



Alexandra Samsen (Autor)  
**Humane Glykorezeptoren zur Charakterisierung  
tumorassoziierter Glykostrukturen**

Alexandra Samsen

---

**Humane Glykorezeptoren zur  
Charakterisierung tumorassoziierter  
Glykostrukturen**

---



**Cuvillier Verlag Göttingen**  
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/689>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany  
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>9</b>
1.1	Posttranslationale Modifikationen.....	10
1.2	N-Glykosylierung.....	11
1.3	O-Glykosylierung.....	12
1.4	Veränderungen der Glykosylierung bei der Tumorentstehung.....	13
1.4.1	Lewis Antigene.....	15
1.4.2	T- und Tn-Antigene.....	16
1.5	Lektine.....	17
1.5.1	C-Typ Lektine.....	18
1.5.1.1	Die Rolle des Calcium-Ions bei der Bindung von Lektinen an Kohlenhydrate.....	20
1.5.1.2	Einteilung und Funktion der C-Typ-Lektine.....	20
1.5.1.3	Gruppe II – Typ-II-Rezeptoren.....	21
1.5.1.3	Gruppe III - Collectine.....	24
1.5.1.4	Gruppe V – NK-Zell-Rezeptoren.....	25
1.5.1.5	Gruppe IV – Selektine.....	26
1.5.1.6	Gruppe VIII – Typ-I-Rezeptoren.....	28
1.5.2	Galectine.....	29
1.5.3	Funktionen von C-Typ-Lektinen (Glykorezeptoren) im Immunsystem.....	30
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	31
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>32</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>32</b>
2.1.1	Chemikalien und Enzyme.....	32
2.1.2	cDNA für die Klonierung der Glykorezeptoren.....	32
2.1.3	Oligonukleotide.....	32
2.1.4	Zelllinien.....	34
2.1.5	Antikörper.....	34
2.1.6	Glykokonjugate zur Charakterisierung von Glykorezeptoren.....	35
2.1.7	Gewebe.....	36
2.1.7.1	Humane Normalgewebe.....	36

2.1.7.2	Humane Gewebezelllysate aus Kolonkarzinomen und korrespondierenden Normalgeweben .....	36
2.1.7.3	Humane Gewebezelllysate aus Mammakarzinomen .....	37
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>39</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>39</b>
2.2.1.1	Klonierungen.....	39
	Herstellung einer Kasette für alle Typ-II-Glykorezeptoren durch Integration neuer Schnittstellen in den pEBB-Vektor .....	39
	Vektorkarten der pEBB-Vektoren .....	40
	Klonierung von Typ-I-Glykorezeptoren.....	41
	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	41
	Subklonierung von DNA-Fragmenten .....	41
2.2.1.2	Agarosegelelektrophorese .....	42
2.2.1.3	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose .....	42
2.2.1.4	DNA-Ligation .....	42
2.2.1.5	Bakterielle Transformation .....	42
2.2.1.6	Präparation von Plasmid-DNA .....	43
2.2.1.7	DNA-Sequenzierung .....	43
2.2.1.8	Restriktionsverdau von DNA .....	44
2.2.1.9	<i>Overlap</i> - PCR .....	44
2.2.1.10	Klonierung der Glykorezeptoren .....	46
<b>2.2.3</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>46</b>
2.2.3.1	Auftauen von Zellen.....	46
2.2.3.2	Kultivierung von Zellen.....	46
2.2.3.3	Transiente Transfektion von Zellen zur Expression der Glykorezeptoren.....	47
2.2.3.4	Transiente Transfektion von Zellen und Herstellung von Gesamt-Zelllysaten .....	47
<b>2.2.4</b>	<b>Proteinchemische Methoden.....</b>	<b>48</b>
2.2.4.1	Aufreinigung rekombinanter Glykorezeptoren aus Zellkulturüberständen.....	48
2.2.4.2	Herstellung von Gewebezelllysaten aus Tumorgewebeprobe.....	49
2.2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	49
2.2.4.4	Proteintransfer im Tank Blot Verfahren .....	49
2.2.4.5	Komplexierung rekombinanter Glykorezeptoren.....	50
2.2.4.6	Immundetektion von Mitgliedern der CEACAM-Familie mittels mAb T84.1 .....	50
2.2.4.7	Immundetektion mit anti-Myc- und anti-HA-Antikörpern .....	50

2.2.4.8	Immundetektion von MAPKinase .....	51
2.2.4.9	Konzentrationsbestimmung rekombinanter, aufgereinigter Glykorezeptoren.....	51
2.2.4.10	Coomassie-Färbung von Proteinen .....	52
2.2.4.11	Silberfärbung von Proteinen .....	52
2.2.4.12	Proteinbestimmung nach Bradford.....	52
2.2.4.13	Strippen von Membranen.....	52
<b>2.2.5</b>	<b>Glykobiologische Methoden .....</b>	<b>53</b>
2.2.5.1	Glykokonjugat-ELISA.....	53
2.2.6	Durchflusszytometrie (FACS-Analysen) .....	54
2.2.7	Immunzytochemische Analyse von HEK293-Zellen .....	54
2.2.7.1	Einbettung von Zellen in Agarose .....	55
2.2.7.2	Einbettung von Zellen in Paraffin.....	56
2.2.7.3	Immunzytochemische Färbung von in Paraffin-eingebetteten HT29-Zellen mit einem Glykorezeptor .....	56
2.2.8	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	57
2.2.9	Bioinformatische Datenauswertung .....	57
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>58</b>
3.1	<i>Overlap</i> -PCR zur Modifikation des pEBB-Vektors .....	59
3.2	Klonierung der Extrazellulardomänen 16 verschiedener Glykorezeptoren .....	61
3.3	Expression der Glykorezeptoren .....	62
3.4	Aufreinigung der rekombinanten Glykorezeptoren mittels anti-Myc-Antikörper- Affinitätschromatographie .....	63
3.5	Überprüfung der Reinheit der über anti-Myc-Affinitätschromatographie aufgereinigten Glykorezeptoren .....	64
3.6	Quantifizierung der Glykorezeptoren mittels Coomassie-Färbung.....	65
3.6.1	Kolloidale Coomassiefärbung rekombinant exprimierter Glykorezeptoren.....	66
3.7	Quantifizierung der Glykorezeptoren mittels Immunoblot.....	67
3.8	Einstellung der Komplexzusammensetzung.....	69
3.9	Überprüfung der Bindungsfähigkeit und Bindungsspezifität der Glykorezeptoren an Transfektomen .....	70
3.10	Untersuchung der Bindungsspezifität der Lektine an BSA-Glykokonjugaten.....	73
3.11	Überprüfung der Bindungsfähigkeit und Bindungsspezifität der Glykorezeptoren mittels Western Blot-Analysen .....	75

3.12	Western Blot-Analysen mit verschiedenen Glykorezeptoren an Gewebezellextrakten von Normalgeweben.....	77
3.13	Überprüfung der Bindungsspezifität mittels SRCLII.....	80
3.14	Erstellung von Glykosylierungsprofilen von Gewebeextrakten aus Kolonkarzinomen und korrespondierenden Normalgeweben unter Einsatz zehn verschiedener Glykorezeptoren.....	80
3.14.1	Gruppierung der Glykosylierungsprofile der Kolontumoren und der korrespondierenden Normalgewebe.....	83
3.15	Glykosylierungsprofile von Gewebezellysaten aus Mammakarzinomen.....	86
3.15.1	Immundetektion mit dem monoklonalen Antikörper T84.1.....	91
3.15.2	Cluster Analyse der Western Blot-Analysen von Mammakarzinomen.....	91
3.16	Kontrolle der Bindungsspezifität anhand DC-SIGN und SRCLII.....	94
3.16.1	Kontroll-Untersuchungen an Gewebezellysaten aus Kolonkarzinomen.....	94
3.16.2	Kontroll-Untersuchungen an Gewebezellysaten aus Mammakarzinomen.....	95
3.17	Überprüfung der Einsatzmöglichkeit von rekombinanten Glykorezeptoren zum Nachweis von Glykostrukturen mittels Durchflusszytometrie.....	96
3.18	Einsatz von DC-SIGN und KLRF1 zum Nachweis von Glykostrukturen in der Immunzytochemie und der Immunhistochemie.....	100
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>102</b>
4.1	Klonierung, Expression und Quantifizierung der Extrazellulardomänen humaner Glykorezeptoren.....	103
4.2	Komplexierung der Glykorezeptoren.....	104
4.3	Überprüfung der Bindungsfähigkeit und Bindungsspezifität der Glykorezeptoren an Kontroll-Glykoproteinen und Transfektomen.....	104
4.4	Untersuchung der Bindungsspezifität im ELISA.....	106
4.5	Western Blot-Analysen mit rekombinanten Glykorezeptoren an Gewebezellextrakten aus Normalgeweben.....	109
4.6	Western Blot-Analysen mit rekombinanten Glykorezeptoren an Gewebezellextrakten aus Kolonkarzinomen und korrespondierenden Normalgeweben.....	109
4.6.1	Gruppierung der Glykosylierungsprofile der Kolonkarzinome und der korrespondierenden Normalgewebe mittels <i>Cluster</i> -Analysen.....	112
4.7	Western Blot-Analysen mit rekombinanten Glykorezeptoren an Gewebezellextrakten aus Mammakarzinomen.....	113
4.7.1	<i>Cluster</i> -Analyse der Western Blots von Mammakarzinomen im Vergleich zu einer Normalgewebeprobe.....	113

4.8	Überprüfung der Einsatzmöglichkeit von rekombinanten Glykorezeptoren zum Nachweis von Glykostrukturen mittels Durchflusszytometrie .....	114
4.9	Einsatz von DC-SIGN und KLRF1 zum Nachweis von Glykostrukturen in der Immunzytochemie .....	116
	Anwendung von DC-SIGN an HEK293-Transfektomen .....	116
	Anwendung von KLRF1 an Paraffin eingebetteten HT29-Zellen.....	117
4.10	Ausblick .....	119
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>120</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>122</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>130</b>
<b>8.</b>	<b>Veröffentlichungen und Förderung.....</b>	<b>131</b>
<b>9.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>132</b>
<b>10.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>136</b>
I.	Präfixe .....	136
II.	Einheiten .....	136
III.	Ein- und Drei- Buchstabencode der Aminosäuren .....	137
IV.	cDNA-Sequenzen aller verwendeten rekombinanten Glykorezeptoren .....	138
V.	Sequenzen aller rekombinanten Glykorezeptoren im pEBB-Vektor .....	148