht und für 15 Tage inkubiert. Danach wurden die entstandenen Kolonien mittels Kristallviolett gefärbt und ausgezählt wie oben beschrieben. Die Knockoutlinien wiesen einen Trend zu höherem klonogenem Überleben auf, der jedoch die Signifikanz verfehlte ($p=0,5403$ für A1-6; $p=0,0691$ für A2-3; $p=0,1779$ für die Knockouts zusammen). Fehlerbalken repräsentieren SD von $n=4$ Messungen. Die Daten zum klonogenen Überleben wurden zum Teil von Herrn Christoph Barz erhoben (Barz, 2020).



A 5: Anheftungsunabhängiges Zellwachstum der A4GALT-defizienten Linien A1-6 und A2-3 im Vergleich zu parentalen HCT 116 Zellen (Barz, 2020).

Das anheftungsunabhängige Zellwachstum der Linien A1-6 und A2-3 im Vergleich zu Wildtyplinie HCT 116 wurde im Rahmen eines sog. „Soft Agar“-Tests untersucht und unterschied sich nicht signifikant zwischen den generierten und der Ursprungs-Linie ($p=0,6956$ für A1-6, $p=0,8613$ für A2-3 sowie $p=0,9259$ für beide zusammen). Fehlerbalken repräsentieren SD von $n=3$ Messungen. Die Daten zum anheftungsunabhängiges Zellwachstum wurden zum Großteil von Herrn Christoph Barz erhoben.



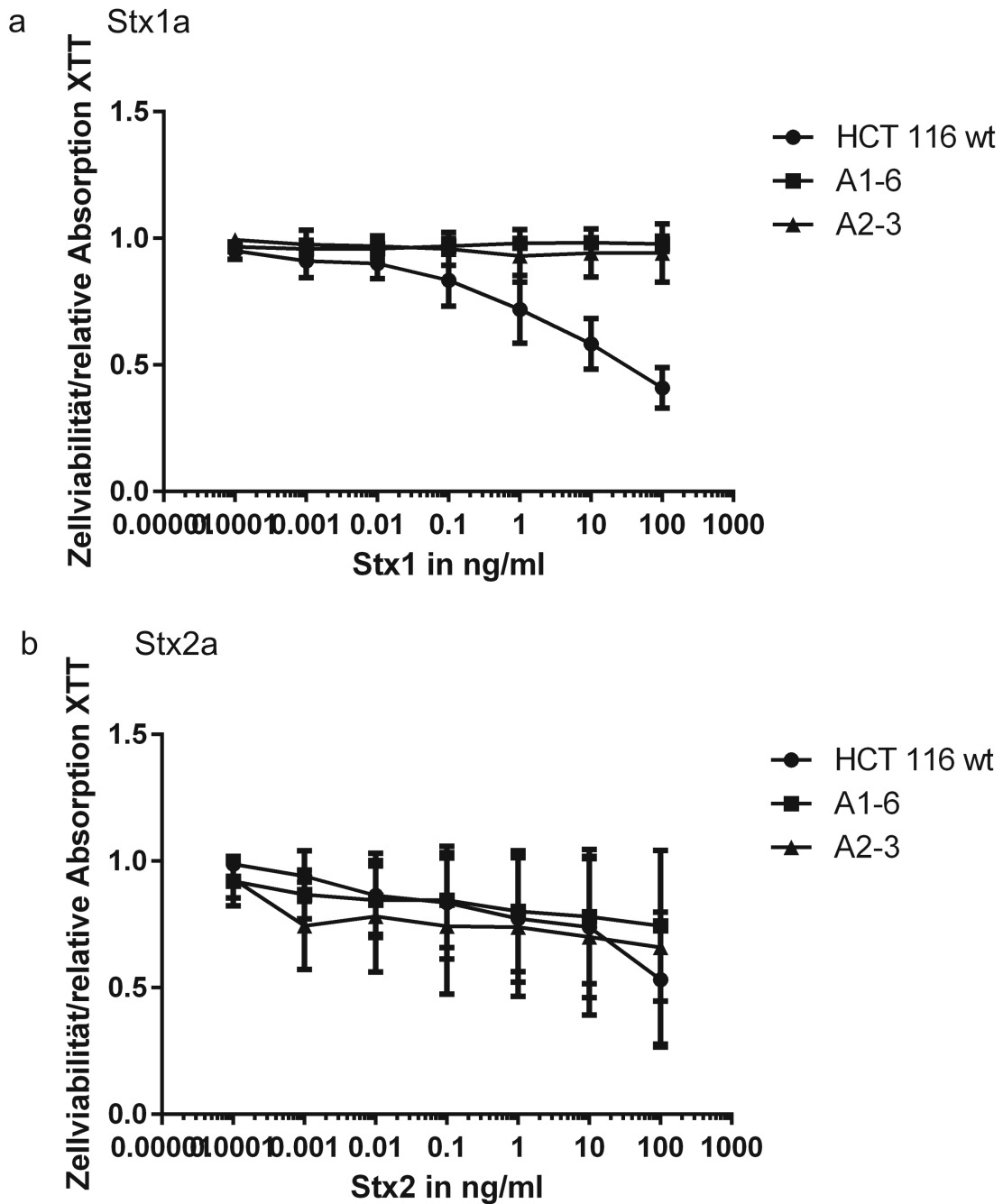
A 6: Chemotherapieansprechen der Linien A1-6 und A2-3 im Vergleich zu parentalen HCT 116 Zellen.

Die Knockoutlinien und HCT 116 Wildtypzellen wurden hinsichtlich Chemotherapieansprechen mittels eines XTT-basierten Ansatz (a) und mittels relativem klonogenen Überleben bei 50 μ M 5-FU (b) überprüft. Dabei ergaben sich im XTT-basierten Versuch nicht signifikant

unterschiedliche IC₅₀-Werte von 15,55µM (HCT 116 Wildtyp), 12,61 µM (A1-6, p=0,13) sowie 16,82 µM (A2-3, p=0,46) (n=3). Auch im klonogenen Überleben unterschieden sich die Knockoutzellen nicht signifikant von der Ursprungszelllinie (p=0,28 für A1-6 bzw. p=0,44 für A2-3, n=3). Fehlerbalken entsprechen SD der Messungen. Die Daten zum Chemotherapieansprechen wurden zum Teil von Herrn Christoph Barz erhoben (Barz, 2020).

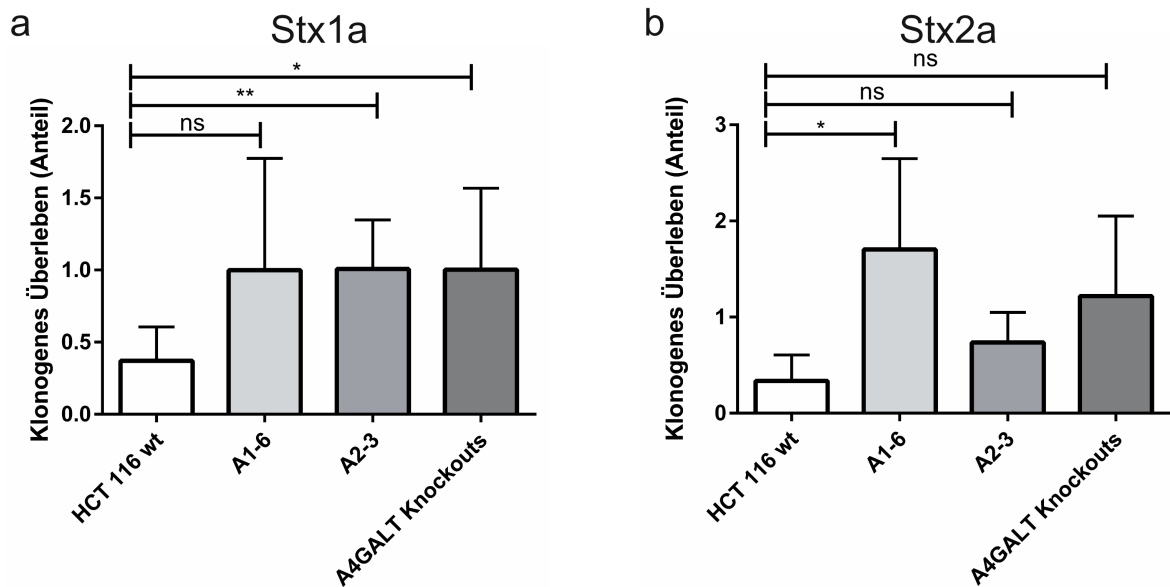
T 1: IC₅₀-Werte sowie klonogenes Überleben bei Behandlung mit 5-FU.

Zelllinie	5-FU IC₅₀-Wert in µM (95%-KI)	5-FU: relatives klonogenes Überleben in Prozent nach Behandlung mit 50µM
HCT 116	15,55 (10,42 bis 23,20)	13
A1-6	12,61 (8,03 bis 19,82)	5,1
A2-3	16,82 (9,36 bis 30,22)	19



A 7: Behandlung von A4GALT-defizienten Zellen mittels bakteriellen Shigatoxinen und Analyse des Viabilitätsverhaltens mittels XTT (Barz, 2020).

Parentale HCT 116-Zellen, A1-6 sowie A2-3 wurden mittels unterschiedlicher Konzentrationen der bakteriellen Shigatoxine Stx1 (a) und Stx2 (b) behandelt. Während es bei Stx1 zu einer starken Verminderung der Zellviabilität bereits bei niedrigen Konzentrationen kam, waren A1-6 und A2-3 vor dem Toxin geschützt. Stx2 hingegen bewirke auf alle drei Zelllinien eine ähnliche, deutlich verminderte Zytotoxizität. Fehlerbalken entsprechen SD von n=4-5 Messungen. Die Daten zum Ansprechen auf Behandlung mit Stx1 und Stx2 wurden von Herrn Christoph Barz erhoben.



A 8: Klonogenes Überleben von HCT 116 Zellen sowie der Knockoutlinien A1-6 und A2-3 nach Behandlung mit Stx1 und Stx2 (Barz, 2020).

HCT 116, A1-6 und A2-3 wurden mit 100ng/ml Stx1 (a) und Stx2 (b) behandelt und dann auf Mikrotiterplatten mit 6 Vertiefungen mit einer unbehandelten Kontrolle ausgebracht. Es ist jeweils der Anteil angewachsener Kolonien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aufgeführt. Beide Toxine führten zu einer Reduktion des klonogenen Überlebens, was aber nur im Falle von Stx1 und für die A4GALT Knockouts zusammengenommen signifikant war. Fehlerbalken entsprechen SD von n=4-5 Messungen. Die Daten zum Ansprechen auf Behandlung mit Stx1 und Stx2 wurden von Herrn Christoph Barz erhoben.

T 2: EC50-Werte sowie klonogenes Überleben bei Behandlung mit Stx1 (Barz, 2020).

Zelllinie	Stx1 EC ₅₀ -Wert in ng/ml (95%-KI)	Stx1: relatives klonogenes Überleben in Prozent nach Behandlung mit 100ng/ml
HCT 116	22,5 (12,28 bis 41,21)	37
A1-6	4118 (870 bis 19480)	100
A2-3	1444 (431,7 bis 4833)	101

T 3: EC50-Werte sowie klonogenes Überleben bei Behandlung mit Stx2 (Barz, 2020).

Zelllinie	Stx2 EC ₅₀ -Wert in ng/ml (95%-KI)	Stx2: relatives klonogenes Überleben in Prozent nach Behandlung mit 100ng/ml
HCT 116	85,99 (35,75 bis 206,8)	34
A1-6	240,8 (78,37 bis 739,6)	170
A2-3	145,5 (39,84 bis 531,4)	74